

СОДЕРЖАНИЕ

Том 91, номер 5, 2022

ОБЗОРЫ

Антиоксидантные свойства молочнокислых бактерий

А. Л. Брюханов, А. И. Климко, А. И. Нетрусов

519

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Филогения и свойства новых штаммов *Pseudomonas* sp. из ризосферы бобовых растений Южного Урала

О. В. Чубукова, Л. Р. Хакимова, Е. С. Акимова, З. Р. Вершинина

537

Галактофуранан клеточной стенки "*Raenarthrobacter pyridinovorans*" ВКМ Ас-1098D

*Н. В. Потехина, А. С. Шашков, Е. В. Арискина, Н. В. Присяжная,
Е. М. Тульская, Ф. М. Хасаева, Л. И. Евтушенко*

547

Биоремедиационный потенциал иммобилизованных на биочае бактерий *Azospirillum brasilense*

*А. Ю. Муратова, Л. В. Панченко, Е. В. Дубровская, Е. В. Любунь, С. Н. Голубев,
И. Ю. Сунгурцева, А. М. Захаревич, Л. Р. Бикташева,
П. Ю. Галицкая, О. В. Турковская*

554

Функциональное состояние *Coelastrella multistriata* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyta*) в накопительной культуре

С. Ю. Мальцева, М. С. Куликовский, Е. И. Мальцев

565

Подбор перспективного штамма микроводорослей для биоремедиации сточных вод аквакультуры

*Н. Р. Акмуханова, Б. К. Заядан, А. К. Садвакасова, М. М. Тореханова,
Н. П. Тимофеев, М. О. Бауенова, Д. А. Тодоренко, Д. Н. Маторин*

576

Зависимость состава клубеньковых бактерий лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) от стадии вегетации растения-хозяина

Ан. Х. Баймиев, Е. С. Акимова, И. С. Коряков, А. А. Владимирова, Ал. Х. Баймиев

586

Бинарные биопленки *Staphylococcus aureus* 209P и *Cytococcus schroeteri* H01: дуалистическая роль китоккокков и изменения клеточной адгезии в присутствии натрийуретического пептида А-типа

*Е. В. Дювенжи, Е. Д. Неволлина, С. В. Мартьянов, М. В. Журина, О. В. Калмантаева,
М. А. Макарова, Е. А. Бочкова, В. В. Фирстова, В. К. Плакунов, А. В. Ганнесен*

597

Сравнительное исследование состава и структуры микробных биопленок эконитш мясоперерабатывающих комбинатов, различающихся источниками сырья

*Ю. А. Николаев, Е. Н. Тихонова, Г. И. Эль-Регистан, М. В. Журина, В. К. Плакунов,
Е. В. Демкина, Е. В. Зайко, Д. С. Батаева, Н. А. Насыров, Ю. К. Юшина*

613

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Микробное сообщество, аккумулирующее фосфат в лабораторном биореакторе с доминированием "*Candidatus Accumulibacter*"

*А. В. Пелевина, Ю. Ю. Берестовская, В. А. Грачёв, А. Г. Дорофеев, О. В. Слатинская,
Г. В. Максимов, А. Ю. Каллистова, Ю. А. Николаев, Е. В. Груздев, Н. В. Равин,
Н. В. Пименов, А. В. Марданов*

631

Влияние лантана на состав метанотрофного сообщества дерново-подзолистой почвы

И. К. Кравченко, Л. Р. Сизов, Е. Н. Тихонова, Л. В. Лысак

638

Поправка

644

Contents

Vol. 91, No. 5, 2022

Reviews

Antioxidant Properties of Lactic Acid Bacteria

A. L. Bryukhanov, A. I. Klimko, and A. I. Netrusov

519

Experimental Articles

Phylogeny and Properties of New *Pseudomonas* spp. from the Rhizosphere of Southern Ural Leguminous Plants

O. V. Chubukova, L. R. Khakimova, E. S. Akimova, and Z. R. Vershinina

537

Cell Wall Galactofuranan of “*Paenarthrobacter pyridinovorans*” VKM Ac-1098D

N. V. Potekhina, A. S. Shashkov, E. V. Ariskina, N. V. Prisyazhnaya, E. M. Tul'skaya, F. M. Khasaeva, and L. I. Evtushenko

547

Bioremediation Potential of Biochar-Immobilized Cells of *Azospirillum brasilense*

A. Yu. Muratova, L. V. Panchenko, E. V. Dubrovskaya, E. V. Lyubun', S. N. Golubev, I. Yu. Sungurtseva, A. M. Zakharevich, L. R. Biktasheva, P. Yu. Galitskaya, and O. V. Turkovskaya

554

Functional State of *Coelastrrella multistriata* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyta*) in an Enrichment Culture

S. Yu. Maltseva, M. S. Kulikovskiy, and Y. I. Maltsev

565

Determination of the Promising Microalgal Strain for Bioremediation of the Aquaculture Wastewater

N. R. Akmukhanova, B. K. Zayadan, A. K. Sadvakasova, M. M. Torekhanova, N. P. Timofeev, M. O. Bauenova, D. A. Todorenko, and D. N. Matorin

576

The Composition of *Lotus corniculatus* Root Nodule Bacteria Depending on the Host Plant Vegetation Stage

An. Kh. Baymiev, E. S. Akimova, I. S. Koryakov, A. A. Vladimirova, and Al. Kh. Baymiev

586

Binary Biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Kytococcus schroeteri* H01: Dualistic Role of Kytococci and Cell Adhesion Alterations in the Presence of the A-Type Natriuretic Peptide

E. V. Diuvenji, E. D. Nevolina, S. V. Mart'yanov, M. A. Zhurina, O. V. Kalmantaeva, M. A. Makarova, E. A. Botchkova, V. V. Firstova, V. K. Plakunov, and A. V. Gannesen

597

Comparative Investigation of the Composition and Structure of Microbial Biofilms Retrieved at Meat-Processing Facilities Using Different Basic Materials

Yu. A. Nikolaev, E. N. Tikhonova, G. I. El'-Registan, M. V. Zhurina, V. K. Plakunov, E. V. Demkina, E. V. Zaiko, D. S. Bataeva, N. A. Nasyrov, and Yu. K. Yushina

613

Short Communications

A Phosphate-Accumulating Microbial Community in the Laboratory Bioreactor Predominated by “*Candidatus Accumulibacter*”

A. V. Pelevina, Yu. Yu. Berestovskaya, V. A. Grachev, A. G. Dorofeev, O. V. Slatinskaya, G. V. Maksimov, A. Yu. Kallistova, Yu. A. Nikolaev, E. V. Grouzdev, N. V. Ravin, N. V. Pimenov, and A. V. Mardanov

631

The Effect of Lanthanum on the Composition of a Methanotrophic Community of Sod-Podzolic Soil

I. K. Kravchenko, L. R. Sizov, E. N. Tikhonova, and L. V. Lysak

638

Errata

644

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

© 2022 г. А. Л. Брюханов^а, А. И. Климко^{а, *}, А. И. Нетрусов^а^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: alenaklimko221@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.2022 г.

После доработки 27.05.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2022 г.

Молочнокислые бактерии (МКБ) широко используют во многих ферментационных процессах при приготовлении разнообразных продуктов питания, включающих в себя не только молочные и мясные, но также и овощные продукты. В ходе промышленных биотехнологических процессов лактобактерии часто подвергаются окислительным стрессам, которые возникают из-за накопления активных форм кислорода (АФК) внутри клеток. АФК образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода до супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$), пероксида водорода (H_2O_2) или гидроксильного радикала (OH^{\cdot}) и вызывают серьезные повреждения клеточных макромолекул. У МКБ отсутствует полная электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), поэтому ранее считалось, что они не способны к существованию в аэробных условиях. В клетках ряда штаммов МКБ были обнаружены основные ферменты антиоксидантной защиты с высокой специфической активностью: два типа каталазы и НАДН-пероксидазы. Гемовые каталазы присутствуют у многих видов лактобактерий при условии наличия гема или гематина в питательной среде, причем в клетках были найдены как монофункциональные, так и бифункциональные каталазы-пероксидазы. Каталазы второго типа (Mn-содержащие), не требующие наличия гема, также были обнаружены в клетках некоторых лактобацилл, и именно у МКБ наблюдается высокий уровень содержания Mn(II) внутри клеток. Пробиотические культуры МКБ с выраженной антиоксидантной активностью очень востребованы, поскольку они потенциально способны защитить от токсичного воздействия O_2 организм хозяина, и способствуют профилактике сердечно-сосудистых, воспалительных, онкологических заболеваний. В обзоре на основе тщательного анализа известных к настоящему времени научных данных описаны системы антиоксидантной защиты в клетках МКБ – влияние окислительных стрессов на метаболизм лактобактерий, их основные антиоксидантные ферменты (НАДН-оксидазы, НАДН-пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутаза, тиоредоксинредуктазы и др.), а также ключевые регуляторные белки и гены, отвечающие за поглощение кислорода, как один из механизмов снижения концентрации АФК.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, активные формы кислорода, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, окислительный стресс, электрон-транспортная цепь

DOI: 10.31857/S0026365622100329

МКБ – микроорганизмы с бродильным типом метаболизма, которые не нуждаются в кислороде для роста. Однако они могут расти и в аэробных условиях, поскольку пируват, образующийся в реакциях пути Эмбдена–Мейергофа–Парнаса или фосфокетотазового пути, может метаболизироваться аэробно, превращаясь в ацетилфосфат и ацетат (Kandler, 1983; Guidone et al., 2013). Так, в присутствии кислорода у *Lactocaseibacillus casei* происходит изменение путей конверсии пирувата с уменьшением синтеза молочной кислоты и образованием ацетата, ацетоина и диацетила для поддержания восстановительного баланса. В условиях поглощения кислорода наблюдалось увеличение экспрессии генов, кодирующих пируватоксидазу, ацетаткиназу, α -ацетолактатдекарбоксылазу, ацетолактатсинтазу и оксалоацетатдекарбоксылазу, в

то время как экспрессия генов, кодирующих L-лактатдегидрогеназу, пируватформатлиазу, пируваткарбоксылазу и фосфатацетилтрансферазу, снижалась (Ricciardi et al., 2019).

Многие виды рода *Lactobacillus* и близкородственных родов (Zheng et al., 2020), традиционно классифицируемых как аэротолерантные анаэробные микроорганизмы, могут использовать кислород в качестве субстрата для реакций, которые катализируются флавиновыми оксидазами, а в ряде случаев способны к синтезу минимальной дыхательной электрон-транспортной цепи. Штаммы таких широко распространенных видов, как *L. casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* и *Latilactobacillus sakei*, хорошо приспособлены к аэробно-дыхательному росту (Zotta et al., 2017).

МКБ, нашедшие применение в качестве одного из наиболее распространенных пробиотиков в ферментированных продуктах и напитках, а также используемые в качестве полезных для здоровья пищевых добавок, обладают многочисленными пробиотическими свойствами (Klimko et al., 2020), одними из которых являются аэротолерантность клеток (Брюханов, Нетрусов, 2007) и способность к повышению антиоксидантного статуса организма хозяина (Noureen et al., 2019).

На ряде факультативно анаэробных штаммов *L. plantarum*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* и *L. casei* было показано (Watanabe et al., 2012; Guidone et al., 2013; Ianniello et al., 2016), что культивирование с аэрацией увеличивает выход биомассы в стационарной фазе роста, особенно в случае внесения в питательную среду гема и менахинона (для формирования дыхательной ЭТЦ, что значительно повышало устойчивость клеток к пероксидному и кислородному стрессам). МКБ образуют H_2O_2 только в аэробных условиях, причем способность к синтезу пероксида водорода является важным пробиотическим свойством, поскольку приводит к гибели патогенной микробиоты, в частности, *Salmonella enterica* (Pridmore et al., 2008).

МКБ подразделяют на гомоферментативные и гетероферментативные виды. Среди гомоферментативных лактобацилл способность расти аэробно была обнаружена у *Lactobacillus johnsonii* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. У *L. johnsonii* отсутствуют пируватдегидрогеназа и пируват-формиллиаза, а CO_2 образуется через пируват-оксидазный и ацетат-киназный пути (Zotta et al., 2017).

Среди представителей МКБ, осуществляющих гетероферментативное молочнокислое брожение, были также обнаружены лактобациллы, способные расти в присутствии кислорода. К ним относят *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Limosilactobacillus panis*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Limosilactobacillus reuteri* и *Levilactobacillus spicheri*. У *F. sanfranciscensis* и *L. panis*, применяемых в производстве заквасок, аэробный рост увеличивал энергетический выход метаболических процессов и продукцию биомассы, тогда как активность НАДФН-оксидазы и NPR (non-expressor pathogen-related genes – регуляторный белок, содержащий тиоловые группы) влияла на клеточный баланс НАДН/НАД⁺ и устойчивость к окислительным стрессам (Zotta et al., 2017).

В клетках молочнокислых бактерий НАДН-оксидазная/НАДН-пероксидазная система является альтернативным путем для регенерации НАД⁺, наряду с конверсией пирувата в лактат и этанол. Пируват затем конвертируется в ацетат, что выражается в дополнительном моле АТФ. Оксидазные активности приводят к образованию токсичных для клетки АФК. Поэтому наличие кислорода

индуцирует специфические клеточные ответы. Микроорганизмы могут использовать ферментативные (супероксиддисмутаза, каталаза, НАДН-оксидаза, НАДН-пероксидаза) или неферментативные (Mn^{2+} , аскорбат, токоферолы, глутатион) механизмы для удаления кислородных радикалов (De Angelis, Gobbetti, 2004).

Некоторые штаммы *L. reuteri* способны расти в условиях пероксидного стресса за счет активности 1,3-пропандиол: НАД⁺ оксидоредуктазы, кодируемой геном *dhaT* и способной к инактивации H_2O_2 в присутствии НАДН (Arcanjo et al., 2019).

Необходимо отметить, что отношение МКБ к воздействию активных форм кислорода, которые образуются в ходе промышленных процессов или во время прохождения клеток по желудочно-кишечному тракту, очень часто является штаммоспецифическим свойством, что выражается в различной экспрессии генов, кодирующих белки метаболизма, окислительных стрессов, транскрипции, формирования клеточной стенки и др. (Marques Da Silva et al., 2019). Были показаны значительные штаммовые различия между представителями родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* в отношении их антиоксидантных свойств: способности к элиминации свободных радикалов, ингибирования окисления аскорбиновой и линолевой кислот, внутриклеточного содержания супероксиддисмутазы (СОД) и глутатиона (Amaretti et al., 2013; Choork et al., 2017). Штаммы *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactocaseibacillus paracasei* и *Lactocaseibacillus rhamnosus* с наиболее высокими антиоксидантными активностями обладали и хорошей устойчивостью к окислительным стрессам (8-ч инкубации с 1 мМ H_2O_2 или 1-ч инкубации с 1 мМ OH^{\cdot}) (Choork et al., 2017). Также хорошим антиоксидантным потенциалом в качестве пробиотических культур обладали некоторые штаммы *Lactobacillus acidophilus* и *Levilactobacillus brevis* (Amaretti et al., 2013). Улучшение антиоксидантных свойств штаммов (например, наличие в клетках ферментов окислительного стресса с высокими активностями, а также тиолов), в том числе и с помощью методов геномной инженерии, представляет собой очень эффективный подход к повышению выживаемости штаммов МКБ в окружающей среде.

ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНЫЕ ЦЕПИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПОГЛОЩЕНИИ КИСЛОРОДА КЛЕТКАМИ МКБ

Восстановление кислорода в электрон-транспортной цепи *Lactiplantibacillus plantarum*. Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) клеток *L. plantarum* WCFS1, формируемая в аэробных дыхательных условиях (после добавления в среду гема и менахинона) содержит НАДН-дегидрогеназу (Ndh1), пул менахинонов (витамин K_2) и цитохромов *bd*-ти-

па. Данный участок ЭТЦ способен активироваться и восстанавливать низкие концентрации кислорода. Однако следует подчеркнуть, что оксидаза *bd*-типа из клеток *L. plantarum* WCFS1 не была выделена и очищена для сравнения ее свойств с классическими цитохромоксидазами *bd* (рис. 1; Brooijmans et al., 2009a).

Одной из предложенных классификаций МКБ (табл. 1) является ранжирование видов по их способности к восстановлению кислорода в зависимости от наличия или отсутствия генов *cydABCD*, кодирующих синтез цитохром *bd*-оксидазного комплекса (Pedersen et al., 2012). Те МКБ, которые не способны к внутриклеточному восстановлению кислорода, не имеют генов *cyd*. Необходимо отметить, что близкородственные виды не обязательно находятся в одной категории по наличию ферментов восстановления O_2 .

Анализ данных, приведенных в табл. 1, показывает, что для восстановления кислорода представителям семейства *Streptococcaceae* необходим экзогенный гем в питательной среде, тогда как для основного пула изученных культур МКБ необходимо внесение еще и менахинона. Интересно отметить, что патогенные стрептококки, приспособившись к развитию в организмах животных, утратили гены, необходимые для восстановления кислорода. Этот факт подтверждает предположение, выдвинутое голландской группой (Brooijmans et al., 2009a), что эволюционные предшественники МКБ имели группы генов, кодирующие оксидазы, однако со временем утеряли их вследствие множественных делеций при переходе к преимущественно анаэробному образу жизни. Те же МКБ, которые сохранили способность к аэробному дыханию, рассматривают в настоящее время как потенциально активные пробиотические и стартовые культуры для молочной и мясной промышленности из-за их большей устойчивости к кислородным стрессам.

Гем как вспомогательный компонент электрон-транспортной цепи. Процесс восстановления кислорода у факультативно анаэробной МКБ *Lc. lactis* можно индуцировать добавлением предшественников гема, что приводит к повышению эффективности роста культуры с удвоением выхода биомассы, а также выживаемости клеток в условиях аэрации. У лактококков улучшается рост в присутствии O_2 и протопорфирина IX в среде из-за адаптивной перестройки метаболизма с брожения на дыхание (Duwat et al., 2001; Shi et al., 2016). Показано, что ген *cydA*, кодирующий цитохром *d*-оксидазу и непосредственно участвующий в поглощении кислорода, а также ген *hemZ*, кодирующий феррохелатазу (конвертирует протопорфирин IX в гем), экспрессируются в поздней логарифмической стадии роста культур *Lc. lactis* в аэробных условиях (Duwat et al., 2001).

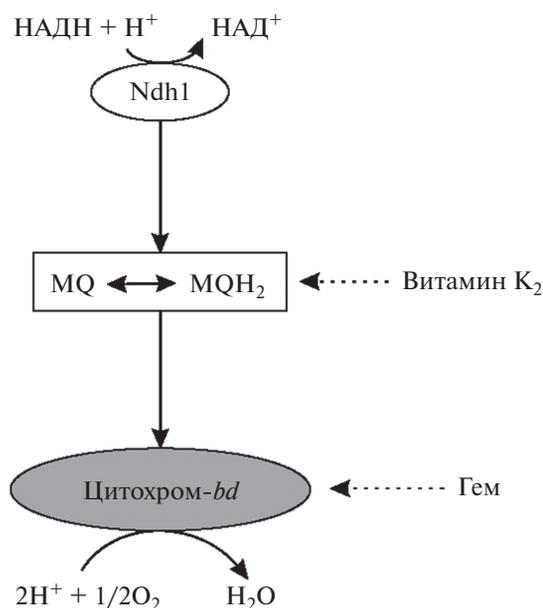


Рис. 1. Предполагаемая электрон-транспортная цепь у *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1, разветвленная на уровне оксидаз. Пунктирные стрелки показывают внутриклеточное происхождение менахинона и гема. Ndh – НАДН-дегидрогеназа, MQ – менахинон, MQH₂ – менахинол (по Brooijmans et al., 2009a).

Как биоактивная молекула, гем может вовлекаться не только в процесс восстановления кислорода. Например, некоторые лактобактерии, включая и те, что неспособны к поглощению O_2 , синтезируют активную гем-зависимую каталазу при росте в аэробных условиях в присутствии гематина, защищающую клетки от эндогенного H_2O_2 (Wolf et al., 1991; Frankenberg et al., 2002). Ни один представитель молочнокислых бактерий не способен к синтезу гема, поэтому им необходима транспортная система, обеспечивающая его поглощение. Например, у *Lc. lactis* эту функцию выполняет оперон *fhuDBAR* (Gaudu et al., 2003; Pedersen et al., 2012). Затем гему необходимо связаться с мембраной клетки. Он может быть включен в состав белков-шаперонов. Хорошим кандидатом на роль гем-связывающего белка является алкилгидропероксидредуктаза (AhpC, один из ключевых белков окислительного стресса), которая способна защитить внутриклеточный гем от деградации (Lechardeur et al., 2010). Другой комплекс – CydCD, который входит в состав цитохром *bd*-оксидазы вместе с CydAB, активен в восстановленных условиях и транспортирует цистеин и глутатион, которые могут способствовать взаимодействию CydAB с гемом (Pittman et al., 2005).

Несмотря на то, что гем играет важную роль в реакциях поглощения и элиминации токсичного кислорода (Kumar, Vandyopadhyay, 2005), клеткам необходимо также наличие механизмов, обеспе-

Таблица 1. Примеры молочнокислых бактерий в зависимости от прогнозируемого (наличие генов *cydABCD*) или подтвержденного способа восстановления кислорода (по Pedersen et al., 2012)

Способ восстановления кислорода	<i>Streptococcaceae</i>	Лактобациллы (прежнее название – <i>Lactobacillaceae</i>)
Восстановление кислорода в присутствии экзогенного гема	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus garviae</i>	
Восстановление кислорода в присутствии экзогенного гема и менахинона		<i>Limosilactobacillus antri</i> (<i>Lactobacillus antri</i>) <i>Levilactobacillus brevis</i> (<i>Lactobacillus brevis</i>) <i>Lentilactobacillus buchneri</i> (<i>Lactobacillus buchneri</i>) <i>Lactobacillus casei</i> <i>Loigolactobacillus coryniformis</i> (<i>Lactobacillus coryniformis</i>) <i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (<i>Lactobacillus fermentum</i>) <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lentilactobacillus hilgardii</i> (<i>Lactobacillus hilgardii</i>) <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Limosilactobacillus oris</i> (<i>Lactobacillus oris</i>) <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lactobacillus paracasei</i>) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>) <i>Limosilactobacillus reuteri</i> (<i>Lactobacillus reuteri</i>) <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (<i>Lactobacillus salivarius</i>) <i>Lactobacillus ultunensis</i> <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> (<i>Lactobacillus vaginalis</i>)
Отсутствие внутриклеточного восстановления кислорода		<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus iners</i> <i>Latilactobacillus sakei</i>

чивающих выведение гема, во избежание токсических эффектов самого гема (Pedersen et al., 2012). Так, *Lc. lactis* обладает специальной системой оттока гема (HrtRBA), максимальная активность которой наблюдается во время избытка гема, что препятствует накоплению последнего. Следует отметить, что среди многочисленных МКБ, обладающих системами HrtRBA и/или Pef (менее строгая система, выводящая из клеток помимо гема еще и протопорфирин IX), некоторые штаммы не обладают способностью поглощать кислород (Pedersen et al., 2012).

Восстановление кислорода с участием менахинонов. Менахиноны (MX) – это ассоциированные с мембранами сложные органические соединения с окислительно-восстановительными свойствами, относящиеся к витаминам типа K₂. Они представляют собой нафтоидное кольцо, ковалентно связанное с гидрофобной изопреноидной цепью, состоящей из повторяющихся изопреновых единиц. В качестве центрального компонента ЭТЦ менахиноны переносят электроны от восстановителей (например, дегидрогеназ) к оксидоредуктазам (например, CydAB). Инактивация синтеза нафтоидных колец у *Lc. lactis* препятствует дальнейшему

процессу восстановления кислорода, но только если в комплекс не входит экзогенный менахинон (Rezaïki et al., 2008; Brooijmans et al., 2009b).

Можно предположить, что каждый тип менахинона выполняет определенную функцию, так как их биосинтез не прекращается даже в отсутствие кислорода. Помимо ЭТЦ с участием CydAB, экзогенные менахиноны переносят электроны от белковых комплексов, таких как нитратредуктазы и фумаратредуктазы, в процессах анаэробного дыхания у *L. plantarum* (Brooijmans et al., 2009b). Кроме того, менахиноны снижают внутриклеточную концентрацию меди и железа (Rezaïki et al., 2008; Tachon et al., 2009).

Таким образом, молочнокислые бактерии, не способные к синтезу необходимых для восстановления кислорода соединений, используют для активации этого процесса экзогенный гем или, в случае некоторых видов, гем и менахинон (Pedersen et al., 2012; Lin et al., 2016). Активация гемом и/или менахиноном процесса поглощения кислорода уменьшала его негативное воздействие за счет положительной регуляции центрального углеводного и энергетического метаболизма и сохранения оптимального окислительно-восстано-

вительного баланса, что приводило к улучшению роста и повышению аэротолерантности ряда штаммов МКБ (Siciliano et al., 2019).

ДЕЙСТВИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА КЛЕТКИ

Окислительные повреждения клеток. На молекулярном уровне продукты неполного восстановления кислорода или, как их еще называют, активные формы кислорода ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} и H_2O_2) могут вступать в реакции с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами. Супероксид анион-радикал имеет умеренный окислительный потенциал и может взаимодействовать с полифенолами, аскорбатом и катехоламинами, а также с молекулами нуклеиновых кислот (Fridovich, 1998). Кроме того, $O_2^{\cdot-}$, быстро диффундирующий в клетки, повреждает белки, содержащие [Fe-S]-кластеры, например, фумаразу или фумаратредуктазу (Amanatidou et al., 2001). Воздействие H_2O_2 приводит к карбонилированию белков и непосредственному окислению цистеиновых остатков в белковых молекулах, вызывая, таким образом, инактивацию многих ферментов (Storz, Imlay, 1999; Arcanjo et al., 2019). Пероксид водорода также может вступать в реакцию с катионами, такими как Fe^{2+} и Cu^+ , и приводить к образованию OH^{\cdot} по реакции Фентона (Duwat et al., 1995; Fridovich, 1998). Гидроксил-радикал, образуемый в реакции супероксид анион-радикала с пероксидом водорода, является сильным и весьма реакционноспособным окислительным агентом, который может окислять большинство органических соединений и разрывать (а также модифицировать) цепи ДНК и РНК, особенно опасно его воздействие на гемопротеины и липиды (Czapski, 1984; Fridovich, 1998; Kang et al., 2013).

Активные формы кислорода у бифидо- и лактобактерий могут образовываться через НАД(Ф)Н-оксидазные системы (рис. 2). В частности, у *Bifidobacterium bifidum* основным продуцентом H_2O_2 является дигидрооротатдегидрогеназа типа *b*, очищенная из НАДН-оксидазной фракции белков (Satoh et al., 2019), а у *B. longum* ssp. *infantis* аэробное образование H_2O_2 обусловлено НАДФН-оксидазой (Tanaka et al., 2018). Многие виды микроорганизмов, в том числе и МКБ, в ходе эволюции сформировали эффективные и тонко регулируемые антиоксидантные системы защиты, такие, как внутриклеточные окислительно-восстановительные циклы с участием тиолов (глутатиона [GSH] и тиоредоксина [TRX]), ферменты антиоксидантной защиты (каталаза и супероксиддисмутаза, которые играют взаимодополняющую и синергичную роль в биохимических путях удаления АФК) и электрон-транспортные цепи вос-

становления кислорода (с участием гема и/или менахинона). Эти системы защищают клетки от окислительных стрессов, уменьшая потенциальные повреждения макромолекул от АФК, и помогают поддерживать оптимальный окислительно-восстановительный потенциал, что способствует защите клеток и от многочисленных иных стрессовых воздействий в окружающей среде — осмотических, кислотных, температурных и т.д. (Zhang, Li, 2013).

Влияние окислительных стрессов на метаболизм МКБ. Многие последствия влияния кислорода и его активных форм заметны и на метаболическом уровне. Например, *Lc. lactis* в анаэробных условиях способен преобразовывать различные углеводы в молочную кислоту. В этих условиях две молекулы НАДН, полученные в ходе окисления глицеральдегид-3-фосфата, окисляются, чтобы способствовать превращению пирувата в молочную кислоту под действием лактатдегидрогеназы. Соотношение НАДН/НАД⁺ играет определяющую роль в контроле сдвига от молочнокислого к смешанному брожению у *Lc. lactis* (Garrigues et al., 1997). Пируватдегидрогеназный комплекс катализирует восстановление НАД⁺ при окислении пирувата. Функционирование этого пути также подтверждается накоплением ацетата. Кроме того, ацетатный путь производит одну молекулу АТФ, что энергетически выгодно по сравнению с образованием молочной кислоты (Vido et al., 2004; Rezaiki et al., 2008). Таким образом, уменьшение содержания НАДН в клетке коррелирует со снижением образования лактата в условиях дыхания по сравнению с брожением.

При культивировании пробиотических МКБ *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium* spp. в присутствии кислорода (5–21%) образование молочной кислоты клетками *L. acidophilus* уменьшалось с возрастанием концентрации O_2 , как и соотношение лактат/ацетат для бифидобактерий; специфические активности НАДН-оксидазы и НАДН-пероксидазы в аэробных условиях у многих МКБ были существенно выше, чем при анаэробнозе (Talwalkar, Kailasapathy, 2003).

Исследования, проведенные на *L. plantarum*, показали, что, в дополнение к использованию O_2 (через цитохром *bd*-оксидазу), эта бактерия может также использовать фумарат и нитрат в качестве акцепторов электронов. Такое анаэробное дыхание по-прежнему требует гема в качестве кофактора. Инактивация НАДН-дегидрогеназы у *L. plantarum* делает невозможным аэробное дыхание, однако при этом не влияет на анаэробное нитратное дыхание, что говорит о наличии других доноров электронов при анаэробном метаболизме (Pedersen et al., 2012).

Анализируя энергетический метаболизм *Lc. lactis* (рис. 3), можно предположить, что ингибирование молочнокислого брожения (обычно гомо-

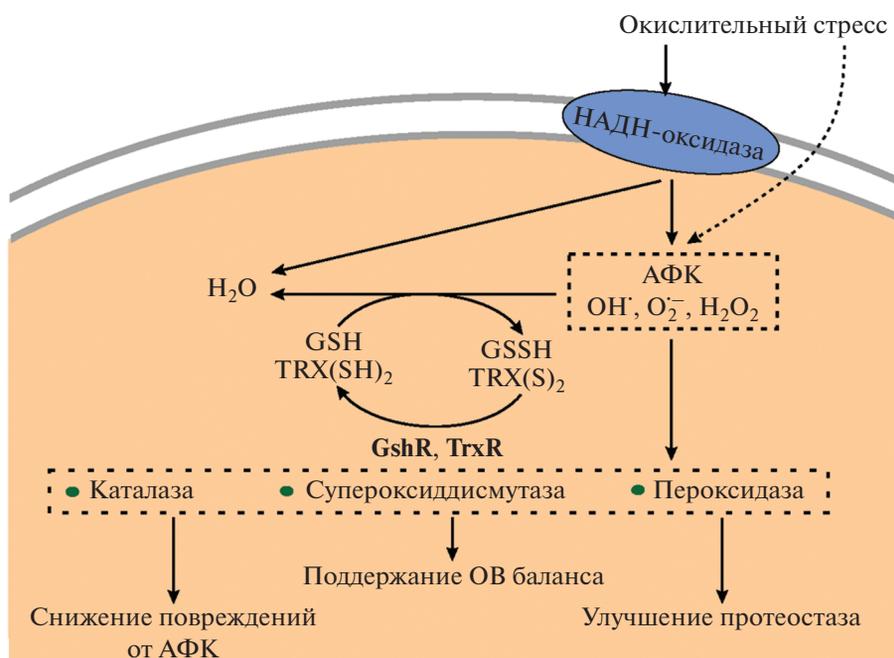


Рис. 2. Антиоксидантные системы в клетках молочнокислых бактерий. АФК – активные формы кислорода, GSH – глутатион, TRX – тиоредоксин (по Zhang, Li, 2013).

ферментативного) в процессе дыхания и в присутствии гема способствует окислению НАДН в цепи переноса электронов с помощью цитохром *bd*-оксидазы (Agioli et al., 2013).

Таким образом, можно сделать вывод, что в аэробных условиях НАДН-оксидаза и НАДН-пероксидаза (см. табл. 2) конкурируют с лактатдегидрогеназой (ЛДГ) в отношении НАДН (Murphy, Condon, 1984). Следовательно, синтез молочной кислоты при аэробнозе уменьшается, и гликолитический поток смещается в сторону продукции ацетата, этанола, ацетоина, диацетила и CO₂ (смешанное брожение) под действием пируватде-

гидрогеназы, пируват-формиат-лиазы и α-ацетоллактатсинтазы (рис. 3).

Эти изменения также приводят к образованию пероксида водорода, который вызывает замедление роста культур *Lc. lactis* и даже их гибель. Концентрация около 0.2 мМ H₂O₂ ингибирует рост этой бактерии на 50%, а концентрации свыше 1.15 мМ могут поставить под угрозу жизнеспособность клеток (Duwat et al., 1999). Хотя НАДН-пероксидаза (табл. 2) способствует уменьшению содержания пероксида водорода в клетках, ее роль в противодействии пероксидным стрессам в целом невелика (в 10–30 раз ниже, чем у НАДН-оксидазы), поэтому высокие концентрации H₂O₂ часто вызывают

Таблица 2. Ключевые ферментативные реакции с участием кислорода у молочнокислых бактерий (по Miyoshi et al., 2003)

Ферментативные реакции	Ферменты
$\text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$	НАДН : H ₂ O ₂ -оксидаза
$2\text{НАДН} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{НАД}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	НАДН : H ₂ O-оксидаза
$\text{Пируват} + \text{фосфат} + \text{O}_2 \rightarrow \text{ацетилфосфат} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	Пируватоксидаза
$\alpha\text{-Глицерофосфат} + \text{O}_2 \rightarrow \text{дигидроксиацетонфосфат} + \text{H}_2\text{O}_2$	α-Глицерофосфатоксидаза
$2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Супероксиддисмутаза
$\text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{НАД}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	НАДН-пероксидаза

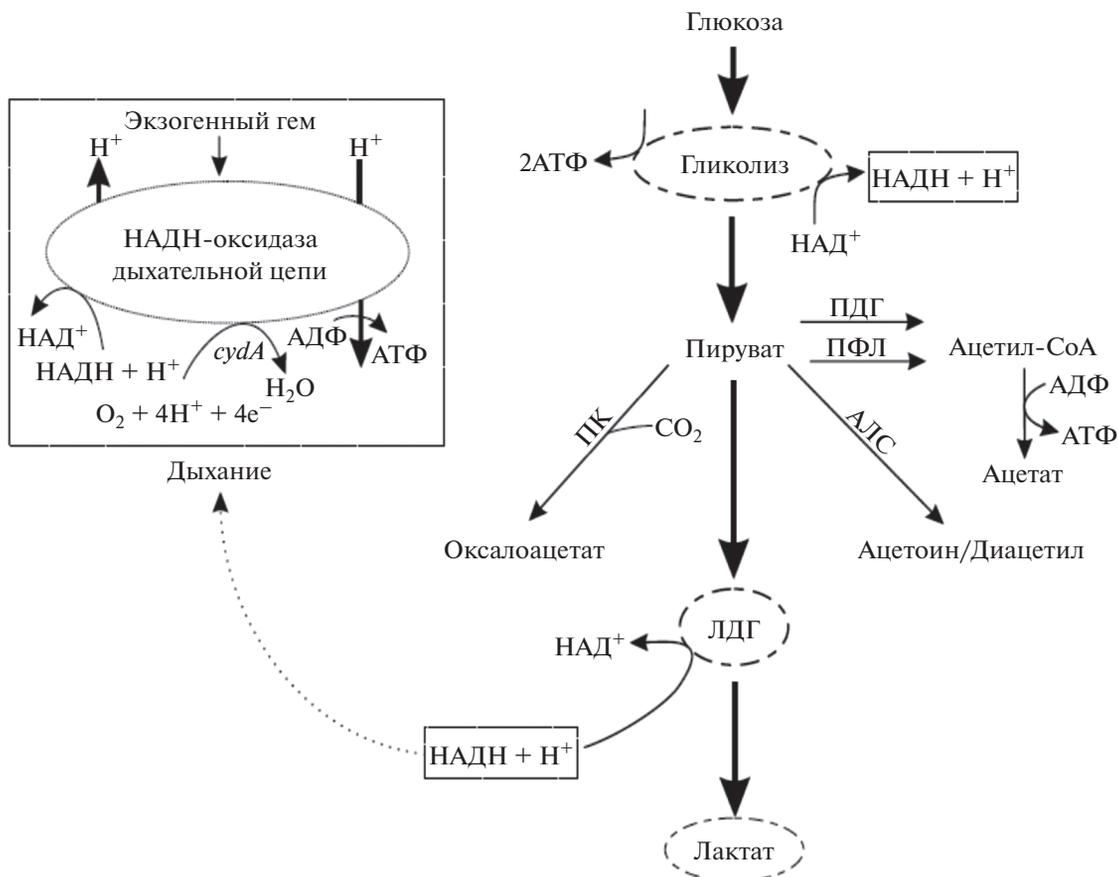


Рис. 3. Упрощенное представление гомоферментативного и гетероферментативного видов молочнокислого брожения и гем-зависимого дыхания у *Lc. lactis* IL1403 (по Arioli et al., 2013). Стрелки показывают метаболические потоки. Глюкоза катаболизируется до пирувата посредством гликолиза с образованием АТФ и НАДН. Регенерация НАД^+ происходит во время зависящего от гема дыхания. Избыток пирувата может метаболизироваться пируватформилтазой (ПФЛ), пируватдегидрогеназой (ПДГ) и ацетолактатсинтазой (АЛС). Также показана анаэробная реакция, катализируемая пируваткарбоксилазой (ПК). Ген субъединицы I цитохромоксидазы обозначен как *cydA*. ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

гибель клеток МКБ (Condon, 1987; Maresca et al., 2018).

В целом, определение метаболитов и анализ метаболических потоков *L. paracasei* показал, что в аэробных условиях метаболизм пирувата переключается с образования молочной кислоты на синтез ацетата для обеспечения процесса роста клеток достаточной энергией при высоких скоростях поглощения кислорода. Когда культуры достигают стационарной фазы роста в таких условиях, происходит значительное подавление поглощения и последующего метаболизма глюкозы из-за накопления в клетках АФК, которые ингибируют ключевой фермент гликолиза – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу; синтез молочной кислоты также продолжает снижаться. Необходимо отметить, что внутриклеточный восстановительный баланс на примере *L. paracasei* сильно зависит от ацетил-КоА (ацетат/этанол) в экспоненциальной фазе

роста и от ацетоина (ацетоин/2,3-бутандиол) в стационарной фазе роста (Tian et al., 2018).

ФЕРМЕНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В КЛЕТКАХ МКБ

НАДН-оксидаза/НАДН-пероксидаза. Наиболее распространенным ферментативным механизмом устойчивости к окислительным стрессам, который был обнаружен у многих МКБ, является наличие в клетках НАДН-оксидазной и НАДН-пероксидазной системы (Condon, 1987). Вначале кислород может удаляться из клеток за счет функционирования НАДН-оксидазы, которая использует O_2 для окисления НАДН в НАД^+ , что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации H_2O_2 . Пероксид водорода, в свою очередь, разлагается НАДН-пероксидазой, и в результате образуется H_2O . Это было показано у аэротолерантных штаммов *L. casei*, обладающих мощной НАДН-перок-

сидазой (Npr), которая играет решающую роль в механизмах противодействия пероксидным стрессам (Naraki et al., 2020).

Было показано, что при высокой скорости гликолиза в аэробной культуре *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 (не имеющей НАДН-пероксидазную активность, но содержащей НАДН-оксидазу) образующийся в качестве конечного продукта гликолиза пируват взаимодействует в ходе ферментативной реакции с пероксидом водорода, образуя ацетат, CO_2 и H_2O (van Niel et al., 2002). Таким образом, это можно рассматривать в качестве альтернативного способа защиты лактококков от внутриклеточного пероксида водорода, накопление которого в культурах резко снижает их скорость роста (Miyoshi et al., 2003).

НАДН-оксидазы (NOX, кодируемые генами *noxE*, *nox2* и/или *nox*), как правило, относятся к флавопротеинам и участвуют в обеспечении аэротолерантности микроаэробных МКБ (Tachon et al., 2010, 2011; Jänsch et al., 2011; Derr et al., 2012). NOX, в основном, отвечает за быстрое удаление кислорода и играет важную роль в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса (Tachon et al., 2010; Naraki et al., 2020).

Было обнаружено, что в делеционных штаммах МКБ по гену *nox* наблюдалось повышенное содержание СОД и глутатионредуктазы. В связи с этим устойчивость к окислительному и кислотному стрессам у таких мутантных штаммов была лучше (Jänsch et al., 2011). Интересно, что действие НАДН-оксидазы связано с использованием клетками сахаров. Мутанты *F. sanfranciscensis* с подавленной экспрессией гена *nox* не росли на питательной среде MRC в аэробных условиях, если в среду дополнительно не добавляли фруктозу (Zhang, Li, 2013).

Супероксиддисмутаза (СОД) является металлоферментом, который катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала в пероксид водорода и молекулярный кислород: $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (McCord, Fridovich, 1969). Существуют четыре типа фермента, которые отличаются по наличию атомов металла в активном центре: железо-содержащие (Fe-СОД), марганец-содержащие (Mn-СОД), медь/цинк-содержащие (Cu/Zn-СОД) и никель-содержащие (Ni-СОД). СОД присутствует у большинства организмов, некоторые бактерии (например, *E. coli*) могут обладать одновременно несколькими типами СОД (Bruno-Bárcena et al., 2004). Подавляющее большинство строго анаэробных микроорганизмов содержат в клетках Fe-СОД. У многих представителей родов *Streptococcus* и *Lactococcus* удаление супероксидного анион-радикала происходит, в основном, за счет функционирования Mn-СОД, однако большинство лактобацилл лишены супероксиддисмутазной актив-

ности (Bruno-Bárcena et al., 2004; Marques Da Silva et al., 2019).

Важная роль СОД в обеспечении выживаемости клеток МКБ в условиях сильных кислородных стрессов была показана, в частности, на *L. sake*. Штамм NCFB 2813, обладавший в 10–20 раз (в зависимости от фазы роста культуры) более высокой активностью СОД по сравнению со штаммом DSM 6333, показывал повышенную скорость роста в присутствии 90% O_2 , а концентрация $\text{O}_2^{\cdot-}$ в цитозоле клеток этого аэротолерантного штамма была в 9–10 раз ниже, чем у кислород-чувствительного (Amanatidou et al., 2001).

Mn-содержащая СОД так же способна обеспечивать дополнительную защиту от пероксидного стресса (Serata et al., 2018). Так, экспрессия гена *sodA*, кодирующего Mn-СОД *S. thermophilus*, в клетках *L. gasseri* и *L. acidophilus* значительно повышала их устойчивость к H_2O_2 (Bruno-Bárcena et al., 2004). Известно, что негативные эффекты пероксида водорода на рост и выживаемость клеток в значительной степени зависят от наличия “свободного” растворимого железа в виде Fe(II), которое может высвобождаться из лабильных [4Fe-4S]-кластеров белков, окисляемых супероксидными радикалами (Flint et al., 1993; Keyer, Imlay, 1996; Bruno-Bárcena et al., 2004). Ион железа Fe^{2+} реагирует с пероксидом водорода с образованием крайне реакционноспособного гидроксил-радикала (OH^{\cdot}) по реакции Фентона. Непрерывное образование OH^{\cdot} требует поступления Fe(II), которое может образовываться также через восстановление Fe(III) с помощью $\text{O}_2^{\cdot-}$, а СОД, удаляя супероксид-радикал, препятствует формированию восстановительного цикла железа (Bruno-Bárcena et al., 2004). Восстановление Fe(III) может также осуществляться за счет различных восстановителей – глутатиона, тиоредоксина, флавоферментов и т.д. (Halliwell, Gutteridge, 1990; Kakhlon, Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2003).

Таким образом, защита клеток молочнокислых бактерий от АФК и их аэротолерантность может быть достигнута: дисмутацией $\text{O}_2^{\cdot-}$ посредством СОД, удалением H_2O_2 благодаря каталазе и/или гидропероксидазе, включением свободного железа в форме Fe(II) в железо-хелатирующий агент или в железо-связывающие белки (например, белок Drg у грамположительных бактерий), наличием белков-протекторов для [Fe-S]-кластеров и функционированием репарационных механизмов для удаления повреждений макромолекул клетки (Bruno-Bárcena et al., 2004).

Каталаза играет важную роль в снижении негативных эффектов пероксидного стресса на клетку путем разложения пероксида водорода в реакции $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Известно два типа

каталаз: гем-зависимые (истинные каталазы) и марганец-содержащие (псевдокаталазы). Активная гем-зависимая каталаза гомотетрамерной структуры обнаружена у многих видов МКБ, но лишь при условии наличия гема или гематина в питательной среде. Каталазам второго типа для проявления активности не требуется наличие гема или гематина, но такие Mn-содержащие каталазы (MnKat), обладающие гексамерной структурой, у молочнокислых бактерий встречаются достаточно редко (Noonpakdee et al., 2004; Glorieux, Calderon, 2017).

Наличие каталазы у промышленных штаммов МКБ является одним из полезных свойств для получения заквасок, используемых в пищевой промышленности (Zotta et al., 2017), однако такая необходимая при производстве многих ферментированных мясных продуктов стартовая культура, как *L. rhamnosus*, не обладает каталазной активностью (An et al., 2010). В связи с этим создано большое количество рекомбинантных штаммов стартовых культур МКБ, устойчивых к длительному аэробно-анаэробному росту. В качестве примера можно привести каталазо-отрицательный штамм *L. plantarum* TISTR850, в котором был клонирован и экспрессирован под сильным промотором ген *katA*, кодирующий гем-зависимую каталазу из *L. sakei* SR911. Полученный рекомбинантный штамм *L. plantarum* с высокой каталазной активностью, сохранявший жизнеспособность в течение 60 ч в условиях аэрации и при дефиците глюкозы, использовали для снижения процесса окисления липидов при хранении ферментированных мясных продуктов (Noonpakdee et al., 2004). Гетерологичная экспрессия гена *katA* из *L. sakei* YSI8 в клетках *L. rhamnosus* приводила к чрезвычайному усилению устойчивости к пероксидному стрессу у рекомбинантного штамма, вплоть до 10^4 раз по сравнению с исходным штаммом для клеток из стационарной фазы роста (An et al., 2010). Аналогичные эксперименты были проведены также на *L. casei* MCJΔ1, трансформированной плазмидами с геном *katE* из *L. plantarum* или *L. brevis*, кодирующим гем-зависимую каталазу. Выживаемость рекомбинантных штаммов при 1-часовой инкубации с 2 мМ H_2O_2 оказалась в 270–300 раз выше, чем у исходного каталазо-отрицательного штамма, а в условиях 96-часовой аэрации культур – в 146–190 раз выше, что свидетельствует о важной роли каталазы в обеспечении аэротолерантности клеток (Lin et al., 2016).

Создание рекомбинантных штаммов лактобацилл с гетерологичной экспрессией негемовой каталазы дает большое преимущество в том, что в этом случае не требуется добавлять гем в питательную среду для синтеза клетками активного фермента. К настоящему времени удалось показать, как можно защитить один вид МКБ от повреждающего воздействия H_2O_2 и повысить устойчивость к

аэрации с помощью синтеза гетерологичной каталазы другим видом-партнером в смешанной культуре. Эти эксперименты были проделаны на смешанных культурах продуцирующей пероксид водорода, но чувствительной к нему *L. bulgaricus*, и *L. casei*, в клетках которой был экспрессирован ген, кодирующий негемовую Mn-содержащую каталазу из *L. plantarum* ATCC 14431 (Rochat et al., 2006).

Аналогичные подходы применяют и в случае бифидобактерий, которые, как правило, чувствительны к различным окислительным стрессам. Так, гетерологичная экспрессия гена *LpKatL*, кодирующего гем-зависимую каталазу у *L. plantarum*, в клетках *Bifidobacterium longum* NCC2705 приводила к быстрому разложению экзогенного H_2O_2 и иных пероксидов, которые образовывались в качестве побочных продуктов при аэробном культивировании (Zuo et al., 2014).

Синтез активной истинной каталазы у некоторых МКБ, как уже указывалось выше, возможен в присутствии экзогенного гема, так как сами МКБ не способны к его синтезу (Noonpakdee et al., 2004; Ricciardi et al., 2018). Но дело в том, что добавление гема в сырье для ферментативных процессов в молочной или мясной промышленности не всегда представляется возможным. Поэтому сегодня все большее применение находят штаммы МКБ, обладающие Mn-содержащей каталазой (Mn-Kat). Этот фермент разлагает H_2O_2 , используя марганец как каталитический редокс-кофактор, таким образом, не испытывая потребности в геме. Субъединицы Mn-содержащих каталаз меньше по размеру, чем таковые у обычных гемовых каталаз (примерно 27 и 60 кДа соответственно), и Mn-Kat более устойчивы к повышенным температурам (Kono, Fridovich, 1983). Важно отметить, что Mn-содержащая каталаза – это цитоплазматический фермент, который не выделяется клетками в культуральную жидкость, и его активность проявляется лишь у штаммов, обладающих высоким внутриклеточным содержанием Mn (Rochat et al., 2006).

Тиоредоксинредуктаза. С помощью фермента тиоредоксинредуктазы (TR) происходит окисление тиоредоксина (TRX) с использованием НАДФН в качестве кофактора. На протяжении многих лет исследований роли тиоредоксина в клеточном метаболизме было выяснено, что он в качестве дисульфидной оксидоредуктазы играет важную роль в различных восстановительных процессах, таких, как антиоксидантная защита клетки, восстановление белков и биосинтез нуклеиновых кислот (Serrano et al., 2007; Lu, Holmgren, 2014; Jastrzab et al., 2021).

Снижение активности тиоредоксинредуктазной и глутатион-редоксиновой систем имеет большое значение для всех живых организмов.

Эти две системы обеспечивают поддержание цитоплазмы в восстановленном состоянии (Scharf et al., 1998). Избыток тиоредоксина у *L. plantarum* WCFSI увеличивал устойчивость клеток к окислительным стрессам, создаваемым пероксидом водорода или диамидом (Serrano et al., 2007).

Анализ полного генома *L. plantarum* WCFSI показал, что тиоредоксинредуктазная система у этого микроорганизма состоит из шести открытых рамок считывания. Непосредственно тиоредоксинредуктазу кодируют четыре гена из шести: *trxA1* (lp_0236), *trxA2* (lp_2270), *trxA3* (lp_3437) и *trxH* (lp_2633). Два других гена, *trxB1* (lp_0761) и *trxB2* (lp_2585), определены, соответственно, как кодирующие тиоредоксин и нуклеотид-дисульфид-оксидоредуктазу. Эти шесть генов распределены по геному и высоко консервативны у всех исследуемых штаммов *L. plantarum*, независимо от их местообитаний (Molenaar et al., 2005).

Было показано, что уровни транскрипции гена *gapB* (гликолитический ген, участвующий в энергетическом метаболизме) и активность глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГАФДГ – ключевого фермента гликолиза по своему месторасположению в пути и по количеству связанных с ним регуляторных взаимодействий) у *L. plantarum* возрастали в несколько раз при сверхэкспрессии гена *trxB1* в условиях перексидного стресса (Serrano et al., 2007). Эта способность предотвращает окисление белка GapB и поддерживает синтез активной формы ГАФДГ. Вероятно, усиленный синтез тиоредоксина у *L. plantarum* WCFSI защищает ГАФДГ в условиях окислительных стрессов, вызываемых пероксидами. Тиоредоксинредуктазная система (гены *trxA2* и *trxB1*) у *L. plantarum* WCFSI индуцируется именно пероксидными стрессами и является ключевой в антиоксидантной защите у этого штамма (Serrano et al., 2007).

Исследования, проведенные ван Нилем и соавт. (van Niel et al., 2002), показали, что ГАФДГ у *L. lactis* действительно является наиболее чувствительным для окислительных стрессов (в частности, при обработке клеток 2.2 мМ H₂O₂) белком из всех ферментов гликолиза.

Также тиоредоксинредуктаза была обнаружена в клетках типового вида рода *Bifidobacterium* – *B. bifidum*, способной к микроаэробному росту (при 5% O₂), но из-за накопления H₂O₂ прекращающей рост при концентрациях кислорода свыше 10%. Экспрессия гена, кодирующего эту тиоредоксинредуктазу, индуцировалась кислородом. Интересно, что разложение H₂O₂ у данной бифидобактерии происходило с участием системы тиоредоксинредуктаза–алкилгидропероксидредуктаза (Satoh et al., 2019).

Другие белки МКБ, вовлеченные в окислительные стрессы. Еще одним механизмом обеспечения

стрессоустойчивости клеток МКБ является поддержание активности белка RecA. Этот белок широко распространен у бактерий, например, в клетках *E. coli*, где он играет ключевую роль в SOS-ответах и гомологичной рекомбинации (Miller, Kokjohn, 1990; Walker, 1996). На мутантном штамме *Lc. lactis* с введенным геном *recA* было показано, что RecA обеспечивает устойчивость к окислительному и термическому воздействиям (Dawat et al., 1995). В отсутствие активности RecA гидроксил-радикалы, образующиеся в реакции Фентона, вызывали в ДНК необратимые повреждения (Miyoshi et al., 2003).

Lactobacillus helveticus, часто применяемая в качестве закваски в молочной промышленности, относится к термотолерантным молочнокислым бактериям, которые не требуют строго анаэробных условий для роста и получают большую часть энергии, осуществляя молочнокислое брожение (Guerzoni et al., 2001). Хотя в присутствии кислорода эти бактерии и образуют пероксид водорода в реакции с НАДН, тем самым уменьшая внутриклеточную концентрацию молекулярного O₂, в их клетках не было обнаружено активностей ключевых ферментов антиоксидантной защиты, таких, как СОД или каталаза (Cappa et al., 2005). Однако клетками *Lactobacillus helveticus* были выработаны различные способы защиты генома, и одним из наиболее важных является нуклеотид-эксцизионная репарация ДНК при различных стрессовых воздействиях (Goosen, Moolenaar, 2001; Cappa et al., 2005).

Белки эндонуклеазного эксцизионного комплекса UvrABC определяют и разрезают поврежденную ДНК в многоступенчатой реакции, обладая способностью восстанавливать единичные одноосновные модификации, массивные нуклеотидные аддукты, нековалентные модификации, а также внутри- и межнитевые кросс-связи (Cappa et al., 2005). Анализ транскрипции гена *uvrA*, кодирующего субъединицу А эндонуклеазы эксцизии, показал, что воздействие на клетки низкого pH 5.0 или 2.6 мМ H₂O₂ индуцирует резкое увеличение экспрессии гена *uvrA* через 15 мин после начала стресса, и этот высокий уровень экспрессии поддерживается, по крайней мере, в течение 80 мин, обеспечивая устойчивость *L. helveticus* к кислотным и окислительным стрессам (Cappa et al., 2005).

Кроме того, у *L. helveticus* в ответ на пероксидный и температурный стрессы активируется десатуразная система, поглощающая кислород и повышающая содержание ненасыщенных жирных кислот в клеточной мембране, что защищает клетки от токсичных активных форм кислорода и высоких температур (Guerzoni et al., 2001).

В опытах с делеционным по гену *rpoN* (кодирует альтернативный σ-фактор 54) штаммом *L. plantarum*

было показано, что его чувствительность к пероксиду водорода возросла в 100 раз по сравнению с исходным штаммом. Это связано со снижением экспрессии маннозного оперона фосфотрансферазной системы (ФТС), регулируемой, в частности, σ^{54} и необходимой, в том числе, для получения клеткой энергии при формировании адаптивного ответа на воздействие пероксидов (Stevens et al., 2010).

Интересный механизм антиоксидантной защиты, включающий транспортные белки цистина ABC (кодируются генным кластером *суuABC*) и цистатионин γ -лиазу (кодируется геном *cgl*), был показан для нескольких штаммов *L. reuteri*: при поглощении экзогенного цистина с помощью белка-транспортера СуuС клетки в аэробных условиях секретируют большое количество восстановительных эквивалентов, представлявших собой тиолы, включая H_2S как продукт разложения цистина и мощный антиоксидант цистеин (Lo et al., 2009). Протеомный анализ *L. acidophilus* выявил, что в условиях пероксидного стресса в клетках резко возрастает содержание цистеинсинтазы, необходимой для формирования пула цистеина, обеспечивающего стабильность белков, протекание метаболических реакций и функционирование пути восстановления дисульфидов; также в клетках возрастало содержание ферментов репарации ДНК и белков с цистеиновыми остатками в активном центре (Calderini et al., 2017).

ХИМИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ И ВЕЩЕСТВА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ АНТИОКСИДАНТНУЮ ЗАЩИТУ В КЛЕТКАХ МКБ

Глутатион (GSH) – наиболее распространенный и обнаруженный почти у всех живых организмов (Allocati et al., 2012), в том числе и у МКБ (например, у *Lc. lactis*, *L. fermentum* ME-3; Kullisaar et al., 2010), небелковый тиол. Он играет важную роль в ответах на многие стрессы (окислительные, кислотные, осмотические), защищая клетку от свободных радикалов и определяя редокс-статус внутриклеточной среды (Kim et al., 2012).

Сравнительный протеомный анализ с использованием клеток *Lc. lactis* SK11, выращенных с добавлением и без добавления глутатиона, показал, что он стабилизировал ферменты гликолиза, что и объясняло устойчивость клеток *Lc. lactis* SK11 с высоким содержанием глутатиона к различным стрессам. Это свидетельствует о том, что глутатион может эффективно использоваться в качестве универсального защитного химического вещества для улучшения выживаемости и сохранности молочных заквасочных культур (Zhang, Li, 2013; Al-Madboly et al., 2020).

Помимо защиты клеток МКБ от неблагоприятных воздействий глутатион способствует усилению роста культур *Ligilactobacillus salivarius* (Lee et al., 2010) или может быть использован в качестве источника серы, как в случае *L. reuteri* (Lee et al., 2011; Zhang, Li, 2013).

Глутатион синтезируется в клетке либо с помощью двух ферментов, осуществляющих последовательные реакции (глутамин-цистеин-синтетазы и глутатионсинтетазы), либо путем использования бифункционального фермента глутамат-цистеин-лигазы/глутатионсинтетазы (Allocati et al., 2012; Pophaly et al., 2017; Xiong et al., 2018).

Гомологи глутатионредуктазы (GshR) широко представлены в клетках МКБ и являются важными компонентами GSH-зависимых окислительно-восстановительных систем. У *L. plantarum* было найдено две глутатионредуктазы, которые защищали клетки от воздействия солей желчных кислот (Hamon et al., 2011). Инактивация гена *gshR* увеличивала накопление дисульфида глутатиона (GSSG) и приводила к снижению устойчивости клеток *F. sanfranciscensis* к окислительным стрессам (Jansch et al., 2007).

Предшественники глутатиона (цистеин и γ -глутамилцистеин) также участвуют в антиоксидантной защите. При использовании экзогенного цистеина возможен аэробный рост *F. sanfranciscensis* с инактивированной глутатионредуктазой (Jansch et al., 2007; Zhang, Li, 2013).

Марганец как антиоксидантный агент в клетках МКБ. Как было сказано выше, у некоторых представителей лактобацилл, в частности, у *L. plantarum*, отсутствует истинная СОД. Но, несмотря на это, данный микроорганизм обладает аэротолерантностью при росте на глюкозе, а при росте на многоатомных спиртах вообще является облигатным аэробом. Защита от токсического эффекта O_2 связана, вероятно, с активным процессом аккумуляции $Mn(II)$ в клетках. Многие представители МКБ проявляют достаточно высокие ростовые потребности к марганцу, который не является необходимым элементом для других гетеротрофных бактерий (Serata et al., 2018). Рост *L. plantarum* в Mn -дефицитной питательной среде приводил к формированию клеток, которые обладали повышенной чувствительностью к O_2 (Archibald, Fridovich, 1981a).

Необычно высокая внутриклеточная концентрация $Mn(II)$ не является единственной интересной особенностью *L. plantarum* и, возможно, родственных ей лактобактерий. В частности, у *L. plantarum* отсутствует потребность в железе. Таким образом, у данной МКБ не происходит образование пероксида водорода в реакциях типа Фентона и Габера–Вейса. Этот факт, в дополнение к значительному содержанию Mn (~9 мкг/мг белка в экстрактах клеток), может объяснять высокую

устойчивость к кислороду *L. plantarum*, не обладающей активностью СОД (Archibald, Fridovich, 1981a). В ходе так называемого дыхательного роста (аэробноз в присутствии гема и витамина К₂ в качестве источника менахинона) с внесением марганца в питательную среду культуры *L. plantarum* достигали наибольшего выхода биомассы (Watanabe et al., 2012).

К внутриклеточному аккумулярованию марганца, эффективно удаляющего супероксид-анионы при аэробном росте, способны и представители группы *L. casei* – *L. paracasei*. За поглощение марганца у них отвечает система многочисленных Mn-транспортных белков NRAMР-типа (кодируемых генами *mntH1* и *mntH2*) и АВС-типа (кодируемых кластером *mtsCBA*), подверженных общей регуляции (Serata et al., 2018).

Необходимо отметить, что большинство штаммов молочнокислых бактерий, которые аккумуляровали высокие внутриклеточные уровни Mn(II), были лишены активности истинной СОД, хотя и были способны к росту при аэробнозе. Напротив, те лактобациллы, которые обладали СОД-активностью и лучше росли в аэробных условиях, чем в анаэробных, не содержали в клетках Mn(II) в высоких концентрациях (Kono et al., 1976; Archibald, Fridovich, 1981b; Serata et al., 2018). Это говорит о том, что марганец в миллимолярных концентрациях в клетках МКБ может заменять собой СОД и служит для эффективного удаления эндогенного супероксид-аниона, обеспечивая определенный уровень аэротолерантности клеток. Это происходит благодаря взаимодействию супероксид-аниона с марганцем и окислению последнего. В присутствии пирофосфатов (нуклеозидтрифосфаты, динуклеотидные коферменты) трехвалентный марганец стабилизируется и может накапливаться в клетке. В отсутствие таких стабилизирующих хелатирующих агентов образуется MnO²⁺, который тут же распадается на MnO₂, Mn(II) и O₂ (Kono et al., 1976).

По всей видимости, замена функции СОД высокими, вплоть до 25 мМ, концентрациями Mn(II) у ряда штаммов аэротолерантной *L. plantarum* является адаптацией к существованию в растительном материале, т.к. у штаммов *L. plantarum*, обитающих в молочных продуктах, не было выявлено высокой внутриклеточной концентрации данного металла (Archibald, Fridovich, 1981b).

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И МЕДИЦИНЕ

Активные формы кислорода могут вызывать окислительные повреждения макромолекул клетки, а иногда непосредственно приводят к гибели клеток

(Kehrer, 1993). Такие болезни, как атеросклероз, различные онкологические заболевания, ожирение, эмфизема, цирроз печени, артрит, болезнь Крона, воспалительные заболевания ЖКТ и др. напрямую соотносятся с окислительными повреждениями клеток соответствующих тканей (Kehrer, 1993; Grajek et al., 2005; LeBlanc et al., 2011; Basu Thakur et al., 2019; Vasquez et al., 2019; Kim et al., 2021). Таким образом, токсическое воздействие АФК играет значимую патологическую роль. Надо также принимать во внимание, что такие окислители, как пероксид водорода и хлорноватистая кислота, вырабатываются врожденной иммунной системой в качестве антимикробных агентов в процессе воспаления (Basu Thakur et al., 2019).

Прием пищи, в состав которой входят антиоксидантные добавки, может уменьшить уровень АФК в тканях и значительно снизить риск окислительных повреждений организма человека и животных. Наиболее известными антиоксидантами являются аскорбиновая кислота (витамин С), токоферол (витамин Е), β-каротин (провитамин А), холекальциферол (витамин D₃), кофермент Q₁₀, каротиноидный пигмент ликопин. К природным антиоксидантам также относят полифенолы – флавины и флавоноиды (часто встречаются в овощах), танины (присутствуют в какао, кофе, чае), антоцианы (присутствуют в красных ягодах), линолевую кислоту (входит в состав многих растительных масел и животных жиров), белковые фракции (в особенности, содержащие казеин, лактоферрин).

Молочнокислые бактерии являются идеальными объектами для доставки ферментов антиоксидантной защиты (в частности, СОД и каталазы) в желудочно-кишечный тракт для предотвращения или лечения различных воспалительных патологических процессов в нем (LeBlanc et al., 2011). Показано, что пробиотическая МКБ *L. reuteri*, колонизирующая кишечник, обладает сложными регуляторными системами ответа на различные окислительные стрессы, которых нет у *E. coli* и других энтеробактерий и которые включают, в частности, белок теплового шока Lo18, полифосфаткиназу 2 и уникальный регуляторный белок RsiR (Basu Thakur et al., 2019).

К настоящему времени доказано, что антиканцерогенными, антимикробными, гиполипидемическими, иммуномодуляторными и антиоксидантными свойствами обладают живые клетки и экстракты клеток многих штаммов МКБ, а также, в некоторых случаях, их фракции растворимых экзополисахаридов (Choi et al., 2006; Gao et al., 2013; Guo et al., 2013; Li et al., 2014; Yamamoto et al., 2019; Даниленко и соавт., 2020; Marsova et al., 2020).

L. plantarum С88, выделенная из тофу (традиционного китайского ферментированного пищевого продукта из соевых бобов) и обладающая повышен-

ной ингибиторной активностью в отношении гидроксил-радикала и высокой устойчивостью к пероксиду водорода, предложена как эффективный пробиотик-антиоксидант, в частности, ингибирующий перекисное окисление липидов (Li et al., 2012). Введение клеток штаммов *L. plantarum* C88 и MA2 (Li et al., 2012; Tang et al., 2016) или *L. brevis* MG000874 (Noureen et al., 2019) старым мышам, подвергнутым индуцированному D-галактозой окислительному стрессу, приводило к значительному усилению активностей каталазы, СОД и глутатионпероксидазы в сыворотке крови и клетках печени мышей, восстанавливая антиоксидантный статус организма. Пробиотические йогурты и ферментированное молоко, в особенности, содержащие клетки *L. casei* и *L. acidophilus*, обладают высоким антиоксидантным потенциалом за счет высвобождения антиоксидантных пептидов в процессе протеолиза (Fardet, Rock, 2018).

Недавними исследованиями было показано, что *Limosilactobacillus frumenti* увеличивает активности ряда антиоксидантных ферментов и снижает общий уровень активных форм кислорода за счет активации NO-синтазы 1 в эпителиальных клетках тонкого кишечника млекопитающих (Nie et al., 2019). Пробиотические препараты на основе *Lactobacillus gasseri* усиливают защиту от окислительных стрессов, активируя в клетках млекопитающих редокс-чувствительную сигнальную систему Nrf2/ARE (Kobatake et al., 2017).

МКБ являются неотъемлемой частью микробиоты ЖКТ человека и играют значимую роль для здоровья хозяина. Пробиотические штаммы, ограничивающие накопление чрезмерного количества активных радикалов в тканях хозяина, могут способствовать предотвращению либо контролю заболеваний, связанных с различными окислительными стрессами. Таким образом, с помощью пробиотических бактериальных штаммов появляется возможность повысить уровень клеточной антиоксидантной защиты хозяина (Guo et al., 2013; Tang et al., 2016). Стоит напомнить, что антиоксидантные активности (ферментативное удаление АФК, ингибирование перекисного окисления липидов и т.д.) являются, как правило, штаммоспецифичными, поэтому для использования МКБ в качестве максимально эффективных медицинских или ветеринарных пробиотических добавок нужно предварительно проводить комплексные исследования большой коллекции штаммов по выявлению необходимых свойств *in vitro* и оценке их потенциала в профилактике и лечении заболеваний *in vivo* (Noureen et al., 2019; Poluektova et al., 2021).

Результаты последних исследований свидетельствуют о новых перспективах в использовании пробиотических штаммов МКБ в качестве защитных компонентов в желудочно-кишечной

микробной экосистеме для снижения негативных эффектов и последствий окислительных стрессов, а также для оздоровления не только ЖКТ, но и печени, почек, плазмы крови и повышения общего уровня антиоксидантного статуса организма хозяина (Li et al., 2014; Yamamoto et al., 2019; Даниленко и соавт., 2020; Marsova et al., 2020). Кроме того, аэротолерантные МКБ в качестве стартовых культур улучшают органолептические свойства ферментированных продуктов (в частности, за счет образования летучих соединений в процессе аэробного роста) и значительно повышают их рекомендуемые сроки хранения. В целом, антиоксидантные эффекты пробиотиков чрезвычайно широки – от быстрого биохимического удаления высокореакционноспособных активных форм кислорода до индуцирования через различные регуляторные и сигнальные молекулы цитопротекторной и иммунной системы организма хозяина (Guo et al., 2013; Feng, Wang, 2020; Averina et al., 2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Аэротолерантность строго анаэробных микроорганизмов: факторы защиты от окислительного стресса (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. С. 637–654.
- Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: a review // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. P. 567–582.
- Даниленко В.Н., Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Гущина А.С., Марсова М.В., Ямщикова Н.Г., Ольшанский А.С., Иванов М.В., Иллариошкин С.Н. Использование фармабиотика на основе штамма *Lactobacillus fermentum* U-21 с целью модуляции нейродегенеративного процесса при экспериментальном паркинсонизме // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2020. Т. 14. № 1. С. 62–69.
- Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and *Archaea* // Biochimie. 2012. V. 94. P. 588–596.
- Al-Madboly L.A., Ali S.M., Fakharany E.M.E., Ragab A.E., Khedr E.G., Elokely K.M. Stress-based production, and characterization of glutathione peroxidase and glutathione s-transferase enzymes from *Lactobacillus plantarum* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. P. 78.
- Amanatidou A., Bennik M.H.J., Gorris L.G.M., Smid E.J. Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sakei* upon exposure to elevated oxygen // Arch. Microbiol. 2001. V. 176. P. 79–88.
- Amaretti A., di Nunzio M., Pompei A., Raimondi S., Rossi M., Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. P. 809–817.
- An H., Zhou H., Huang Y., Wang G., Luan C., Mou J., Luo Y., Hao Y. High-level expression of heme-dependent catalase gene *kata* from *Lactobacillus sakei* protects *Lactobacillus*

- rhamnosus* from oxidative stress // *Mol. Biotechnol.* 2010. V. 45. P. 155–160.
- Arcanjo N.O., Andrade M.J., Padilla P., Rodríguez A., Madruga M.S., Estévez M. Resveratrol protects *Lactobacillus reuteri* against H₂O₂-induced oxidative stress and stimulates antioxidant defenses through upregulation of the *dhaT* gene // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. V. 135. P. 38–45.
- Archibald F.S., Fridovich I. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum* // *J. Bacteriol.* 1981a. V. 145. P. 442–451.
- Archibald F.S., Fridovich I. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria // *J. Bacteriol.* 1981b. V. 146. P. 928–936.
- Arioli S., Zambelli D., Guglielmetti S., De Noni I., Pedersen M.B., Pedersen P.D., Dal Bello F., Mora D. Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenase // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 376–380.
- Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic lactobacilli and bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // *Biomedicines.* 2021. V. 9. P. 1340.
- Basu Thakur P., Long A.R., Nelson B.J., Kumar R., Rosenberg A.F., Gray M.J. Complex responses to hydrogen peroxide and hypochlorous acid by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // *mSystems.* 2019. V. 4. P. e00453–19.
- Brooijmans R.J.W., de Vos W.M., Hugenholtz J. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chains // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009a. V. 75. P. 3580–3585.
- Brooijmans R., Smit B., Santos F., van Riel J., de Vos W.M., Hugenholtz J. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria // *Microb. Cell Fact.* 2009b. V. 8. P. 28.
- Bruno-Bárcena J.M., Andrus J.M., Libby S.L., Klaenhammer T.R., Hassan H.M. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 4702–4710.
- Calderini E., Celebioglu H.U., Villarroel J., Jacobsen S., Svensson B., Pessione E. Comparative proteomics of oxidative stress response of *Lactobacillus acidophilus* NCFM reveals effects on DNA repair and cysteine *de novo* synthesis // *Proteomics.* 2017. V. 17. № 5. P. 1600178.
- Cappa F., Cattivelli D., Cocconcelli P.S. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156 // *Res. Microbiol.* 2005. V. 156. P. 1039–1047.
- Choi S.S., Kim Y., Han K.S., You S., Oh S., Kim S.H. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2006. V. 42. P. 452–458.
- Chooruk A., Piwat S., Teanpaisan R. Antioxidant activity of various oral *Lactobacillus* strains // *J. Appl. Microbiol.* 2017. V. 123. P. 271–279.
- Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen // *FEMS Microbiol. Rev.* 1987. V. 46. P. 269–280.
- Czapski G. Reaction of OH[•] // *Methods Enzymol.* 1984. V. 105. P. 209–215.
- De Angelis M., Gobbetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review // *Proteomics.* 2004. V. 4. P. 106–122.
- Derr A.M., Faustoferri R.C., Betzenhauser M.J., Gonzalez K., Marquis R.E., Quivey R.G., Jr. Mutation of the NADH oxidase gene (*nox*) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 1215–1227.
- Duwat P., Ehrlich S.D., Gruss A. Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis* // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 31. P. 845–858.
- Duwat P., Ehrlich S.D., Gruss A. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress // *Mol. Microbiol.* 1995. V. 17. P. 1121–1131.
- Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubière P., Gruss A. Respiratory capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 4509–4516.
- Fardet A., Rock E. *In vitro* and *in vivo* antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence // *Nutr. Res. Rev.* 2018. V. 31. P. 52–70.
- Feng T., Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review // *Gut Microbes.* 2020. V. 12. P. 1801944.
- Flint D.H., Tuminello J.F., Emptage M.H. The inactivation of Fe-S clusters containing hydro-lyases by superoxide // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 22369–22376.
- Frankenberg L., Brugna M., Hederstedt L. *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 6351–6356.
- Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation // *J. Exp. Biol.* 1998. V. 201. P. 1203–1209.
- Gao D., Gao Z., Zhu G. Antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* via activation of transcription factor Nrf2 // *Food Funct.* 2013. V. 4. P. 982–989.
- Garrigues C., Loubiere P., Lindley N. D., Coccagn-Bousquet M. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 5282–5287.
- Gaudu P., Lamberet G., Poncet S., Gruss A. CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis* // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 50. P. 183–192.
- Glorieux C., Calderon P.B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach // *Biol. Chem.* 2017. V. 398. P. 1095–1108.
- Goosen N., Moolenaar G.F. Role of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during nucleotide excision repair // *Res. Microbiol.* 2001. V. 152. P. 401–409.
- Grajek W., Olejnik A., Sip A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods // *Acta Biochim. Pol.* 2005. V. 52. P. 665–671.

- Guerzoni M.E., Lanciotti R., Cocconcelli P.S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus* // Microbiology (SGM). 2001. V. 147. P. 2255–2264.
- Guidone A., Ianniello R.G., Ricciardi A., Zotta T., Parente E. Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group // World J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 29. P. 1713–1722.
- Guo Y., Pan D., Li H., Sun Y., Zeng X., Yan B. Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* // Food Chem. 2013. V. 138. P. 84–89.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview // Methods Enzymol. 1990. V. 186. P. 1–85.
- Hamon E., Horvatovich P., Izquierdo E., Bringel F., Marchioni E., Aoudé-Werner D., Ennahar S. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance // BMC Microbiol. 2011. V. 11. P. 63.
- Ianniello R.G., Zotta T., Matera A., Genovese F., Parente E., Ricciardi A. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87 // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0164065.
- Jansch A., Freiding S., Behr J., Vogel R.F. Contribution of the NADH-oxidase (Nox) to the aerobic life of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T // Food Microbiol. 2011. V. 28. P. 29–37.
- Jansch A., Korakli M., Vogel R.F., Ganzle M.G. Glutathione reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T: contribution to oxygen tolerance and thiol exchange reactions in wheat sourdoughs // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 4469–4476.
- Jastrzab A., Skrzydlewska E. Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2021. V. 36. P. 362–371.
- Kakhlon O., Cabantchik Z.I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes // Free Radic. Biol. Med. 2002. V. 33. P. 1037–1046.
- Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria // Antonie van Leeuwenhoek. 1983. V. 49. P. 209–224.
- Kang T.S., Korber D.R., Tanaka T. Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance systems in *Lactobacillus panis* PM1 // AMB Express. 2013. V. 3. P. 10.
- Kehrer J.P. Free-radicals as mediators of tissue-injury and disease // Crit. Rev. Toxicol. 1993. V. 23. P. 21–48.
- Keyer K., Imlay J.A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free iron // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 13635–13640.
- Kim J.E., Eom H.J., Kim Y., Ahn J.E., Kim J.H., Han N.S. Enhancing acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* with glutathione // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. P. 683–687.
- Kim K.T., Kim J.W., Kim S.I., Kim S., Nguyen T.H., Kang C.H. Antioxidant and anti-inflammatory effect and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from canine and feline feces // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 1971.
- Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2020. V. 12. № 3. P. 1139–1148.
- Kobatake E., Nakagawa H., Seki T., Miyazaki T. Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against oxidative stress // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0177106.
- Kono Y., Fridovich I. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum* // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 6015–6019.
- Kono Y., Takahashi M.-A., Asada K. Oxidation of manganese pyrophosphate by superoxide radicals and illuminated spinach chloroplasts // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 174. P. 454–462.
- Kullisaar T., Songisepp E., Aunapuu M., Kilk K., Arend A., Mikelsaar M., Rehema A., Zilmer M. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 481–486.
- Kumar S., Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human // Toxicol. Lett. 2005. V. 157. P. 175–188.
- LeBlanc J.G., del Carmen S., Miyoshi A., Azevedo V., Sesma F., Langella P., Bermúdez-Humarán L.G., Watterlot L., Perdigon G., de Moreno de LeBlanc A. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice // J. Biotechnol. 2011. V. 151. P. 287–293.
- Lechardeur D., Fernandez A., Robert B., Gaudu P., Trieu-Cuot P. The 2-cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase *c* binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae* // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 16032–16041.
- Lee K., Kim H.J., Rho B.S., Kang S.K., Choi Y.J. Effect of glutathione on growth of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 423–426.
- Lee K., Pi K., Kim E.B., Rho B.S., Kang S.K., Lee H.G., Choi Y.J. Glutathione-mediated response to acid stress in the probiotic bacterium, *Lactobacillus salivarius* // Biotechnol. Lett. 2010. V. 32. P. 969–972.
- Li S., Huang R., Shah N.P., Tao X., Xiong Y., Wei H. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315 // J. Dairy Sci. 2014. V. 97. P. 7334–7343.
- Li S., Zhao Y., Zhang L., Zhang X., Huang L., Li D., Niu C., Yang Z., Wang Q. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods // Food Chem. 2012. V. 135. P. 1914–1919.
- Lin J., Zou Y., Cao K., Ma C., Chen Z. The impact of heterologous catalase expression and superoxide dismutase overexpression on enhancing the oxidative resistance in *Lactobacillus casei* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 43. P. 703–711.
- Lo R., Turner M.S., Barry D.G., Sreekumar R., Walsh T.P., Giffard P.M. Cystathionine γ -lyase is a component of cystine-mediated oxidative defense in *Lactobacillus reuteri* BR11 // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 1827–1837.

- Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 66. P. 75–87.
- Maresca D., Zotta T., Mauriello G. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 157.
- Marques Da Silva W., Oliveira L.C., Soares S.C., Sousa C.S., Tavares G.C., Resende C.P., Pereira F.L., Ghosh P., Figueiredo H., Azevedo V. Quantitative proteomic analysis of the response of probiotic putative *Lactococcus lactis* NCD0 2118 strain to different oxygen availability under temperature variation // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 759.
- Marsova M., Poluektova E., Odorskaya M., Ambaryan A., Revishchin A., Pavlova G., Danilenko V. Protective effects of *Lactobacillus fermentum* U-21 against paraquat-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* and mouse models // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 36. P. 104.
- McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein) // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 6049–6055.
- Miller R.V., Kokjohn T.A. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance // *Annu. Rev. Microbiol.* 1990. V. 44. P. 365–394.
- Miyoshi A., Rochat T., Grataudoux, J.J., Le Loir Y., Oliveira S.C., Langella P., Azevedo V. Oxidative stress in *Lactococcus lactis* // *Genet. Mol. Res.* 2003. V. 2. P. 348–359.
- Molenaar D., Bringel F., Schuren F.H., de Vos W.M., Siezen R.J., Kleerebezem M. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 6119–6127.
- Murphy M.G., Condon S. Comparison of aerobic and anaerobic growth of *Lactobacillus plantarum* in a glucose medium // *Arch. Microbiol.* 1984. V. 138. P. 49–53.
- Naraki S., Igimi S., Sasaki Y. NADH peroxidase plays a crucial role in consuming H₂O₂ in *Lactobacillus casei* IGM394 // *Biosci. Microbiota Food Health.* 2020. V. 39. P. 45–56.
- Nie Y., Hu J., Hou Q., Zheng W., Zhang X., Yang T., Ma L., Yan X. *Lactobacillus frumenti* improves antioxidant capacity via nitric oxide synthase 1 in intestinal epithelial cells // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 10705–10716.
- Noonpakdee W., Sitthimonchai S., Panyim S., Lertsiri S. Expression of the catalase gene *katA* in starter culture *Lactobacillus plantarum* TISTR850 tolerates oxidative stress and reduces lipid oxidation in fermented meat product // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 95. P. 127–135.
- Noureen S., Riaz A., Arshad M., Arshad N. *In vitro* selection and *in vivo* confirmation of the antioxidant ability of *Lactobacillus brevis* MG000874 // *J. Appl. Microbiol.* 2019. V. 126. P. 1221–1232.
- Pedersen M.B., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M.A., Gruss A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012. V. 3. P. 37–58.
- Petrat F., Paluch S., Dogruöz E., Dörfler P., Kirsch M., Korth H.G., Sustmann R., Groot de H. Reduction of Fe(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes *in vitro*: implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 46403–46413.
- Pittman M.S., Robinson H.C., Poole R.K. A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 32254–32261.
- Poluektova E., Yunes R., Danilenko V. The putative antidepressant mechanisms of probiotic bacteria: relevant genes and proteins // *Nutrients.* 2021. V. 13. P. 1591.
- Pophaly S.D., Poonam S., Pophaly S.D., Kapila S., Nanda D.K., Tomar S.K., Singh R. Glutathione biosynthesis and activity of dependent enzymes in food-grade lactic acid bacteria harbouring multidomain bifunctional fusion gene (*gshF*) // *J. Appl. Microbiol.* 2017. V. 123. P. 194–203.
- Pridmore R.D., Pittet A.C., Praplan F., Cavadini C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 283. P. 210–215.
- Rezaïki L., Lamberet G., Derré A., Gruss A., Gaudu P. *Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed Group B *Streptococcus* to activate respiration growth // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 67. P. 947–957.
- Ricciardi A., Ianniello R.G., Parente E., Zotta T. Factors affecting gene expression and activity of heme- and manganese-dependent catalases in *Lactobacillus casei* strains // *Int. J. Food Microbiol.* 2018. V. 280. P. 66–77.
- Ricciardi A., Zotta T., Ianniello R.G., Boscaino F., Matera A., Parente E. Effect of respiratory growth on the metabolite production and stress robustness of *Lactobacillus casei* N87 cultivated in cheese whey permeate medium // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 851.
- Rochat T., Grataudoux J.-J., Gruss A., Corthier G., Maguin E., Langella P., van de Guchte M. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 5143–5149.
- Satoh T., Todoroki M., Kobayashi K., Niimura Y., Kawasaki S. Purified thioredoxin reductase from O₂-sensitive *Bifidobacterium bifidum* degrades H₂O₂ by interacting with alkyl hydroperoxide reductase // *Anaerobe.* 2019. V. 57. P. 45–54.
- Scharf C., Riethdorf S., Ernst H., Engelmann S., Volker U., Hecker M. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 1869–1877.
- Serata M., Yasuda E., Sako T. Effect of superoxide dismutase and manganese on superoxide tolerance in *Lactobacillus casei* strain Shirota and analysis of multiple manganese transporters // *Biosci. Microbiota Food Health.* 2018. V. 37. P. 31–38.
- Serrano L.M., Molenaar D., Wels M., Teusink B., Bron P.A., de Vos W.M., Smid E.J. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFSI // *Microb. Cell Fact.* 2007. V. 6. P. 29.
- Shi W., Li Y., Gao X., Fu R. Improvement of the respiration efficiency of *Lactococcus lactis* by decreasing the culture pH // *Biotechnol. Lett.* 2016. V. 38. P. 495–501.
- Siciliano R.A., Pannella G., Lippolis R., Ricciardi A., Mazzeo M.F., Zotta T. Impact of aerobic and respirative life-style on *Lac-*

- tobacillus casei* N87 proteome // Int. J. Food Microbiol. 2019. V. 298. P. 51–62.
- Stevens M.J.A., Molenaar D., de Jong A., de Vos W.M., Kleerebezem M. Involvement of the mannose phosphotransferase system of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in peroxide stress tolerance // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 3748–3752.
- Storz G., Imlay J.A. Oxidative stress // Curr. Opin. Microbiol. 1999. V. 2. P. 188–194.
- Tachon S., Brandsma J.B., Yvon M. NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 1311–1319.
- Tachon S., Chambellon E., Yvon M. Identification of a conserved sequence in flavoproteins essential for the correct conformation and activity of the NADH oxidase NoxE of *Lactococcus lactis* // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 3000–3008.
- Tachon S., Michelon D., Chambellon E., Cantonnet M., Mezange C., Henno L., Cachon R., Yvon M. Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis* // Microbiology (SGM). 2009. V. 155. P. 2941–2948.
- Talwalkar A., Kailasapathy K. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen // J. Dairy Sci. 2003. V. 86. P. 2537–2546.
- Tanaka K., Satoh T., Kitahara J., Uno S., Nomura I., Kano Y., Suzuki T., Niimura Y., Kawasaki S. O₂-inducible H₂O₂-forming NADPH oxidase is responsible for the hyper O₂ sensitivity of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 10750.
- Tang W., Xing Z., Hu W., Li C., Wang J., Wang Y. Antioxidative effects *in vivo* and colonization of *Lactobacillus plantarum* MA2 in the murine intestinal tract // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 7193–7202.
- Tian X., Wang Y., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. Metabolite profiling coupled with metabolic flux analysis reveals physiological and metabolic impacts on *Lactobacillus paracasei* oxygen metabolism // Process Biochem. 2018. V. 68. P. 1–11.
- van Niel E.W.J., Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 4350–4356.
- Vasquez E.C., Pereira T.M.C., Peotta V.A., Baldo M.P., Campos-Toimil M. Probiotics as beneficial dietary supplements to prevent and treat cardiovascular diseases: uncovering their impact on oxidative stress // Oxid. Med. Cell. Longev. 2019. P. 3086270.
- Vido K., Le Bars D., Mistou M.Y., Anglade P., Gruss A., Gaudu P. Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 1648–1657.
- Walker G.C. The SOS response of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // Cell. Mol. Biol. 1996. P. 1400–1416.
- Watanabe M., van der Veen S., Nakajima H., Abee T. Effect of respiration and manganese on oxidative stress resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // Microbiology (SGM). 2012. V. 158. P. 293–300.
- Wolf G., Strahl A., Meisel J., Hammes W.P. Heme-dependent catalase activity of lactobacilli // Int. J. Food Microbiol. 1991. V. 12. P. 133–140.
- Xiong Z.Q., Kong L.H., Wang G.Q., Xia Y.J., Zhang H., Yin B.X., Ai L.Z. Functional analysis and heterologous expression of bifunctional glutathione synthetase from *Lactobacillus* // J. Dairy Sci. 2018. V. 101. P. 6937–6945.
- Yamamoto N., Shoji M., Hoshigami H., Watanabe K., Watanabe K., Takatsuzu T., Yasuda S., Igoshi K., Kinoshita H. Antioxidant capacity of soymilk yogurt and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria // Biosci. Microbiota Food Health. 2019. V. 38. P. 97–104.
- Zhang Y., Li Y. Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness // Curr. Opin. Biotech. 2013. V. 24. P. 142–147.
- Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuys S., Felis G.E., Gänzle M.G., Lebeer S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 2782–2858.
- Zotta T., Parente E., Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry // J. Appl. Microbiol. 2017. V. 122. P. 857–869.
- Zuo F., Yu R., Feng X., Khaskheli G.B., Chen L., Ma H., Chen S. Combination of heterogeneous catalase and superoxide dismutase protects *Bifidobacterium longum* strain NCC2705 from oxidative stress // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 7523–7534.

Antioxidant Properties of Lactic Acid Bacteria

A. L. Bryukhanov¹, A. I. Klimko^{1, *}, and A. I. Netrusov¹

¹ Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: alenaklimko221@yandex.ru

Received April 18, 2022; revised May 27, 2022; accepted May 30, 2022

Abstract—Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in fermentation processes for the preparation of various foodstuffs, including dairy, meat and vegetable products. In the course of industrial biotechnological processes, lactobacilli are often exposed to oxidative stress, which occurs due to accumulation of reactive oxygen species (ROS) inside the cells. ROS are formed as a result of incomplete reduction of molecular oxygen to

superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), or hydroxyl radical (OH^{\cdot}) and cause serious damage to all cellular macromolecules. Since LAB do not possess a complete electron transport chain, it was previously believed that they are incapable of existence under oxic conditions. Nevertheless, in the cells of a number of LAB strains, the main antioxidant defense enzymes with high specific activity were found. These include two types of catalases and NADH peroxidase. Heme-containing catalase is synthesized in many species of lactobacilli if heme or hematin is present in the culture medium. Both monofunctional catalase and bifunctional catalase-peroxidase have been found in the cells of many LAB. Catalases of the second type (Mn-containing), which do not require the presence of heme, have also been found in the cells of some lactobacilli species. A high intracellular level of Mn(II) has been found in many LAB strains. Probiotic LAB cultures with pronounced antioxidant activity are in high demand, since they are potentially able to protect the host organism from the toxic effects of ROS and contribute to the prevention of cardiovascular, inflammatory, and oncologic diseases. Antioxidant defense systems in LAB cells were described in this review based on a thorough analysis of the current scientific data. In particular, the review describes the effect of oxidative stress on the metabolism of lactobacilli, their main antioxidant enzymes (NADH oxidase, NADH peroxidase, catalase, superoxide dismutase, thioredoxin reductase, etc.) and the key regulatory proteins and the genes responsible for oxygen uptake as one of the mechanisms for decreasing the ROS concentration.

Keywords: lactic acid bacteria (LAB), reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), catalase, NADH peroxidase, oxidative stress, electron transport chain

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИФИЛОГЕНИЯ И СВОЙСТВА НОВЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS* SP.
ИЗ РИЗОСФЕРЫ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ ЮЖНОГО УРАЛА© 2022 г. О. В. Чубукова^а, *, Л. Р. Хакимова^а, Е. С. Акимова^а, З. Р. Вершинина^а^аИнститут биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение

Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: chubukova@bk.ru

Поступила в редакцию 19.03.2022 г.

После доработки 27.04.2022 г.

Принята к публикации 28.04.2022 г.

Многие представители рода *Pseudomonas* обладают ростостимулирующими свойствами и способностью к биологическому контролю, что позволяет использовать их для создания биопрепаратов и экологически безопасных удобрений. Целью данной работы было выделение новых штаммов псевдомонад из ризосферы бобовых растений Южного Урала и исследование их свойств. Проведен молекулярно-генетический анализ данных бактериальных штаммов. По результатам исследования нуклеотидной последовательности генов *16S rPHK* и *rpoD* было выявлено 4 штамма, относящихся к роду *Pseudomonas*. Один из них, *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1, по уровню гомологии исследованных генов наиболее близок к типовому штамму *Pseudomonas fluorescens*, а штаммы *Pseudomonas* sp. ОВА 2.9, GOR 4.17, STA 3 – к типовому штамму *Pseudomonas koreensis*. Все изучаемые бактерии способны формировать биопленки на инертных поверхностях и на корнях растений, а также обладают антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов. Кроме того, у трех штаммов показана способность к растворению неорганического фосфата. Обработка семян клевера лугового штаммом *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 приводила к повышению всхожести семян на 18% и увеличению сухой биомассы растений на 21% относительно контроля. Полученные данные позволяют рассматривать исследованные микроорганизмы как бактерии, которые могут оказывать положительное влияние на рост и развитие растений.

Ключевые слова: PGPR-штаммы, род *Pseudomonas*, ген *16S rPHK*, ген *rpoD*, биопленки, фосфатмобилизующая активность

DOI: 10.31857/S0026365622100196

Род *Pseudomonas* на сегодняшний день включает наибольшее число описанных видов грамотрицательных бактерий (Gomila et al., 2015). Вследствие широкого спектра метаболической активности представители этого рода повсеместно распространены в природе, что позволяет им заселять различные экологические ниши и успешно выдерживать природную конкуренцию (Sitaraman, 2015). Микроорганизмы *Pseudomonas* sp. являются типичными представителями почвенного биоценоза, среди которых есть как патогены животных и растений, так и бактерии, которые вступают в различные симбиотические взаимодействия с растениями (Espinosa-Urgel, 2004). В почве псевдомонады концентрируются в богатой питательными веществами прикорневой зоне растения (ризосфере), а также на поверхности корней (ризоплане), образуя с ними прочные ассоциации (Vejan et al., 2016). По данным литературы значительная часть микроорганизмов в ризосфере и

ризоплане представлена флуоресцентными псевдомонадами, такими как *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* (Qessaoui et al., 2019; Bertani et al., 2021). Также псевдомонады найдены среди эндофитов – бактерий, которые колонизируют внутренние ткани растений, не оказывая негативного воздействия на растение-хозяина (Dudeja, Giri, 2014; Mengistu et al., 2020). Известно, что многие бактерии, ассоциированные с растениями, могут оказывать положительное влияние на его рост и продуктивность за счет целого комплекса механизмов, основными из которых являются синтез гормонов, сидерофоров, веществ с антимикробными и антифунгальными свойствами, фосфатмобилизующей активности, развития системной устойчивости. Такие микроорганизмы, способные улучшать рост растения и повышать его урожайность, объединяют в группу с общим названием plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Compant et al., 2010; Vejan et al.,

2016). Повсеместная распространенность псевдомонад, а также их способность утилизировать и синтезировать разнообразные соединения вызывают значительный интерес исследователей к бактериям данного рода как к потенциальным объектам агробιοтехнологии. В настоящее время PGPR-штаммы почвенных псевдомонад, относящихся к видам *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. kilonensis*, *P. chlororaphis*, *P. simiae*, используют в сельском хозяйстве в качестве биопрепаратов, которые позволяют повысить урожайность сельскохозяйственных растений и снизить долю вносимых химических удобрений (Almarío et al., 2017; Gu et al., 2020). Также найдены штаммы псевдомонад, служащие продуцентами биологически активных веществ (антибиотиков, гормонов, витаминов), которые находят применение, как в сельском хозяйстве, так и в медицине (Rosas et al., 2012; Nikel et al., 2018).

Таким образом, весьма актуальным является поиск и изучение новых штаммов псевдомонад, обладающих свойствами PGPR, которые потенциально могут использоваться в качестве экологически безопасных удобрений и средств защиты растений.

Целью данной работы был поиск новых ризосферных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, определение их таксономической принадлежности и изучение свойств, которые могут быть полезны для растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение бактериальных изолятов. Объектом исследования являлись микроорганизмы, выделенные из ризосферы дикорастущих бобовых растений Южного Урала. Для получения бактериальных изолятов образцы почв, собранные с корней растений, гомогенизировали в стерильной среде LB (мас. % в водном растворе: бактотриптон – 1, дрожжевой экстракт – 0.5, NaCl – 0.5). Через 30 мин отбирали 200 мкл жидкости и засеивали на чашки с агаризованной средой LB (Desoky et al., 2020). В дальнейшем отобранные штаммы *Pseudomonas* sp. выращивали на жидкой и агаризованной среде LB при температуре 28°C (Desoky et al., 2020).

ДНК из бактерий выделяли лизированием клеток в 1% Triton X100 и 1%-ной суспензии Chel-ex100. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР (Чубукова и соавт., 2021).

Молекулярно-генетическая идентификация бактериальных штаммов. Генетическое разнообразие собранных изолятов исследовали с помощью RAPD анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) с использованием следующих “случайных” праймеров: 1) LMBD 5'-GGGCGCTG-3'; 2) AFK 5'-ACGGTGGACG-3' (Баймиев и соавт., 2010).

Для амплификации гена 16S рРНК были использованы универсальные праймеры fD1 5'-cccggatc-caagcttaaggaggatgatccagcc-3' и rD1 5'-ccgaattcgtcgacaacagagattgatcctggctcag-3', фланкирующие фрагмент гена размером около 1500 п.н. (Баймиев и соавт., 2019). Для амплификации фрагмента гена *rpoD* были использованы праймеры PsEG30F5'-ATYGAAATCGCCAARCG-3' и PsEG790R5'-CG-GTTGATKTCCTTGA-3' с размером продукта 736 п.н. (Mulet et al., 2009).

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 (“Applied Biosystems, Inc.”, США) с использованием наборов “Big Dye Terminator v. 3.1”.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene (“DNASTAR, Inc.”, США). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием метода множественного выравнивания Clustal W в программе Megalign Lasergene (“DNASTAR”, США).

Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев.

Анализ ризобияльных биопленок, формируемых на инертных поверхностях. Для получения биопленок использовали среду LB, YM (мас. % в водном растворе: маннитол – 1, дрожжевой экстракт – 0.04, NaCl – 0.01, MgSO₄ – 0.01, K₂HPO₄ · 3H₂O – 0.05, агар – 1) и МН (мас. % в водном растворе: кислый казеиновый пептон – 1.75, крахмал – 0.15, вытяжка из говядины – 0.2) с применением 24-луночных пластиковых планшетов (полистирол) (“Corning Inc.”, США). Для этого штаммы *Pseudomonas* sp. выращивали 24 ч в жидкой среде на качалке при 28°C и 140 об./мин до концентрации 10⁸–10⁹ КОЕ/мл. Затем культуру разводили свежей средой до 10⁶ КОЕ/мл и переносили по 1 мл в лунки планшета. Планшеты герметизировали Parafilm (“Amcor”, США) и инкубировали при температуре 28°C и 50 об./мин в течение 7 сут. Для определения относительных показателей плотности биопленки использовали метод окрашивания генцианом фиолетовым (“Агат-Мед”, Россия) (Вершинина и соавт., 2021). Оптическую плотность образцов измеряли с помощью прибора Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader (“Perkin Elmer”, США).

Исследование влияния бактерий на прорастание семян и биомассу растений. Семена растений клевера лугового в течение 1 мин стерилизовали в 70% спирте, а после 20 мин в 5% растворе гипохлорита натрия. Далее семена были обработаны

суточными культурами псевдомонад, которые предварительно выращивали на качалках в жидкой среде LB (перед инокуляцией плотность суспензии ризобий была измерена на спектрофотометре и доведена до 10^5 КОЕ/мл). Затем инокулированные семена раскладывали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Часть семян оставили неинокулированными в качестве контроля. Инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 3 сут и проводили подсчет проросших и не проросших семян. Всхожесть определяли по формуле: (число проросших семян/число посеянных семян) \times 100%. Далее проросшие семена выращивали в течение 1 нед. в предварительно прокаленном вермикулите в условиях светоплощадки (освещение 5000 лк, световой день 16 ч), после чего измеряли биомассу контрольных и опытных растений. Для этого растения целиком высушивали в сушильном шкафу до постоянного веса, а затем взвешивали.

Микроскопирование корней растений. Для визуализации взаимодействия бактерий с корнями растений штаммы *Pseudomonas* sp. были трансформированы ранее сконструированной генетической конструкцией на основе вектора pJN105, в которую был добавлен ген флуоресцентного белка TurboGFP (Баймиев и соавт., 2011). В дальнейшем полученными флуоресцентными штаммами были обработаны корни проростков томата.

Подготовка электрокомпетентных клеток и их трансформация, а также электрофорез фрагментов ДНК проводились согласно (Sambrook et al., 1989).

Стерильные семена томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 (“СибНИИРС”, Россия) проращивали в течение 1 нед. на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Далее проростки выдерживали при покачивании (50 об./мин) в суспензии ризобий (10^7 КОЕ/мл) в течение 1 сут. Для приготовления суспензий использовали суточные культуры бактерий, выращенные в жидкой среде LB.

Визуальное наблюдение меченых микроорганизмов на корнях растений проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImagerM1 (“Carl-Zeiss”, Германия).

Выявление фосфатмобилизующей активности при росте бактерий на агаризованной питательной среде. Определение способности штаммов *Pseudomonas* sp. к мобилизации неорганического фосфора проводили по образованию зоны просветления (гало) вокруг колоний на чашках со средой Муромцева (мас. % в водном растворе: глюкоза – 1, аспарагин – 1, K_2SO_4 – 0.02, $MgSO_4$ – 0.02, кукурузный экстракт – 0.002, агар – 2; pH 6.8), содержащей нерастворимый фосфат. В качестве источника фосфора в среду добавляли $Ca_3(PO_4)_2$ в концентрации 5 г/л (Егоршина и соавт., 2011). Суточную культуру бактерий наносили в виде капли на поверхность

агаризованной среды. Чашки инкубировали при температуре 28°C. Фосфатмобилизующую активность бактерий оценивали количественно как площадь зон гало через 1–4 сут.

Оценка антагонистической активности бактерий. Антагонистическую активность изучаемых микроорганизмов по отношению к фитопатогенным грибам оценивали, используя метод двойной культуры (Whipps, 1987). Степень подавления роста грибов определяли через три дня по формуле $(R_2 - R_1)/R_2 \times 100\%$, где R_1 – радиус колоний грибов в направлениях к бактериям, а R_2 – к краю чашки.

В качестве тест-организмов для определения антифунгальной активности использовали *Fusarium culmorum* ВКМ 844, *F. graminearum* ВКМ 1668, *F. nivale* ВКМ 3106, *F. solani* ВКМ 142.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Депонирование штаммов. Последовательности исследованных штаммов были зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами ОК039351, ОК040062, ОМ835809, ОМ846603 для гена 16S рРНК и ОМ641958, ОМ641959, ОМ678573, ОМ678574 для гена *rpoD* соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были исследовано 80 изолятов бактерий, полученных из ризосферы бобовых растений остролодочника башкирского (*Oxytropis baschkirien-sis* Knjas.), козлятника восточного (*Galéga orientális* Lam.), стальника колючего (*Ononis spinosa* L.). Отобранные чистые культуры изучаемых микроорганизмов предварительно проверяли на гетерогенность с помощью RAPD-анализа с применением “произвольных” олигонуклеотидных праймеров AFK и LMBD. В дальнейшем образцы, которые отличались по RAPD-профилю, были взяты для определения их филогении.

Для установления филогенетической принадлежности исследуемых штаммов были секвенированы нуклеотидные последовательности фрагментов консервативного гена 16S рРНК, который традиционно используется для идентификации и классификации бактерий (Баймиев и соавт., 2010, 2019). По результатам сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей данного гена с известными структурами из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) среди изучаемых микроорганизмов были отобраны 4 штамма, относящиеся к *Pseudomonas* sp.: ОВА 2.4.1, ОВА 2.9, GOR 4.17, STA 3. Однако в настоящее время признано, что анализа только одного консервативного гена недостаточно для дифференциации родов бактерий, которые включают

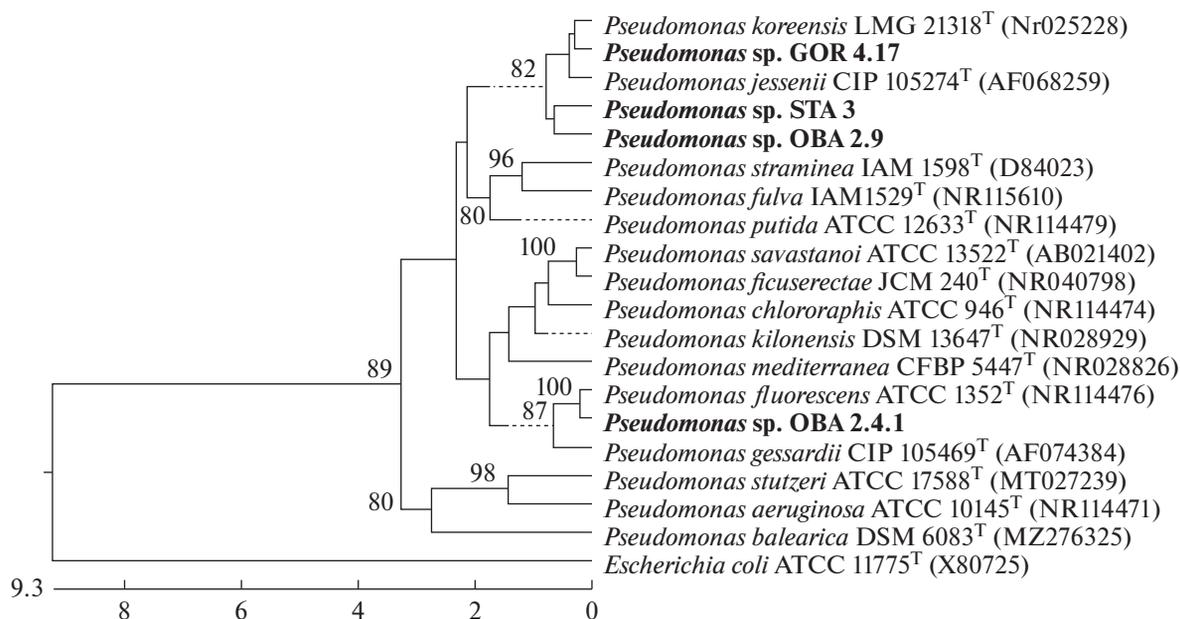


Рис. 1. Филогенетическое древо бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (показаны величины показателя “bootstrap”-анализа от 80%). На горизонтальной оси приведен вес данного выравнивания, выраженный в количестве замен нуклеотидов ($\times 100$). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *E. coli* ATCC 11775^T.

генетически близкие виды, как, например, род *Pseudomonas* (Janda, Abbott, 2007). Поэтому в качестве альтернативного гена для филогенетических исследований был использован ген *rpoD*, кодирующий бактериальный фактор инициации транскрипции. В ряде исследований было показано, что секвенирование последовательности данного гена является более эффективным для точной идентификации штаммов *Pseudomonas* sp. по сравнению с геном 16S рРНК (Girard et al., 2020; Lauritsen et al., 2021). На основе сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *rpoD* с уже известными аналогичными структурами из базы данных GenBank было также установлено, что штаммы OBA 2.4.1, OBA 2.9, GOR 4.17, STA 3. относятся к бактериям рода *Pseudomonas*. На филогенетических деревьях сходства, построенных на основе данных анализа генов 16S рРНК и *rpoD* типовых представителей видов *Pseudomonas* sp. и анализируемых штаммов, последние разделились на две группы (рис. 1 и 2). На обоих рисунках штамм *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 входит в отдельный кластер с типовым штаммом *P. fluorescens* IAM 12022^T, сходство с которым по гену 16S рРНК составило 99.7%, а по гену *rpoD* 91.1%. Остальные анализируемые штаммы вошли в общий кластер, в котором штамм *Pseudomonas* sp. GOR 4.17 показал на 16S рРНК-дендрограмме наибольший уровень сходства с *P. koreensis* LMG 21318^T (99.2%), а штаммы *Pseudomonas* sp.

OBA 2.9 и STA 3 образовали отдельную ветвь с близкородственным к виду *P. koreensis* типовым штаммом *P. jessenii* CIP 105274^T (97.9 и 98.9% соответственно).

Причем на *rpoD*-дендрограмме штаммы *Pseudomonas* sp. OBA 2.9, GOR 4.17, STA 3 образуют отдельную ветвь с типовым штаммом *P. koreensis* LMG 21318^T с гомологией 95.6, 94 и 91.9% соответственно, тогда как с типовым штаммом *P. jessenii* CIP 105274^T гомология ниже (90.9, 90.2 и 89.5% соответственно). Поскольку дискриминационная способность гена *rpoD* считается более высокой для дифференциации близкородственных видов, можно предположить, что три вышеуказанных штамма наиболее близки к штамму *P. koreensis* LMG 21318^T (Lauritsen et al., 2021).

Анализ биопленок, формируемых штаммами псевдомонад на инертных поверхностях. Для большинства бактерий формирование биопленок является основной стратегией выживания в неблагоприятных условиях среды (Вершинина и соавт., 2021). Для почвенных микроорганизмов способность к биопленкообразованию является залогом конкурентоспособности и эффективной колонизации ризосферы. Также использование в агротехнологиях предпосевной обработки семян PGPR-бактериями в целях улучшения всхожести и роста растений будет результативным при успешном образовании ими биопленок.

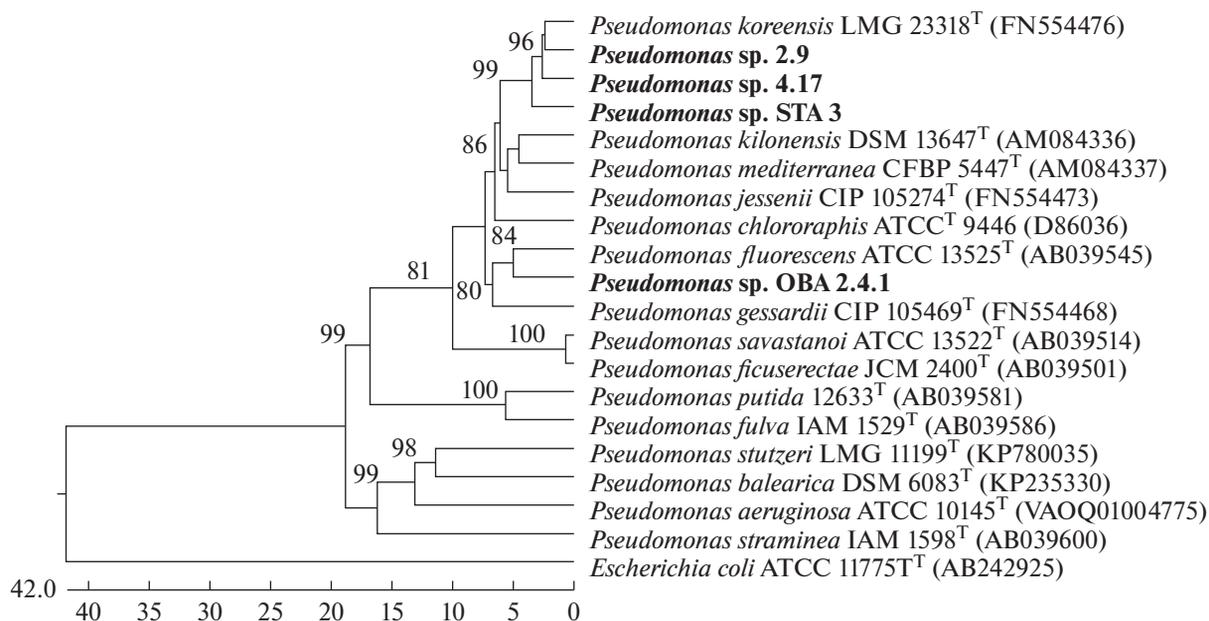


Рис. 2. Филогенетическое древо бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *rpoD*. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (показаны величины показателя “bootstrap”-анализа от 80%). На горизонтальной оси приведен вес данного выравнивания, выраженный в количестве замен нуклеотидов (×100). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена *rpoD* *E. coli* ATCC 11775^T.

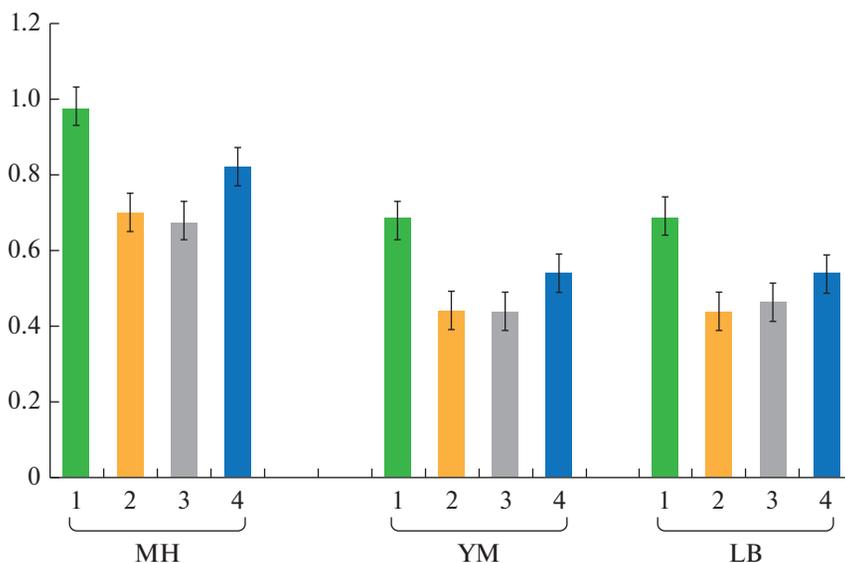


Рис. 3. Относительная биомасса биопленок штаммов *Pseudomonas* sp. после 7 сут культивирования при 28°C в зависимости от среды. По оси ординат – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах. Обозначения штаммов *Pseudomonas* sp. (1–4): 1 – OBA 2.4.1; 2 – OBA 2.9; 3 – GOR 4.17; 4 – STA 3.

Нами было изучено биопленкообразование штаммами *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, OBA 2.9, GOR 4.17, STA 3 на поверхности полистироловых планшетов в различных жидких питательных средах: белковые среды МН, LB и углеводная, без-

белковая среда YM. Исследования показали, что все 4 штамма псевдомонад были способны к образованию биопленок на инертных поверхностях во всех средах. При этом наиболее эффективно они формировались в среде МН, содержащей

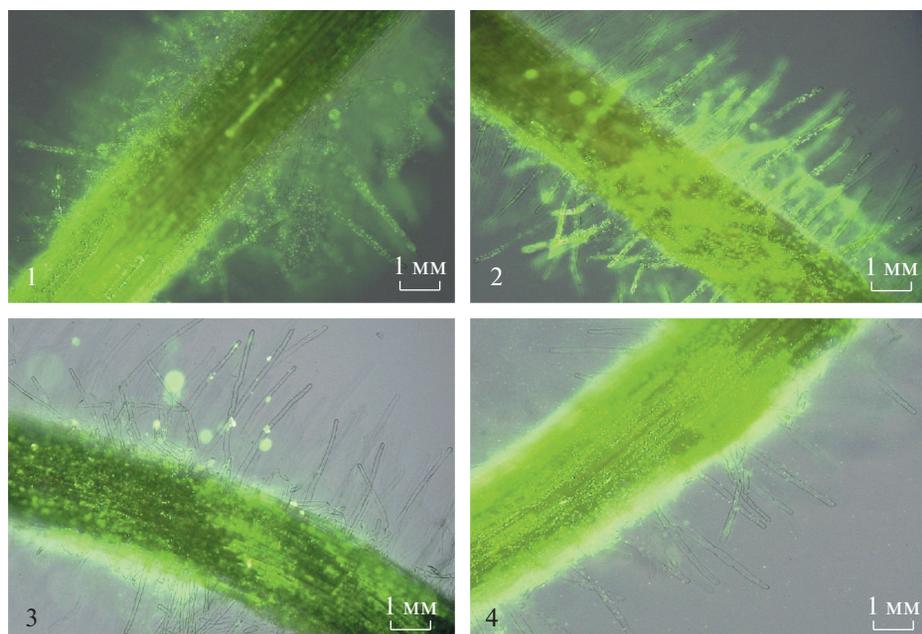


Рис. 4. Образование биопленок на поверхности корней проростков томата через 24 ч совместного культивирования: 1 – *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1; 2 – *Pseudomonas* sp. STA 3; 3 – *Pseudomonas* sp. OBA 2.9; 4 – *Pseudomonas* sp. GOR 4.17.

большое количество питательных веществ. Относительная биомасса биопленок при культивировании на среде МН у всех штаммов превышала соответствующие показатели на среде LB и YM в 1.5 раза (рис. 3). Однако все штаммы показали хорошую способность к биопленкообразованию и на бедной питательными веществами среде YM.

Полученные результаты свидетельствуют о способности исследованных штаммов псевдомонад образовывать зрелые биопленки в условиях как богатых, так и бедных питательных сред. При этом лучшую способность к биопленкообразованию во всех средах показал штамм *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, относительная биомасса биопленок которого превышала соответствующие показатели других штаммов более чем в 1.2 раза.

По данным флуоресцентной микроскопии, после 1 сут совместного культивирования штаммы *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, OBA 2.9, GOR 4.17, STA 3 формировали микроколонии и биопленки на поверхности корней томатов. Причем характерной особенностью штаммов *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 и STA 3 оказалось образование биопленок как на корневых волосках, так и на корневой поверхности, тогда как у штаммов *Pseudomonas* sp. OBA 2.9 и GOR 4.17 бактерии преимущественно локализовались на поверхности ризодермы, а на корневых волосках наблюдались единичные колонии (рис. 4).

Исследование влияния бактерий на прорастание семян и биомассу растений. По данным литературы положительное влияние PGPR-бактерий на

растения проявляется, в том числе, в улучшении всхожести семян (Bharathi, 2004; Qessaoui et al., 2019). В нашей работе было показано, что предварительная инокуляция семян растений клевера лугового штаммом *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 приводила к повышению прорастания семян на 18% больше относительно необработанного контроля (рис. 5а). Сухая биомасса растений, инокулированных штаммом *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, была на 21% больше по сравнению с необработанными контрольными растениями. Со штаммами псевдомонад *Pseudomonas* sp. OBA 2.9, GOR 4.17, STA 3 достоверно значимых различий во всхожести семян и в биомассе относительно контроля не было выявлено (рис. 5б).

Выявление способности к растворению фосфатов. Фосфор является чрезвычайно значимым элементом для нормального роста и развития растения, однако большая часть фосфора в почве находится в недоступной для растений форме (Lambers et al., 2006). Одной из важнейших характеристик PGPR-штаммов бактерий считается способность к растворению труднодоступных фосфатов и, как следствие, улучшение фосфорного питания растения (Vejan et al., 2016). Поэтому нами были исследованы фосфатмобилизующие свойства новых штаммов псевдомонад.

Оценка фосфатмобилизующей активности исследуемых нами штаммов псевдомонад по наличию или отсутствию прозрачных зон “гало” на агаризованной среде Муромцева показала, что все они, кроме штамма *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, способны к растворению неорганического фос-

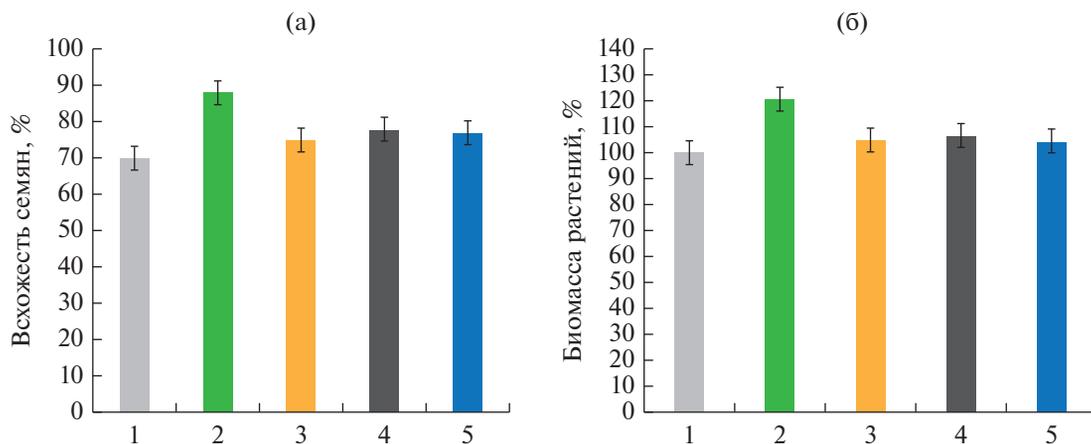


Рис. 5. Влияние штаммов *Pseudomonas* sp. на всхожесть семян растений клевера лугового (по оси ординат всхожесть в %) (а) и сухую биомассу растений клевера лугового (по оси ординат изменение сухой биомассы растений в %) (б). Обозначения штаммов *Pseudomonas* sp. (1–5): 1 – контроль; 2 – OVA 2.4.1; 3 – OVA 2.9; 4 – GOR 4.17; 5 – STA 3.

фата в виде $Ca_3(PO_4)_2$ (рис. 6). Наиболее высокий показатель фосфатмобилизующей активности был получен у штамма *Pseudomonas* sp. STA 3.

Оценка антагонистической активности бактерий. По данным литературы многие штаммы *Pseudomonas* sp. с помощью различных механизмов, таких как, например, синтез сидерофоров и антибиотиков, индукция системной устойчивости, способны подавлять или замедлять рост фитопатогенных грибов (Bharathic et al., 2004; Dutta, Podile, 2010). Данные свойства позволяют использовать подобные штаммы-антагонисты в качестве биологического контроля для защиты растений от заболеваний.

Изучение влияния исследуемых микроорганизмов на различные виды фитопатогенных грибов *Fusarium* sp. показало наличие антагонистической активности у всех штаммов бактерий (табл. 1). Ингибирование роста *F. nivale* в двойной культуре варьировало в диапазоне 20.7–30.2%, *F. culmorum* – 15.1–30.7%, *F. graminearum* – 33.9–34.1%, *F. solani* – 20.6–37.5%. Наибольший антагонизм проявил штамм *Pseudomonas* sp. 2.4.1.

В настоящее время в мире остро стоит проблема повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Однако традиционные агротехнологии часто приводят к значительному загрязнению почв и, впоследствии, сельскохозяйственной продукции минеральными удобрениями. Используемые для борьбы с вредителями культурных растений антифунгальные препараты, в свою очередь, могут накапливаться в продуктах, а также провоцировать возникновение новых устойчивых штаммов фитопатогенов. Применение PGPR-микроорганизмов может служить альтернативой препаратам химического происхождения.

Нами было идентифицировано четыре новых штамма, относящихся к роду *Pseudomonas*, среди

бактериальных изолятов, полученных при выделении из ризосферы бобовых растений. Исследования показали у всех штаммов наличие таких хозяйственно-полезных признаков, как антагонистическая активность в отношении фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, у 3 штаммов бактерий выявлена способность к мобилизации неорганического фосфата. Также было показано, что обработка семян клевера лугового штаммом *Pseudomonas* OVA 2.4.1 улучшала всхожесть семян и увеличивала накопление сухой биомассы проростков. Ранее нами было продемонстрировано, что инокуляция корней проростков томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 штаммом *Pseudomonas* OVA 2.4.1 через 30 дней приводила к значительному увеличению сухой биомассы растений и содержанию пигментов в листьях томата в сравнении с контрольными инокулированными растениями (Масленникова

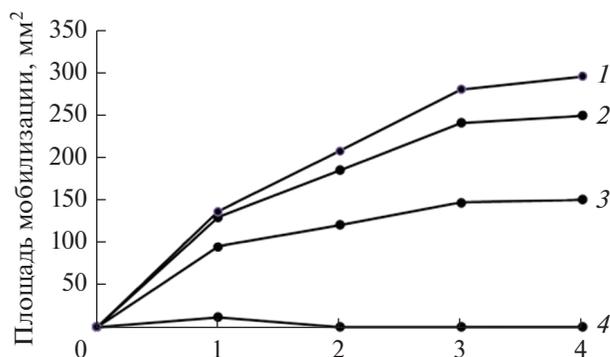


Рис. 6. Динамика мобилизации неорганического фосфата штаммами *Pseudomonas* sp.: 1 – STA 3; 2 – OVA 2.9; 3 – GOR 4.1; 4 – OVA 2.4.1. По оси абсцисс – сутки, на которые измеряли площадь мобилизации фосфата; по оси ординат – значения площади зон мобилизации фосфата в mm^2 .

Таблица 1. Ингибирование роста грибов различными штаммами псевдомонад

Штаммы бактерий	Грибы			
	<i>Fusarium nivale</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.4.1	22.9 ± 2.35	30.7 ± 2.63	33.9 ± 2.58	37.5 ± 2.01
<i>Pseudomonas</i> sp. OBA 2.9	30.2 ± 2.83	12.3 ± 1.34	—	31.3 ± 2.32
<i>Pseudomonas</i> sp. GOR 4.17	25.4 ± 2.52	15.7 ± 1.75	—	22.7 ± 1.87
<i>Pseudomonas</i> sp. STA 3	20.7 ± 1.88	15.1 ± 1.58	34.1 ± 2.89	20.6 ± 2.12

Примечание. Цифрами показан диаметр зоны ингибирования роста гриба, мм; “—” — отсутствие антифунгальной активности.

и соавт., 2021). В дальнейшем планируется исследование биохимических свойств новых штаммов *Pseudomonas* sp. для уточнения видовой принадлежности и изучения влияния данных бактерий на рост и развитие различных видов растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А21-121011990120-7) с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Баймиев Ан.Х., Акимова Е.С., Гуменко Р.С., Владимировичева А.А., Чемерис А.В., Баймиев Ал.Х. Генетическое разнообразие и филогения клубеньковых бактерий, выделенных из клубеньков растений рода *Lupinaster*, произрастающих на Южном Урале // Генетика. 2019. Т. 55. С. 55–59.

Baymiev An.K., Akimova E.S., Gumenko R.S., Vladimirova A.A., Muldashev A.A., Chemeris A.V., Baymiev Al.K. Genetic diversity and phylogeny of root nodule bacteria isolated from nodules of plants of the *Lupinaster* genus inhabiting the southern Urals // Russ. J. Genet. 2019. V. 55. P. 45–51.

Баймиев Ан.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченных штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* // Мол. биология. 2011. Т. 45. С. 984–991.

Baymiev An.K., Yamidanov R.S., Matniyazov R.T., Blagova D.K., Chemeris A.V. Preparation of fluorescent labeled nodule bacteria

strains of wild legumes for their detection *in vivo* and *in vitro* // Mol. Biol. (Moscow). 2011. V. 45. P. 904–910.

Баймиев Ан.Х., Птицын К.Г., Баймиев Ал.Х. Влияние интродукции караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 123–128.

Baymiev An.K., Ptitsyn K.G., Baimiev Al.K. Influence of the introduction of *Caragana arborescens* on the composition of its root-nodule bacteria // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 115–112.

Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Никоноров Ю.М., Хакимов Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х. Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum* // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 191–203.

Vershinina Z.R., Chubukova O.V., Nikonorov Y.M., Khakimova L.R., Lavina A.M., Karimova L.R., Baymiev An.K., Baymiev Al.K. Effect of *rosR* gene overexpression on biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum* // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 198–209.

Егоршина А.А., Хайруллин Р.М., Лукьянцев М.А., Курамшина З.М., Смирнова Ю.В. Фосфат-мобилизующая активность эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* и их влияние на степень микоризации корней пшеницы // Журн. Сибирского фед. ун-та. Биология. 2011. Т. 4. № 2. С. 172–182.

Масленникова Д.Р., Чубукова О.В., Вершинина З.Р., Емелина А.А., Насырова К.Р., Хакимова Л.Р., Михайлова Е.В. Влияние ростостимулирующих бактерий на рост и содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений томата // Biomics. 2021. Т. 13. С. 274–279. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-18>

Чубукова О.В., Вершинина З.Р., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х. Создание индуцируемой векторной системы на основе промотора гена *nodA* ризобий // Экологическая генетика. 2021. Т. 19. С. 13–21.

Almarino J., Bruto M., Vacheron J., Prigent-Combaret C., Moenne-Loccoz Y., Muller D. Distribution of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes among the *Pseudomonas* spp. reveals unexpected polyphyletism // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1218. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01218>

Bertani I., Zampieri E., Bez C., Volante A., Venturi V., Monaco S. Isolation and characterization of *Pseudomonas chlororaphis* strain ST9; rhizomicrobiota and in planta studies //

- Plants. 2021. V. 10. P. 1466.
<https://doi.org/10.3390/plants10071466>
- Bharathi R., Vivekananthan R., Harish S., Ramanathan A., Samiyappan R. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies // Crop Protection. 2004. V. 23. P. 835–843.
- Compant S., Clément C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // Soil Biol. Biochem. 2010. V. 42. P. 669–678.
- Desoky E.S.M., Merwad A.R.M., Semida W.M., Ibrahim S.A., El-Saadony M.T., Rady M.M. Heavy metals-resistant bacteria (HM-RB): Potential bioremediators of heavy metals-stressed *Spinacia oleracea* plant // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2020. V. 198. P. 110685.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110685>
- Dudeja S.S., Giri R. Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes // Afr. J. Microbiol. Res. 2014. V. 8. P. 1562–1572.
- Dutta S., Podile A.R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone // Crit. Rev. Microbiol. 2010. V. 36. P. 232–244.
<https://doi.org/10.3109/10408411003766806>
- Espinosa-Urgel M. Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer // Plasmid. 2004. V. 52. P. 139–150.
- Girard L., Lood C., Rokni-Zadeh H., van Noort V., Lavigne R., De Mot R. Reliable identification of environmental *Pseudomonas* isolates using the *rpoD* gene // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 1166.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081166>
- Gomila M., Peña A., Mulet M. M., Lalucat J., García-Valdés E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas* // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 214.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>
- Gu Y., Ma Y.N., Wang J., Xia Z., Wei H.L. Genomic insights into a plant growth-promoting *Pseudomonas koreensis* strain with cyclic lipopeptide-mediated antifungal activity // MicrobiologyOpen. 2020. V. 9. Art. e1092.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1092>
- Janda J.M., Abbott S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. P. 2761–2764.
- Lambers H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearse S.J., Veneklaas E.J. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits // Ann. Bot. 2006. V. 98. P. 693–713.
- Lauritsen J.G., Hansen M.L., Bech P.K., Jelsbak L., Gram L., Strube M.L. Identification and differentiation of *Pseudomonas* species in field samples using an *rpoD* amplicon sequencing methodology // mSystems. 2021. V. 6. e0070421.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00704-21>
- Mengistu A.A. Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism // Int. J. Microbiol. 2020. V. 2020. Art. 6927219.
<https://doi.org/10.1155/2020/6927219>
- Mulet M., Bennasar A., Lalucat J., García-Valdés E. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples // Mol. Cell Probes. 2009. V. 23. P. 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.02.001>
- Nikel P.I., de Lorenzo V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to trans-metabolism // Metab. Eng. 2018. V. 50. P. 142–155.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.005>
- Qessaoui R., Bouharroud R., Furze J.N., El Aalaoui M., Akroud H., Amarraque A., Vaerenbergh J.V., Tahzima R., Mayad E.H., Chebli B. Applications of new rhizobacteria *Pseudomonas* isolates in agroecology via fundamental processes complementing plant growth // Sci. Rep. 2019. V. 9. Art. 12832.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8>
- Rosas S.B., Pastor N.A., Guñazú L.B., Andrés J.A., Carlier E., Vogt V., Bergesse J., Rovera M. Efficacy of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1 for improving productivity of several crops // Crop Production Technologies / Ed. P. Sharma. InTech, 2012. P. 199–210.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
- Sitaraman R. *Pseudomonas* spp. as models for plant-microbe interactions // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. Art. 787.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00787>
- Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Nasrulhaq Boyce A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review // Molecules. 2016. V. 21. Art. 573.
<https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi // New Phytologist. 1987. V. 107. P. 127–142.

Phylogeny and Properties of New *Pseudomonas* spp. from the Rhizosphere of Southern Ural Leguminous Plants

O. V. Chubukova¹*, L. R. Khakimova¹, E. S. Akimova¹, and Z. R. Vershinina¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: chubukova@bk.ru

Received March 19, 2022; revised April 27, 2022; accepted April 28, 2022

Abstract—Since many members of the genus *Pseudomonas* have growth-stimulating properties and are able carry out biological control, they may be used to develop biopreparations and environmentally friendly fertilizers. The goal of the present work was to isolate new *Pseudomonas* strains from the rhizosphere of legumi-

nous plants of the Southern Ural and to study their economically useful properties. Molecular genetic analysis of these bacterial strains was carried out. According to the results on the nucleotide sequences of the 16S rRNA and *rpoD* genes, four *Pseudomonas* strains were identified. One of them, *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1, was closest to the type strain of *Pseudomonas fluorescence* in terms of the homology of the studied genes, and the strains of *Pseudomonas* sp. OBA 2.9, GOR 4.17, and STA 3 were most closely related to the type strain of *Pseudomonas koreensis*. Further studies revealed that all the studied bacteria were capable of forming biofilms on both inert surfaces and plant roots and exhibited antagonistic activity against phytopathogenic fungi. Moreover, three strains were shown to dissolve inorganic phosphate. Treatment of red clover seeds with *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 resulted in an 18% increase in seed germination and a 21% increase in dry plant biomass relative to the control. The data obtained allow us to consider the studied microorganisms as bacteria that can have a positive effect on plant growth and development.

Keywords: PGPR strains, genus *Pseudomonas*, 16S rRNA gene, *rpoD* gene, biofilms, phosphate-mobilizing activity

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИГАЛАКТОФУРАНАН КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
“*PAENARTHROBACTER PYRIDINOVORANS*” ВКМ Ас-1098D© 2022 г. Н. В. Потехина^а, *, А. С. Шашков^б, Е. В. Арискина^с, Н. В. Присяжная^с,
Е. М. Тульская^а, Ф. М. Хасаева^д, Л. И. Евтушенко^с^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия^бИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991 Россия^сФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН,
Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино, 142290 Россия^дКабардино-Балкарский государственный аграрный университет им. В.М. Кокова, Нальчик,
Кабардино-Балкарская Республика, 360030 Россия

*e-mail: potekhina56@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

После доработки 17.05.2022 г.

Принята к публикации 19.05.2022 г.

Установлены структура гликополимера клеточной стенки и таксономическое положение штамма ВКМ Ас-1098D, обладающего пиридин-деградирующей активностью. С использованием химических и ЯМР-спектроскопических методов гликополимер был идентифицирован как 1,6-связанный β-D-галактофуранан с боковыми остатками диаминоглюкозы (2,3-диацетиамидо-2,3-дидезокси-β-глюкопиранозы, β-Glc₂NAc₃NAc). Структура полимера впервые описана у прокариот. Близкий по структуре галактофуранан, обнаруженный ранее у некоторых видов *Paenarthrobacter*, отличался от полимера штамма ВКМ Ас-1098D α-конфигурацией диаминоглюкозы (α-Glc₂NAc₃NAc) боковой цепи. Анализ последовательностей генов 16S рРНК и MALDI-TOF масс-спектров показал, что штамм ВКМ Ас-1098D может быть отнесен к новому виду рода *Paenarthrobacter*, предварительно названному “*Paenarthrobacter pyridinovorans*”. Данные, полученные в этом исследовании и ранее, свидетельствуют о том, что галактофуранан с диаминоглюкозой в боковой цепи может служить хемотаксономическим признаком рода *Paenarthrobacter*, а α-конфигурация гликозидной связи диаминоглюкозы — являться особенностью предполагаемого нового вида.

Ключевые слова: *Paenarthrobacter*, галактофуранан, полисахарид, клеточная стенка, хемотаксономия

DOI: 10.31857/S0026365622600365

Клеточные стенки актинобактерий, как и других грамположительных бактерий, наряду с пептидогликаном обычно содержат ряд вторичных гликополимеров (Kohler et al., 2009). К ним относятся тейхоевые кислоты, поли(гликозил-1-фосфаты) и различные бесфосфатные полимеры, ковалентно связанные с пептидогликаном, а также липотейхоевые кислоты, связанные с мембранами (Naumova et al., 2001; Kohler et al., 2009; Потехина и соавт., 2011; Тульская и соавт., 2011). Типы

и структурные вариации пептидогликана хорошо известны как важнейшие хемотаксономические признаки таксонов актинобактерий разного уровня (Schumann, 2011).

Вторичные гликополимеры бактерий в сравнении с пептидогликанами являются менее изученными в таксономическом аспекте. Однако имеющиеся в литературе сведения указывают на то, что состав, структуры и отдельные структурные компоненты гликополимеров могут быть также специфичными для видов, родов и высших таксонов актинобактерий (Naumova et al., 2001; Schumann et al., 2009; Evtushenko, Ariskina, 2015; Nouioui et al., 2018; Шашков и соавт., 2020; Потехина и соавт., 2021). В частности, галактофуранан с диаминоглюкозой в боковой цепи был обнаружен у штаммов всех трех изученных видов рода *Paenarthrobacter* — *P. aurescens*, *P. histidinovorans* и *P. nicotinovorans* (относившихся ранее к роду *Ar-*

Сокращения: HSQC — протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; ROESY — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY — корреляционная спектроскопия; TOCSY — тотальная корреляционная спектроскопия; НМВС — гетероядерная корреляция через несколько связей; δ_C, δ_H — значения химических сдвигов атомов ¹³C и ¹H соответственно.

throbacter) (Busse, 2016). Это указывает на то, что вышеупомянутый полимер может являться хемотаксономическим маркером рода *Paenarthrobacter* (Потехина и соавт., 2021).

В настоящей работе представлены результаты изучения гликополимеров клеточной стенки штамма ВКМ Ас-1098D, деструктора пиридина (Khasaeva et al., 2011), и приведены данные, с высокой степенью вероятности указывающие на принадлежность этого штамма к новому виду рода *Paenarthrobacter*. Полученные результаты согласуются с ранее высказанным предположением о специфичности галактофуранана с диаминоглюкозой в боковой цепи для бактерий рода *Paenarthrobacter*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Используемый в работе штамм ВКМ Ас-1098D был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (<https://www.vkm.ru>). Штамм был помещен в коллекцию под названием *Arthrobacter* sp. (Khasaeva et al., 2011) и впоследствии реидентифицирован как *Paenarthrobacter* sp. на основе короткого фрагмента (1200 п.н.) гена 16S рРНК.

Накопление биомассы, выделение клеточных стенок и препаратов гликополимеров, их гидролиз и анализ продуктов гидролиза методами электрофореза и хроматографии на бумаге проводили, как описано ранее (Potekhina et al., 2011).

Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование и анализ последовательности гена 16S рРНК штамма ВКМ Ас-1098D проводили, как описано (Ryzhmanova et al., 2017). Процент сходства между последовательностями 16S рРНК гена рассчитывали с помощью программы TaxonDC версии 1.3.1. (Tarlachkov, Starodumova, 2017). MALDI-TOF масс-спектры целых клеток штаммов, выращенных на агаре R2A в течение 3 сут, регистрировали и анализировали, как описано ранее (Присяжная и соавт., 2012).

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C снимали на спектрометре Bruker Avance II 600 (“Bruker”, Германия) для растворов в 99.96% D_2O при температуре 323°K, обеспечивающей минимальное перекрытие сигнала остаточной воды с сигналами полимеров. В качестве калибровочного стандарта использовали TSP (натриевая соль 3-(триметилсил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты) (δ_{H} 0.0, δ_{C} -1.6). Время смешивания в экспериментах ^1H , ^1H TOCSY и ROESY составляло 100 и 150 мс соответственно. Эксперимент ^1H , ^{13}C НМВС был оптимизирован для констант спин-спинового взаимодействия $J_{\text{H,C}}$ 8 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ почти полной последовательности гена 16S рРНК (1517 п.н.) штамма ВКМ Ас-1098D подтвердил его принадлежность к роду *Paenarthrobacter* (рис. 1) и показал, что он наиболее близок филогенетически к *P. nicotinovorans* DSM 420 (99.6% сходства), *P. ureafaciens* DSM 20126 (99.3%) и *P. histidinovorans* DSM 20115 (99.3%). Эти значения достаточно высоки, но сопоставимы или ниже значений между типовыми штаммами некоторых близких видов этого рода, например, *P. aurescens* и *P. nitroguaiacolicus* (99.9%), *P. histidinovorans* и *P. nicotinovorans* (99.7%) (табл. 1). Кроме того, штамм хорошо обособляется от всех вышеперечисленных видов по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии (рис. 2) – метода с более высоким таксономическим разрешением, чем секвенирование 16S рРНК, и широко используемого для видовой идентификации бактерий (Mellmann et al., 2008; Seuylemezian et al., 2018). Максимальные показатели сходства, определенные с помощью программного обеспечения Bruker MALDI Biotyper между спектром штамма ВКМ Ас-1098D и спектрами типовых штаммов видов *Paenarthrobacter* (*P. ureafaciens* и *P. aurescens*), были ~1.75, что ниже значений, свойственных штаммам одного вида (≥ 2.0 ; Mellmann et al., 2008; рекомендация производителя). Таким образом, изученный штамм, по всей вероятности, является представителем нового вида, предварительно названного “*Paenarthrobacter pyridinovorans*”.

Галактоза, глюкоза, аминсахара и следовые количества маннозы обнаружены в кислотном гидролизате клеточной стенки (нисходящая хроматография на бумаге), в то время как фосфатсодержащие соединения не были выявлены (электрофорез). Аналогичные моносахариды обнаружены и в гидролизатах препарата гликополимеров, выделенных из клеточной стенки ВКМ Ас-1098D.

Полная структура гликополимера клеточной стенки “*Paenarthrobacter pyridinovorans*” ВКМ Ас-1098D установлена методами ЯМР-спектроскопии.

Спектр ЯМР ^{13}C (рис. 3) содержал в области резонанса аномерных атомов углерода два основных сигнала при δ_{C} 101.89 и 107.73 м.д. и несколько минорных. В других характеристических областях спектра имелись два основных сигнала атомов углерода, связанных с азотом при δ_{C} 55.14 и 56.23 м.д., один сигнал углерода со свободной гидроксильной группой при δ_{C} 61.80 м.д. и один – с замещенной гидроксильной группой при δ_{C} 70.26 м.д., данные АРТ-спектра. В аномерной области спектра ЯМР ^1H имелись два основных сигнала – уширенный синглет при δ_{H} 5.17 м.д. и дублет с КССВ 8 Гц при δ_{H} 4.79 м.д.

Следует также отметить, что в спектре ЯМР ^{31}P препарата обнаружено небольшое количество

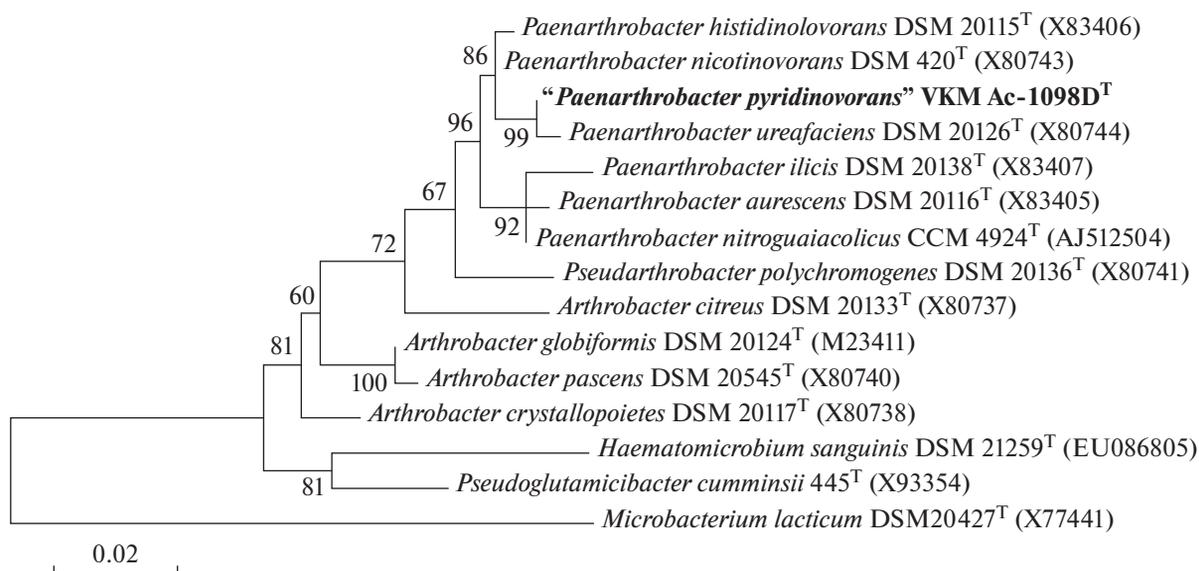


Рис. 1. Филогенетическое дерево на основе генов 16S рРНК, построенное по методу максимального правдоподобия (Maximum-likelihood), показывающее положение "*Paenarthrobacter pyridinovorans*" ВКМ Ас-1098D среди видов рода *Paenarthrobacter*. Числа в точках ветвления указывают на значения "bootstrap" >50% (1000 повторов). В качестве внешней группы использовали штамм *Microbacterium lacticum* DSM20427T-интекс, как на картинке (X77441). Масштаб – 0.02 замены на одно положение нуклеотидной последовательности.

гликозилфосфатных олигомеров, а в двумерных спектрах ^1H , ^{13}C HSQC и ^1H , ^{31}P НМВС присутствовали минорные сигналы в аномерной области ЯМР ^{13}C и ^1H спектров. Однако структуру этого полимера, ввиду его малого содержания в препарате и почти полного разрушения при выделении, установить средствами ЯМР-спектроскопии не представлялось возможным.

Сигналы преобладающего полимера были отнесены на основе анализа двумерных гомоядерных ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ^1H , ^{13}C HSQC и НМВС экспериментов.

Гомоядерные спектры выявили наличие в полимере остатков β -галактофуранозы (β -Gal f , А, А') и 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси- β -глюкопиранозы (β -Glc p NAc 3 NAc, В).

Анализ спектра ^1H , ^{13}C HSQC (рис. 4) показал, что большая часть остатков β -Gal f (примерно 80%) замещена в положения 2 и 6, меньшая часть – только в положение 6. Другие остатки были не замещены по гидроксилам у С-4 (δ_{C} 68.89 м.д.) или С-6 (δ_{C} 61.80 м.д.) и, следовательно, являлись терминальными.

Последовательность соединения остатков следует из анализа спектра ^1H , ^{13}C НМВС (рис. 5).

Таблица 1. Химические сдвиги в ^{13}C и ^1H ЯМР-спектрах для галактофурана из клеточной стенки "*Paenarthrobacter pyridinovorans*" ВКМ Ас-1098D

Остаток	Химические сдвиги (δ_{C} TSP –1.6 и δ_{H} TSP 0.00)					
	С-1 H-1	С-2 H-2	С-3 H-3	С-4 H-4	С-5 H-5	С-6 H-6,6'
$\rightarrow 6$ - β -D-Gal f -(1 \rightarrow) (А')	109.02 5.05	82.21 4.12	78.07 4.08	84.36 3.99	71.22 3.95	70.28 3.84, 3.62
$\rightarrow 6$ - β -D-Gal f -(1 \rightarrow) 2) (А)	107.73 5.17	89.69 4.24	77.08 4.06	84.46 3.97	71.02 3.86	70.28 3.84, 3.60
β -D-Glc p NAc 3 NAc-(1 \uparrow) (В)	101.89 4.79	55.14 ^{а,б} 3.73	56.23 ^{а,в} 3.97	68.89 3.53	78.30 3.54	61.80 3.92, 3.77

^а CH₃CON при δ_{C} 23.3, 23.4 и 176.8, 175.9 и δ_{H} 2.07. м.д.

^б NAc: δ_{C} 23.3 м.д.; 176.1 м.д.; δ_{H} 1.9 м.д.

^в NAc: δ_{C} 23.0 м.д.; 175.4 м.д.; δ_{H} 1.98 м.д.

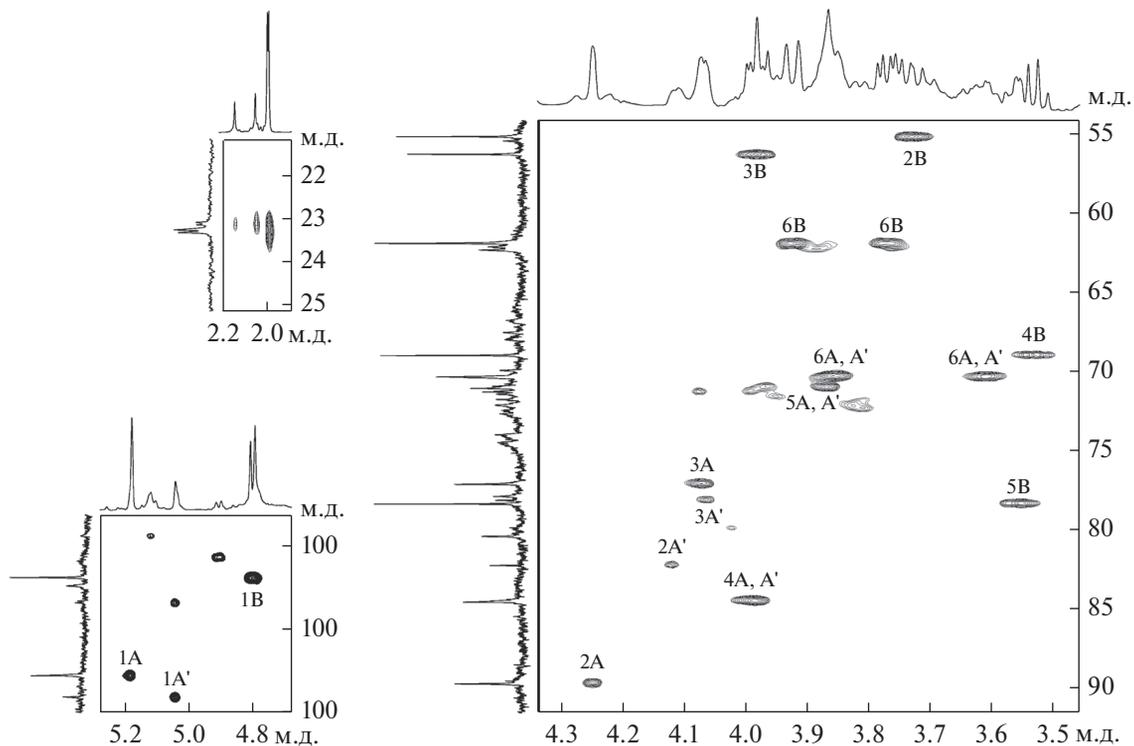


Рис. 4. Части двумерного ^1H , ^{13}C HSQC спектра галактофурана́на клеточной стенки “*Paenarthrobacter pyridinovorans*” ВКМ Ас-1098D. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены вверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей.

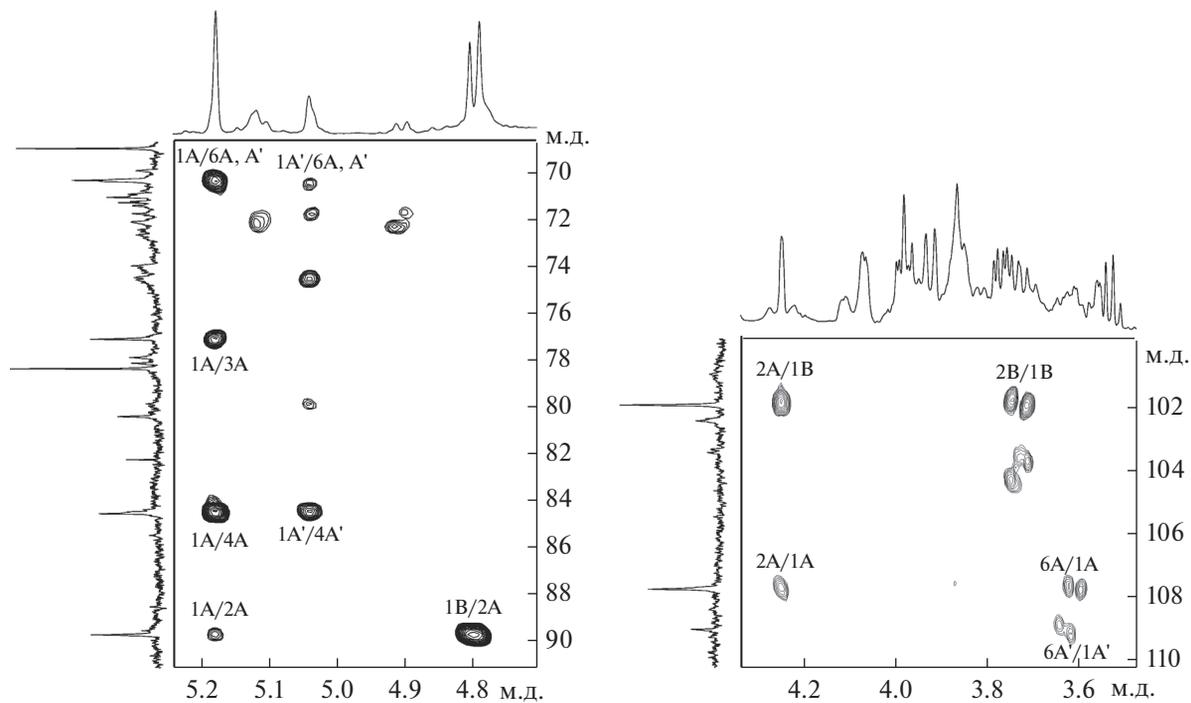


Рис. 5. Часть двумерного ^1H , ^{13}C HMBC спектра галактофурана́на клеточной стенки “*Paenarthrobacter pyridinovorans*” ВКМ Ас-1098D. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены вверху и слева от двумерного спектра. Арабские цифры до косой черты относятся к атомам протона, а после — к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены новые сведения о гликополимерах клеточных стенок бактерий. Как и другие виды рода *Paenarthrobacter* – *P. aurescens*, *P. histidinovorans* и *P. nicotinovorans* (Потехина и соавт., 2021), штамм “*Paenarthrobacter pyridinovorans*” ВКМ Ас-1098D характеризуется наличием в клеточной стенке галактофуранана с боковыми остатками диаминоглюкозы и имеет аналогичный набор сахаров (галактоза, глюкоза, аминсахар). Однако галактофуранан штамма ВКМ Ас-1098D с β -конфигурацией гликозидной связи остатка диаминоглюкозы (β -Glc_pNAc₃NAc) отличается от ранее описанного полисахарида *Paenarthrobacter* spp., который имеет α -конфигурацию диаминоглюкозы (α -Glc_pNAc₃NAc). Структуры галактофурананов, обнаруженных у штамма ВКМ Ас-1098D и трех видов *Paenarthrobacter*, не были описаны у других прокариот (<http://csdb.glycoscience.ru/>). Полученные в настоящей работе и ранее опубликованные данные свидетельствуют о том, что галактофуранан с боковыми остатками диаминоглюкозы может служить хемотаксономическим маркером рода *Paenarthrobacter*, а конфигурация гликозидной связи может являться особенностью предполагаемого нового вида.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1051) (анализ последовательности гена 16S рНК и MALDI-TOF масс спектры) и в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300094-7 (изучение структуры гликополимера).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Потехина Н.В., Шашков А.С., Тульская Е.М., Аришкина Е.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Галактофуранан клеточной стенки актинобактерий рода *Paenarthrobacter* // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 122–128.

Potekhina N.V., Shashkov A.S., Ariskina E.V., Tul'skaya E.M., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Cell wall galactofuranan of the *Paenarthrobacter* actinobacteria // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 106–111. <https://doi.org/10.1134/S0026261720060156>

Присяжная Н.В., Плотникова Е.Г., Буева О.В., Корсакова Е.С., Дорофеева Л.В., Ильина Е.Н., Лебедев А.Т., Евтушенко Л.И. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии для разграничения близкородственных видов филогенетической группы “*Arthrobacter crystallopoietes*” // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 696–701.

Prisyazhnaya N.V., Plotnikova E.G., Bueva O.V., Korsakova E.S., Dorofeeva L.V., I'ina E.N., Lebedev A.T., Evtushenko L.I. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for differentiation of closely related species of the “*Arthrobacter crystallopoietes*” phylogenetic group // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 754–759.

Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитриенко А.С., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискункова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Рамноманнаны и тейхуроновая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^T // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 428–437.

Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Piskunkova N.F., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Rhamnomannans and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 369–377.

Тульская Е.М., Шашков А.С., Стрешинская Г.М., Сенченкова С.Н., Потехина Н.В., Козлова Ю.И., Евтушенко Л.И. Тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты актиномицетов // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 904–913.

Tul'skaya E.M., Shashkov A.S., Streshinskaya G.M., Senchenkova S.N., Potekhina N.V., Kozlova Yu.I., Evtushenko L.I. Teichuronic and teichulosonic acids of Actinomycetes // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 736–744.

Busse H.J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 9–37.

Evtushenko L.I., Ariskina E.V. Nocardiodiaceae // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. 2015. P. 1–18. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00042>

Khasaeva F., Vasilyuk N., Terentyev P., Troshina M., Lebedev A.T. A novel soil bacterial strain degrading pyridines // Environ. Chem. Lett. 2011. V. 9. P. 439–445.

Kohler T., Xia G., Kulauzovic E., Peschel A. Teichoic acids, lipoteichoic acids, and related cell wall glycopolymers of Gram-positive bacteria // Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications / Eds. Moran A., Holst O., Brennan P., von Itzstein M. Amsterdam: Elsevier, 2009. P. 75–91.

Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., Lasala P., Kostrzewa M., Harmsen D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of non-fermenting bacteria // J. Clin. Microbiol. 2008. V. 46. P. 1946–1954. <https://doi.org/10.1128/JCM.00157-08>

Naumova I.B., Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Kozlova Yu.I., Potekhina N.V., Evtushenko L.I.,

- Stackebrandt E.* Cell wall teichoic acids: structural diversity, species-specificity in the genus *Nocardiopsis*, and chemotaxonomic perspective // *FEMS Microbiol Rev.* 2001. V. 25. P. 269–284.
- Nouioui I., Carro L., Garcia-Lopez M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpides N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Goker M.* Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 2007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
- Potekhina N.V., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Shashkov A.S.* Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria // *Taxonomy of Prokaryotes. Methods in Microbiology* / Eds. Rainey F.A., Oren A. London: Academic Press, 2011. V. 38. Ch. 6. P. 132–164.
- Ryzhmanova Y., Oshurkova V., Troshina O., Abashina T., Ariskina E., Avtukh A., Shcherbakova V.* *Anoxynatronum buryatiense* sp. nov., an anaerobic alkaliphilic bacterium from a low mineralization soda lake in Buryatia, Russia // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 4704–4709. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002365>
- Schumann P.* Peptidoglycan structure // *Taxonomy of Prokaryotes. Methods in Microbiology* / Eds. Rainey F.A., Oren A. London: Academic Press, 2011. V. 38. Ch. 6. P. 101–129.
- Schumann P., Kampfer P., Busse H.J., Evtushenko L.I.* Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder *Micrococccineae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 1823–1849.
- Seuylemezian A., Aronson H.S., Tan J., Lin M., Schubert W., Vaishampayan P.* Development of a custom MALDI-TOF MS database for species-level identification of bacterial isolates collected from spacecraft and associated surfaces // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 780.
- Tarlachkov S.V., Starodumova I.P.* TaxonDC: calculating the similarity value of the 16S rRNA gene sequences of prokaryotes or ITS regions of fungi // *J. Bioinform. Genom.* 2017. V. 3(5). <https://doi.org/10.18454/jbg.2017.3.5.1>

Cell Wall Galactofuranan of “*Paenarthrobacter pyridinovorans*” VKM Ac-1098D

N. V. Potekhina¹*, A. S. Shashkov², E. V. Ariskina³, N. V. Prisyazhnaya³, E. M. Tul'skaya¹, F. M. Khasaeva⁴, and L. I. Evtushenko³

¹*Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

²*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

³*Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

⁴*Kokov Kabardino-Balkarian State Agricultural University Nalchik, Kabardino-Balkarian Republic, 360030 Russia*

*e-mail: potekhina56@mail.ru

Received April 25, 2022; revised May 17, 2022; accepted May 19, 2022

Abstract—The structure of the cell wall glycopolymer and the taxonomic position of the pyridine degrading strain VKM Ac-1098D were established. By using chemical and NMR spectroscopic methods, the cell wall the glycopolymer was identified as 1,6-linked β-D-galactofuranan with side diaminoglucose residue (2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-β-glucopyranose, β-GlcpNAc3NAc). The polymer structure has been described in prokaryotes for the first time. The galactofuranan with a similar structure previously described in other *Paenarthrobacter* had a similar composition, but differed from the polymer of VKM Ac-1098D by the α-configuration of diaminoglucose (α-GlcpNAc3NAc) in the side chain. The results of the 16S rRNA gene sequence analysis and MALDI-TOF clustering showed that the strain represented a new species of the genus *Paenarthrobacter* named tentatively “*P. pyridinovorans*.” The data obtained in this and earlier works indicate that galactofuranan with diaminoglucose in the side chain may serve as a chemotaxonomic marker of the genus *Paenarthrobacter* and the α-configuration of the glycosidic bond of diaminoglucose may be a feature characteristic of the putative new species.

Keywords: *Paenarthrobacter*, galactofuranan, polysaccharide, cell wall, chemotaxonomy

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИБИОРЕМЕДИЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
НА БИОЧАРЕ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

© 2022 г. А. Ю. Муратова^а, *, Л. В. Панченко^а, Е. В. Дубровская^а, Е. В. Любунь^а, С. Н. Голубев^а,
И. Ю. Сунгурцева^а, А. М. Захаревич^б, Л. Р. Бикташева^с, П. Ю. Галицкая^с, О. В. Турковская^а

^а Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,
Саратов, 410049 Россия

^б Образовательно-научный институт наноструктур и биосистем Саратовского национального исследовательского
университета им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012 Россия

^с Институт экологии и природопользования, ФГАОУ ВО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”,
Казань, 420097 Россия

*e-mail: muratova_a@ibppm.ru

Поступила в редакцию 07.05.2022 г.

После доработки 19.05.2022 г.

Принята к публикации 20.05.2022 г.

Получена характеристика биопрепарата, созданного путем иммобилизации на древесном биочаре клеток бактерии *Azospirillum brasilense* SR80. При культивировании в жидкой среде исследована сорбционная способность биочара в отношении нефти и его колонизация азоспириллами. Выявлено уменьшение сорбции нефти биочаром в присутствии микробных клеток. Изучение влияния температурного режима (22–45°C) показало, что при 22°C биodeградация нефти эффективнее осуществлялась иммобилизованными на биочаре клетками, а при 38°C – суспендированными. Полученные данные подтверждены результатами почвенных экспериментов. В условиях лабораторного вегетационного эксперимента использование иммобилизованной на биочаре микробной культуры совместно с двумя видами растений – злаком сорго веничным (*Sorghum bicolor*) и бобовым люцерной серповидной (*Medicago falcata*) показало максимальную эффективность очистки почвы от нефти по сравнению с другими вариантами. При этом штамм-интродуцент *A. brasilense* SR80 демонстрировал высокую выживаемость в обрабатываемой почве в течение 2 мес., что было зарегистрировано с использованием молекулярно-биологических методов. В полевом опыте в реальных погодных условиях жаркого засушливого лета показана большая нефтеокисляющая активность суспендированных клеток азоспириллы по сравнению с иммобилизованными. Проведенные исследования показывают высокую степень зависимости биоремедиационных технологий от факторов окружающей среды и необходимость всестороннего изучения находящихся под их влиянием процессов.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, биочар, иммобилизованные клетки, нефтяные углеводороды, нефтезагрязненная почва

DOI: 10.31857/S0026365622100263

Загрязнение природных и хозяйственных объектов нефтяными углеводородами продолжает оставаться актуальной проблемой. Среди многочисленных методов, разработанных для очистки нефтезагрязненных почвенных экосистем, биоремедиация и фиторемедиация являются технологиями выбора для многих предприятий нефтехимического комплекса (Lim et al., 2016; ГОСТ Р 57447–2017). В основе этих технологий – использование метаболической активности живых организмов (бактерий, грибов, растений), направленной на трансформацию, деградацию и утилизацию нефтяных углеводородов. В биоремедиации нефтезагрязненной почвы используется два ос-

новных подхода: биостимуляция (стимуляция деструктивной активности аборигенной микрофлоры по отношению к поллютантам путем изменения физико-химических условий среды для оптимизации ее развития) и биоаугментация (интродукция в загрязненные объекты селекционированных штаммов микроорганизмов, способных разрушать опасные ксенобиотики) (Lim et al., 2016; Liu et al., 2020). Для биостимуляции применяют различные агротехнические и агрохимические приемы обработки почвы, которые включают в себя рыхление, внесение азотно-фосфорных удобрений, эмульгаторов нефтяных углеводородов, а также разнообразных структурато-

ров и дополнительных источников углерода для активизации процессов микробного кометаболизма (Lim et al., 2016). В последние годы для восстановления нефтезагрязненной почвы используется биочар — продукт пиролиза различных растительных остатков (Qin et al., 2013; Guirado et al., 2021; Wei et al., 2021; Guo et al., 2022). Биочар действует как эффективный сорбент загрязнителей, в том числе и нефти (Madhubashani et al., 2021), отмечается его положительный эффект на плодородие почвы и рост растений за счет снижения вымывания питательных веществ и улучшения их биодоступности (Tang et al., 2013). Кроме того, биочар может представлять собой матрицу для закрепления микробных клеток и их дальнейшего размножения с формированием биопленки и поэтому рассматривается как носитель для интродукции в загрязненную почву специализированных микроорганизмов-деструкторов с целью ее биоаугментации (Zhang et al., 2019; Gorovtsov et al., 2020; Li et al., 2020; Guo et al., 2022). Для биоаугментации нефтезагрязненных почв созданы и продолжают разрабатываться разнообразные биопрепараты на основе как монокультур, так и ассоциаций из нескольких специализированных микроорганизмов-деструкторов.

Азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum* — природные ассоцианты многих дикорастущих и культурных трав, произрастающих по всему миру, являются типичными представителями стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR). Ранее нами была показана нефтеокисляющая активность у бактерий этого рода (Муратова и соавт., 2005), подробно исследована деструктивная активность по отношению к различным нефтяным фракциям у штамма *A. brasilense* SR80 (Бондаренкова и соавт., 2009), а также оценена эффективность его использования в биоремедиации нефтезагрязненной почвы (Муратова и соавт., 2010). Позже биодеградация нефти азоспириллами была описана также и другими исследователями (Al-Mailem et al., 2014; Wu et al., 2021). Выявление нефтеокисляющего потенциала у азоспирилл позволяет рассматривать эти бактерии как потенциальные агенты биоремедиации загрязненной почвы и использовать их как самостоятельно, так и вместе с растениями.

Однако до настоящего времени исследований, посвященных нефтеокисляющим азоспириллам, иммобилизованным на каком-либо носителе, не обнаружено. Вместе с тем, есть данные об использовании штамма *Azospirillum*, иммобилизованного на лигните, для очистки сточных вод от фтора (Kulkarni et al., 2018). Рядом авторов показана принципиальная возможность иммобилизации азоспирилл на биочаре (Saranya et al., 2011a) и применения такого биопрепарата как структуратора, способствующего улучшению плодородия

почвы, и как фитостимулятора для усиления роста растений (Saranya et al., 2011b).

Целью настоящего исследования явилось получение иммобилизованного на биочаре препарата нефтеокисляющего штамма бактерий *Azospirillum brasilense* и апробация его использования для биоремедиации и фиторемедиации нефтезагрязненной почвы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Микроорганизмы и среды. В работе использовали штамм *Azospirillum brasilense* SR80 (IBPPM 24) из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>). Бактерии культивировали на LB-бульоне (Bertani, 1951) и среде Nfb (Dobereiner et al., 1979).

Древесный биочар. В экспериментах использовали коммерческий биочар (ООО “ДианаАгро”, Россия) из древесины березы. Для получения характеристик биочара, важных для его использования в качестве сорбента нефти и носителя для микробных клеток, определяли сорбционные свойства, размер его частиц, удельную поверхность, а также водородный показатель его водной вытяжки (рН). Определение сорбционных параметров биочара (статической обменной емкости, степени извлечения загрязнителя из воды) в отношении нефтепродуктов проводили по стандартной методике (СТО РосГео 08-002-98). Нефтеемкость биочара определяли отношением массы нефтепродуктов к массе биочара, потраченного на сорбцию, согласно (Каменщиков, Богомольный, 2005). Средний размер частиц и удельную поверхность биочара оценивали с использованием дифракционного анализатора ANALYSETTE 22 (“Fritsch GmbH”, Idar-Oberstein, Германия). Измерение рН проводили на приборе Mettler Toledo 320 (“Mettler Toledo Instruments”, Shanghai, Китай). Остаточное содержание полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в биочаре определяли путем экстракции хлороформом из гомогенизированного образца и ВЭЖХ анализа на хроматографе Dionex Ultimate 3000 (“Thermo Scientific”, США), оснащенном колонкой Acclaim 300 C18 и УФ-детектором (252 нм). Перед проведением экспериментов по иммобилизации биочар измельчали и просеивали через сито, получая фракцию 1 < 3 мм, и стерилизовали суховоздушным жаром при 160°C в течение 2 ч.

Для иммобилизации клеток штамма *A. brasilense* SR80 получали суточную культуру бактерий, выращенных в 1 л жидкой среды LB (Bertani, 1951) при 28°C, 120 об./мин. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об./мин в течение 20 мин, ресуспендировали физиологическим раствором и повторно центрифугировали при 9000 об./мин в

течение 10 мин. Из полученной микробной биомассы готовили густую суспензию, которую использовали для иммобилизации. В стерильные 100 мл колбы Эрленмейера, содержащие 50 мл среды LB, вносили 2.5 мл микробной суспензии, соответствующей 2.5 г влажной биомассы, и 2.5 г стерильного биочара. Колбы инкубировали 24 ч при 28°C в условиях аэрации на качалке при 120 об./мин, оценивая оптическую плотность культуральной жидкости каждые 2 ч, предварительно отделяя биочар фильтрованием. Степень иммобилизации клеток на биочаре (%) определяли по разнице оптической плотности контрольной культуры (без биочара) и планктонной в колбах с биочаром, вычисляя ее согласно (Li et al., 2017) по формуле: $(P_0 - P_1)/P_0 \times 100\%$, где P_0 – оптическая плотность (OD_{440}) контрольной бактериальной суспензии; P_1 – оптическая плотность планктонной культуры в колбах с биочаром. Численность иммобилизованных на биочаре микроорганизмов определяли стандартным методом высева на LB-агар десятикратных серийных разведений суспензий, приготовленных из гомогенизированного образца биочара с бактериями.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Образцы стерильного биочара и биочара с иммобилизованными микробными клетками, извлеченные из культуральной жидкости, высушивали в стерильных условиях, обезвоживали спиртом в возрастающих концентрациях и фиксировали 1% глутаровым альдегидом. Подготовленные образцы микроскопировали с использованием сканирующего (растрового) электронного микроскопа TESCAN MIRA II (Чехия). Исследования проводили на базе Образовательно-научного института наноструктур и биосистем Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского.

Биодеградацию нефти суспендированными и иммобилизованными на биочаре клетками штамма *A. brasilense* SR80 исследовали, культивируя бактерии в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды Nfb с нефтью или без нее. Для засева использовали 2-сут LB-агаровую культуру штамма *A. brasilense* SR80. Засев проводили до 0.5 ед. опт. пл., определяемой с использованием фотоэлектроколориметра при $\lambda = 440$ нм. После засева в половину колб добавляли стерильный биочар (1 г на 50 мл среды). Через 1 сут после засева в вариантах с биочаром наблюдалось просветление среды, что расценивали как иммобилизацию бактериальных клеток на носителе, в колбы добавляли 1% (об./об.) сырой нефти. Колбы с посевами культивировали в условиях аэрации на качалке при 120 об./мин в течение 14 сут при температуре 22, 30, 38 и 45°C. Дegradацию

нефти штаммом определяли весовым методом после культивирования и выражали в процентах.

Лабораторный вегетационный эксперимент. Эффективность очистки нефтезагрязненной почвы исследовали в лабораторных условиях с использованием биочара, суспендированных или иммобилизованных клеток *A. brasilense* SR80 и/или посева растений в различных сочетаниях. Эксперименты проводили с использованием каштановой почвы (N-NH₄ – 14.4 мг/кг; N-NO₃ – 10.7 мг/кг; P₂O₅ – 253.3 мг/кг; полная влагоемкость – 39%, pH – 7.2), отобранной в Энгельском районе Саратовской области. Почву просеивали через сито (размер ячеек 5 мм) и половину общего объема загрязняли нефтью (15 г/кг). Чистую и загрязненную почву фасовали в 1-л пластмассовые вегетационные сосуды, в которые через 5 сут вносили различные добавки: биочар (1% от веса почвы), суспендированные или иммобилизованные на биочаре клетки *A. brasilense* SR80 (не менее 10⁷ кл./г почвы) и проводили посев растений сорго веничного (*Sorghum bicolor* L. Moench, 15 семян/сосуд) и люцерны серповидной (*Medicago falcata* L., 20 семян/сосуд). Семена сорго были получены из ФГБНУ “Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока” (г. Саратов), люцерны – из агрофирмы “СеДеК”. Подготовку микробной суспензии и иммобилизованных на биочаре клеток *A. brasilense* SR80 для внесения в почву проводили, как описано выше. Все варианты опыта, описание которых представлено в результатах, были поставлены в трех повторностях. Опыты проводили в фитокмнате с контролируемыми условиями: температура 23–25°C, освещенность 8000 лк, продолжительность светового периода 14 ч, темнового – 10 ч. Полив осуществляли ежедневно отстоянной водопроводной водой до 50% от полной влагоемкости. Продолжительность эксперимента составляла 70 сут. Через 1 и 2 мес. культивирования проводили отбор образцов почвы из вариантов, содержащих микроорганизм-интродуцент, для мониторинга выживаемости штамма. По окончании эксперимента определяли концентрацию нефти в почве.

Мониторинг численности микроорганизма-интродуцента. Выделение и очистку почвенной ДНК проводили с использованием набора Fast DNA[®]SPIN Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) и гомогенизатора Fast Prep[®]24 (“MP Biomedicals”, США), согласно инструкциям производителя. Образцы до анализа хранили при температуре –20°C. Оценку численности интродуцированного штамма *A. brasilense* SR80 в образцах почвы (по три повторности на образец) осуществляли методом количественной ПЦР (кПЦР) с использованием специфичных праймеров 80-3F (5'-TC-CCAGCTCGCTTCTTCTGG-3') и 80-3R (5'-GCTGTCACGCAAAGTCCAT-3'), подобранных

с помощью онлайн-ресурса Primer-BLAST (Ye et al., 2012) на основе размещенного в NCBI генома этого микроорганизма (GCF_003584185.1). Размер получаемого ПЦР-продукта – 107 п.н. Реакционная смесь для амплификации содержала 5 ед./мкл SynTaq ДНК-полимеразы, 10× буфер с красителем SYBRGreen, 2 ммоль/л dNTP, по 1 мкмоль/л прямого и обратного праймеров и 1 мкл ДНК. Подготовленные образцы помещали в ПЦР анализатор CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad”, Munich, Германия). Амплификацию проводили в следующем режиме: 95°C – 5 мин, 39 циклов, включающих 95°C – 30 с, 62.4°C – 30 с, 72°C – 30 с. Для построения калибровочной кривой осуществляли клонирование целевого ПЦР-продукта в клетках *Escherichia coli*, применяя TA cloning kit (“Invitrogen”, “Thermo Fisher”, США) с векторной плазмидой pCR™2.1 (3900 п.н.) согласно инструкции производителя. Векторы со вставкой фрагмента генома *A. brasilense* SR80 экстрагировали с использованием Quick Plasmid Miniprep kit (“Invitrogen”, “Thermo Fisher”, США), а их концентрацию определяли с помощью флуориметра Qubit 3.0 (“Invitrogen”, “Thermo Fisher”, США) и Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (“Invitrogen”, “Thermo Fisher”, США). Поскольку размеры вектора и вставки известны, число копий клонированного фрагмента рассчитывали, исходя из концентрации плазмидной ДНК.

Микрополевой опыт проводили на южном черномоземе, на делянках размером 0.5 × 0.5 м² в период с мая по июль 2021 г. Варианты опыта включали в себя по отдельности и в сочетаниях следующие обработки: чистую и загрязненную нефтью (1% об./об.) почву, внесение биочара (0.5%) и без него, интродукцию суспендированных или иммобилизованных на биочаре клеток штамма *A. brasilense* SR80 (не менее 10⁷ кл./г почвы), посев растений (*S. bicolor* – 8 г/м² и *M. falcata* – 2 г/м²) и без них. Перед посевом растений в почву вносили аммиачную селитру (0.4 г/кг). Режим полива – в течение первых 21 сут поддерживали полевую влажность дополнительным поливом по мере необходимости, далее полив осуществлялся естественными осадками. За 70 сут проведения эксперимента среднесуточная температура воздуха составляла 18.9–24.5°C; температура на поверхности почвы – 23.1–29.9°C; температура грунта на глубине 10–20 см – 25.8–35.5°C; количество выпавших осадков – 152 мм. Все варианты опыта, описание которых представлено в результатах, проводили в трех повторностях.

Остаточное содержание нефти в жидкой среде после культивирования бактерий и в почве определяли гравиметрическим методом с предварительной экстракцией углеводов из образцов растворителем (ПНД Ф 16.1:2.2:2.3:3.64-10).

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили, вычисляя средние значения, для сравнения которых использовали показатели стандартного отклонения и доверительного интервала при $P \leq 0.05$. Вычисления проводили в программе Microsoft Excel 2007 (“Microsoft”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование бактериальных препаратов в виде клеток, сорбированных на том или ином носителе, целесообразно как с микробиологической, так и с технологической позиций. Иммобилизованные микроорганизмы находятся в состоянии биопленки, сохраняя свою жизнеспособность лучше, чем в суспензии. Это удобно и для хранения, и при внесении в загрязненную почву, где иммобилизация способствует поддержанию высокой численности интродуцента (Zhang et al., 2019).

Для получения иммобилизованных микробных клеток необходимым этапом является изучение характеристик носителя, предназначенного для создания биопрепарата. Имеющийся на отечественном рынке биочар различается по происхождению и свойствам, что требовало предварительной характеристики этого сорбента для иммобилизации бактерий-нефтедеструкторов.

Характеристика биочара. Анализ структурных характеристик и свойств поверхности материалов позволяет оценить эффективность их использования для иммобилизации микробных клеток и в процессах очистки от нефтепродуктов. Согласно результатам проведенных анализов, используемый в работе древесный биочар имел следующие характеристики: средний размер частиц составлял 15.7 мкм; концентрация исходной воды – 11.55 мг/г; рН водной вытяжки – 7.7; расчетная удельная поверхность – 75 м²/г, нефтеемкость – 1.2 г/г. Статическая емкость сорбента (максимальное количество вещества, поглощенного единицей объема или массы) составляла 0.57 мг/л. Степень извлечения (величина, показывающая, какая доля абсолютного количества вещества улавливается сорбентом, дающая достаточно полное представление о характере процесса) достигала максимального значения – 99.93%. Остаточное содержание ПАУ в биочаре составляло 10 мкг/г. Структура используемого в работе биочара представлена на микрофотографиях (рис. 1а и 1б), полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Полученные результаты показывают высокие характеристики биочара как сорбента нефтяных углеводов, а также носителя микробных клеток, о чем свидетельствует нейтральное значение его кислотности, большая удельная поверхность.

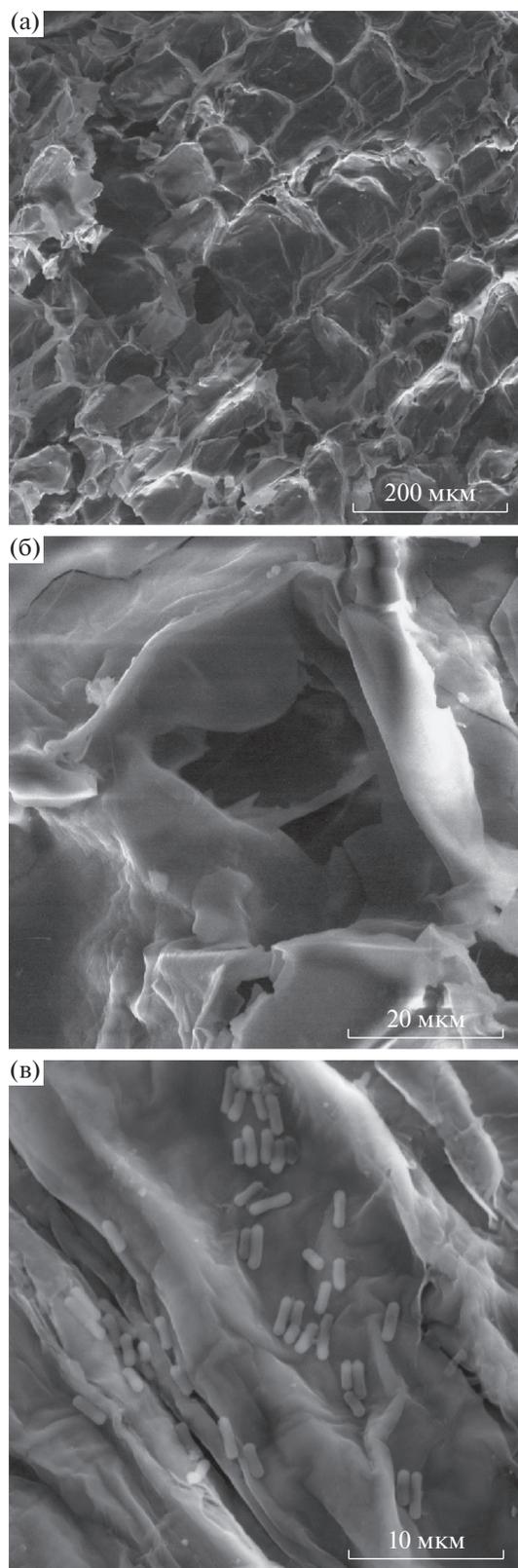


Рис. 1. Изображения стерильного древесного биочара (а, б) и иммобилизованных на нем клеток *A. brasilense* SR80 (в), полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии.

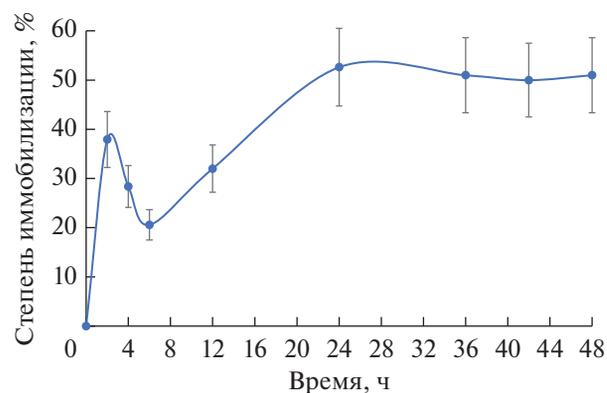


Рис. 2. Иммобилизация микробных клеток *A. brasilense* SR80 на биочаре.

Вместе с тем, потенциальные негативные побочные эффекты, связанные с наличием остаточного количества образовавшихся в процессе пиролиза ПАУ, должны быть учтены при использовании биочара в процессах биорекультивации.

Иммобилизация клеток *A. brasilense* SR80 на биочаре. Известно, что при колонизации корней растений пластичность генома азоспирилл позволяет им осуществлять переход от подвижного состояния суспендированных клеток к формированию биопленок (Mata et al., 2018). Способность к образованию биопленок должна была обеспечить успешную иммобилизацию *A. brasilense* SR80 на биочаре в условиях их совместного культивирования.

Из рис. 2 видно, что сорбция клеток *A. brasilense* SR80 на биочаре в условиях аэрации на качалке достигала 38% уже через 2 ч культивирования. В последующем временном интервале 2–6 ч наблюдалось снижение этого показателя, вероятно, за счет десорбции незакрепившихся клеток, после чего вновь отмечено повышение иммобилизации, по-видимому, связанное с освоением бактериями более глубокого пространства биочара. Через 24 ч эффективность иммобилизации составила 53%. Учет жизнеспособных микроорганизмов путем высева на питательную агаризованную среду показал, что численность иммобилизованных клеток *A. brasilense* SR80 при культивировании в среде LB в условиях аэрации на качалке достигала 9.3×10^9 КОЕ/г сухого биочара. С помощью сканирующей электронной микроскопии визуализировано присутствие бактериальных клеток на биочаре (рис. 1в).

Влияние иммобилизации и температуры на деградацию нефти штаммом *A. brasilense* SR80. Для сравнения эффективности деградации нефти суспендированными и иммобилизованными на биочаре клетками, а также определения влияния температуры, как фактора вероятного климатиче-

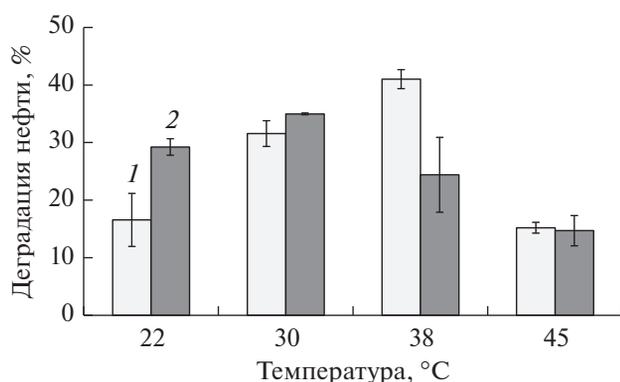


Рис. 3. Биодegradация нефти (1%) в жидкой среде суспендированными (1) и иммобилизованными на биочаре (2) клетками *A. brasilense* SR80 при разной температуре и аэрации на качалке в течение 14 сут.

ского воздействия на этот процесс, проводили культивирование бактерий *A. brasilense* SR80 в жидкой минеральной среде с нефтью с добавлением биочара и без него при температуре 22, 30, 38 и 45°C.

В ходе эксперимента наблюдались особенности физико-химических взаимодействий в системе “вода–нефть–биочар” и “вода–нефть–биочар–микробные клетки”. В стерильных условиях биочар эффективно сорбировал нефть из среды, не оставляя ее свободных капель ни в среде, ни на стенках колбы. В присутствии бактерий взаимодействие нефти с биочаром нарушалось: микробные клетки предотвращали сорбцию нефти на биочаре, что предположительно может быть связано с изменением физико-химических свойств как самой нефти, так и сорбента под действием бактерий (Gorovtsov et al., 2020). На наш взгляд, основной причиной снижения адсорбции нефти на биочаре является продукция эмульгаторов и биотрансформация/биодegradация основных компонентов нефти исследуемым микроорганизмом. Ранее у штамма *A. brasilense* SR80 была обнаружена эмульгирующая активность по отношению к минеральному маслу ($E_{48} = 52\%$), и охарактеризована деградация сырой нефти (Бондаренкова и соавт., 2009), что подтверждает метаболическую активность исследуемого штамма в отношении нефтяного субстрата. Такая деятельность бактерии может влиять на гидрофобность нефти и поверхности биочара, способствовать изменению заряда на поверхности сорбента и поляризации компонентов нефти, снижая гидрофобное и электростатическое притяжение углеводородного загрязнителя. Образующие в результате микробной деградации углеводов полярные метаболиты так же могут изменять электрофильные и донорно-акцепторные электронные взаимодействия между биочаром и

нефтью. Таким образом, использование биочара с иммобилизованными на нем клетками *A. brasilense* SR80 снижает его сорбционные свойства по отношению к нефти, по крайней мере, в жидкой среде, что вызывает сомнение в перспективности использования иммобилизованного на биочаре *A. brasilense* SR80 для очистки воды от углеводородного загрязнения. Вместе с тем, в почвенной среде имеют место иные взаимодействия и эффекты. Так, ранее было показано, что по сравнению с жидкими средами значения гидрофобности и заряда поверхности клеток азоспирилл на твердых поверхностях были выше (Castellanos et al., 1997). Учитывая, что эти параметры важны для адсорбции микробных клеток на той или иной матрице, можно предположить, что и колонизация биочара и взаимодействия азоспириллы с нефтью в условиях почвы могут быть иными.

Количественные характеристики процесса биодegradации сырой нефти суспендированными и иммобилизованными клетками штамма *A. brasilense* SR80, исследованные в водной среде при различной температуре, представлены на рис. 3. Из гистограммы видно, что и биочар, и температура оказывали выраженный эффект на деградацию нефти штаммом. Как суспендированные, так и иммобилизованные клетки бактерии демонстрировали сходную тенденцию изменения деструктивной активности в зависимости от температуры. Ожидаемо биодegradация нефти штаммом была минимальной (15–17%) при крайних значениях температуры (22 и 45°C), тогда как максимальная деградация нефти суспендированными клетками наблюдалась при 38°C, а для иммобилизованных при 30°C.

При температурах 22 и 30°C использование биочара сопровождалось увеличением биодegradации нефти до 29 и 35% соответственно относительно суспендированных клеток. Иммобилизация микроорганизмов на материале носителя увеличивает площадь контакта и количество клеток, обеспечивая более интенсивную деградацию нефти. Есть данные, свидетельствующие об увеличении адгезии клеток азоспирилл на поверхности полистирола с повышением температуры до 30°C (Dufrene et al., 1996). Усиление деградации нефти в жидкой среде показано при иммобилизации клеток нефтеструктуров *Corynebacterium variabile* (Zhang et al., 2016), *Vibrio* sp. (Zhou et al., 2021). В нашем случае, при 30°C эффект биочара уже был менее выраженным по сравнению с отмеченным при 22°C, и эффективность деградации нефти иммобилизованными клетками *A. brasilense* SR80 была сопоставима с таковой суспендированных (35 и 32% соответственно). При температуре 38°C эффект биочара менялся на противоположный: деградация нефти суспендированными клетками *A. brasilense* SR80 увеличилась до 41%, а иммобилизованными – снижа-

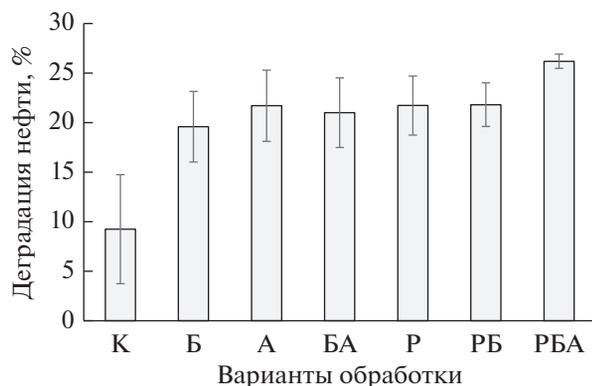


Рис. 4. Деградация нефти в условиях лабораторного эксперимента в контрольной необработанной почве (К) и при биоаугментации почвы бактериями *A. brasilense* SR80 (А) в присутствии биочара (Б) и/или растений (*S. bicolor* L. Moench и *M. falcata* L.) (Р) и их комбинаций.

лась до 24%. При 45°C эффект биочара полностью нивелировался, а деструктивная активность штамма снижалась до минимальных значений, что связано с торможением роста штамма при таком температурном режиме. Известно, что температурный оптимум для роста большинства азоспирилл составляет 30–37°C, тогда как при 45°C рост этих бактерий подавляется, как это было показано в работе Verma et al. (2011) на выборке из 30 штаммов бактерий этого рода.

Полученные результаты согласуются с данными ранее опубликованного исследования, посвященного использованию иммобилизованного на древесном поровом носителе лигните штамма бактерий *Azospirillum* для очистки сточных вод от фтора (Kulkarni et al., 2018). Авторы показали, что максимальное удаление фтора наблюдалось при 30°C, а с повышением температуры эффективность очистки воды снижалась, что могло быть связано с уменьшением количества активных центров адсорбента и ослаблением адсорбционных сил между поверхностью лигнита (содержащего азоспириллу или без микроорганизма) и ионами фтора. Несмотря на то, что указанное исследование проводилось с минеральным водорастворимым загрязнителем воды, можно считать, что повышение температуры для системы “вода–биочар–нефть–микроорганизм” также может приводить к изменению и ослаблению гидрофобности, зарядов поверхностей компонентов системы, а, следовательно, и к снижению сорбции биочаром как нефти, так и микробных клеток.

Использование иммобилизованных на биочаре микробных клеток для ремедиации нефтезагрязненной почвы в условиях лабораторного эксперимента. Возможность и целесообразность использования нефтеокисляющего потенциала азоспирилл в со-

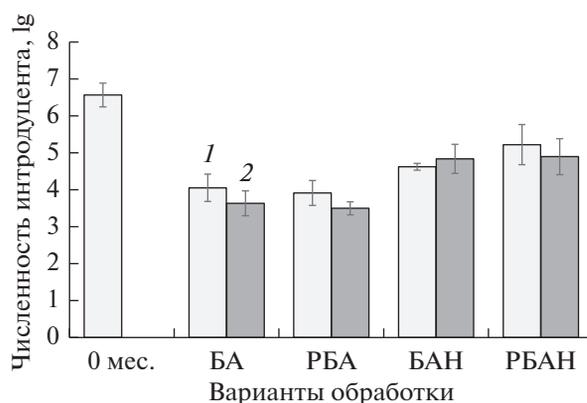


Рис. 5. Численность интродуцированного штамма *A. brasilense* SR80 в почве в присутствии биочара (Б) и/или растений (Р, *S. bicolor* L. Moench и *M. falcata* L.) и нефти (Н, 10 г/л) через 1 мес. (1) и 2 мес. (2) культивирования в условиях лабораторного эксперимента.

четании с растениями-фиторемедиантами подтверждается результатами предыдущих исследований, свидетельствующих о стимуляции азоспириллами роста растений, выращиваемых в нефтезагрязненной среде (Муратова и соавт., 2005, 2010; Бондаренкова и соавт., 2009). Учитывая также положительные свойства биочара как структуратора почвы, способствующего росту растений (Tang et al., 2013), в условиях лабораторного эксперимента был исследован эффект применения иммобилизованного на биочаре штамма *A. brasilense* SR80 совместно с растениями и без них для очистки почвы от нефти.

Анализ результатов такого исследования (рис. 4) показал, что выращивание растений сорго веничного и люцерны серповидной в нефтезагрязненной почве, предварительно обработанной биочаром с иммобилизованной на нем азоспириллой (в концентрации 1% от веса сухой почвы), увеличивало деградацию загрязнителя на 5% по сравнению с вариантом без растений (21.0%) или использованием только растений (по 21.7%), достигнув эффективности 26.2% за 70 сут культивирования.

Мониторинг микроорганизма-интродуцента в почве показал (рис. 5), что, несмотря на ожидаемое снижение исходной численности клеток бактерии (10^7 КОЕ/г почвы) на протяжении двухмесячного лабораторного эксперимента, азоспирилла демонстрировала высокую выживаемость, как в чистой, так и в нефтезагрязненной почве — (10^4 – 10^5 — через 1 мес., 10^3 – 10^4 КОЕ/г — через 2 мес.). На численность *A. brasilense* SR80 в почве стимулирующее влияние оказывала нефть, а также присутствие растений.

Использование иммобилизованных на биочаре микробных клеток для ремедиации нефтезагрязнен-

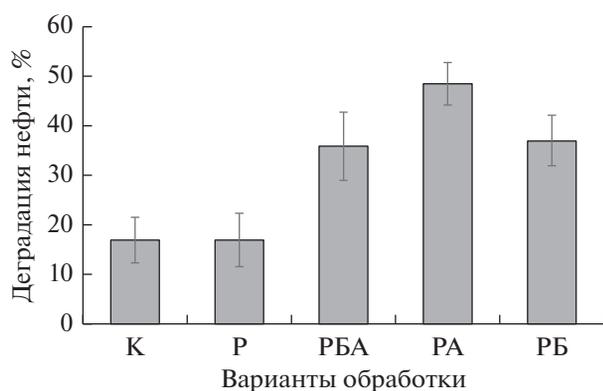


Рис. 6. Дегградация нефти в условиях микрополевого опыта в контрольной необработанной почве (К) и при биоаугментации почвы бактериями *A. brasilense* SR80 (А) в присутствии биочара (Б) и/или растений (Р, *S. bicolor* L. Moench и *M. falcata* L.).

ной почвы в условиях микрополевого опыта. Возможность использования штамма *A. brasilense* SR80 в суспендированном и иммобилизованном на биочаре состоянии для рекультивации почвы, загрязненной нефтью (10 г/кг), исследовали в микрополевом опыте с использованием растений-фиторемедиантов (*S. bicolor* и *M. falcata*). Полученные результаты отражены на рис. 6.

Как видно из гистограммы, культивирование только одних растений не приводило к эффективной очистке почвы – снижение концентрации нефтяных углеводородов было сопоставимо с таковым в необработанном контроле (17%), тогда как внесение в почву биочара и *A. brasilense* SR80 оказывало решающее значение для ее ремедиации. Так, использование с растениями биочара увеличивало дегградацию нефти до 37%. Схожая эффективность очистки показана в варианте с внесением иммобилизованных на биочаре азоспирилл (36%). Максимальная биодеградация нефти (более 48%) достигалась при использовании растений и неиммобилизованных бактерий. Учитывая жаркое засушливое лето в регионе, где в период проведения эксперимента среднесуточная температура грунта на глубине 10–20 см достигала 35.5°C, полученные результаты подтверждают выявленную ранее большую нефтеокисляющую активность суспендированных клеток по сравнению с иммобилизованными при повышенной температуре.

Полученные нами результаты сопоставимы с данными работы (Zhang et al., 2019), в которой использовали штамм-нефтедеструктор *Microbacterium* sp., иммобилизованный на биочаре, полученном из грибного мицелия, для очистки нефтезагрязненной почвы. Через 60 сут эксперимента этот вариант показал наибольшее снижение содержания загрязнителя (58.1% от исходной кон-

центрации 47.7 г/кг) в почве по сравнению с неиммобилизованными бактериями (38.6%) и с одним биочаром (29.9%). Отметим, что в приведенном эксперименте доза вносимого в почву биочара составляла 5% (вес/вес), а доза микроорганизма – 10% (объем/вес), что практически не рентабельно для каких-либо полевых испытаний. В работе (Li et al., 2020) исследована эффективность очистки почвы от комплексного загрязнения нефтяными углеводородами и никелем с использованием устойчивого к никелю штамма *Citrobacter* sp., иммобилизованного на кукурузном биочаре. Через 50 сут эксперимента эффективность очистки почвы с использованием иммобилизованного на биочаре штамма, суспендированных микробных клеток, одного биочара и в контроле составила 45.5, 30.1, 25.9 и 18.5% соответственно при уровне загрязнения нефтью 16 г/кг. Доза внесения биочара составляла 3%, а бактерий – 10⁷ КОЕ/г почвы (Li et al., 2020). Синергический эффект от использования биоаугментации в сочетании с биочаром, приводящий к высокоэффективной и экологически безопасной биоремедиации нефтезагрязненной почвы, отмечается многими исследователями (Wei et al., 2021; Guo et al., 2022). Иммобилизованный на биочаре бактериальный консорциум (*Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* и *Sphingomonas* sp.) обладал синергическим механизмом биоаугментации и биостимуляции при очистке почвы от нефти, снижая исходную концентрацию загрязнителя (44.3 г/кг) на 78.3% за 28 сут (Wei et al., 2021). Упомянется, что эффективность использования неиммобилизованного консорциума и биочара без бактерий достигала 60.3 и 45.8% соответственно. Для очистки нефтезагрязненной почвы были успешно применены также иммобилизованные на пшеничном биочаре бактерии *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Sphingobacterium* (Guo et al., 2022).

Работы с использованием иммобилизованных на биочаре микроорганизмов-нефтедеструкторов в сочетании с растениями немногочисленны. В экспериментах (Ali et al., 2021) исследована эффективность очистки почвы от дизельного топлива (1% вес/об.) с помощью растения кукурузы (*Zea mays* L.), биочара и нефтеокисляющего штамма *Bacillus* sp. МН54 в течение 90 сут. Применение биочара и штамма-нефтедеструктора с растениями увеличивало биодеградацию нефти до 77% по сравнению с использованием только одной кукурузы (46%). Однако в этом исследовании бактерии не иммобилизовали на биочаре, а инокулировали ими семена растений, с которыми вносили биочар.

Сопоставление полученных в настоящей работе результатов с имеющимися в литературе данными показывает перспективность направления

этих исследований, поскольку сочетает в себе необходимые элементы зеленой технологии.

Таким образом, в ходе проведенного исследования дана характеристика иммобилизации клеток стимулирующего рост растений штамма *Azospirillum brasilense* SR80, обладающего нефтеокисляющей активностью, на коммерческом древесном биочаре, используемом в качестве сорбента для нефтяного загрязнения и структуратора, позволяющего улучшить физико-химические характеристики грунта. Изучение биодеградации нефти в водной среде показало, что при температуре 22°C процесс осуществляется эффективнее иммобилизованными клетками *A. brasilense* SR80, а при 38°C — планктонными. В лабораторном эксперименте использование растений *Sorghum bicolor* и *Medicago falcata* в сочетании с иммобилизованным на биочаре штаммом *A. brasilense* SR80 способствовало выживаемости штамма-интродукта в почве и позволяло достичь ее максимальной очистки в сравнении с другими приемами ремедиации. В полевом опыте в условиях жаркого засушливого лета показана большая нефтеокисляющая активность суспендированных клеток по сравнению с иммобилизованными. В целом, проведенные исследования продемонстрировали возможность применения бактерий рода *Azospirillum* как в суспендированном, так и в иммобилизованном на биочаре состоянии для восстановления нефтезагрязненной почвы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность специалистам портала Climate-Energy.ru (<https://climate-energy.ru>) за предоставление данных о метеорологической ситуации в г. Саратове в период проведения микрополевого опыта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы госзадания № 121031700141-7 и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-05062).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бондаренкова А.Д., Муратова А.Ю., Турковская О.В. Влияние нефти на ассоциативную ризобактерию *Azospirillum brasilense* // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. 2009. № 9. С. 5–10.
- ГОСТ Р 57447-2017. Наилучшие доступные технологии. Рекультивация земель и земельных участков, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. М.: Стандартинформ, 2017. 25 с.
- Каменищikov Ф.А., Богомольный Е.И. Нефтяные сорбенты. М.-Ижевск: НИЦ Регулярная и хаотическая динамика, 2005. 268 с.
- Муратова А.Ю., Бондаренкова А.Д., Панченко Л.В., Турковская О.В. Использование комплексной фиторемедиации для очистки почвы, загрязненной нефтешламом // Биотехнология. 2010. № 1. С. 77–84.
- Muratova A.Yu., Bondarenkova A.D., Panchenko L.V., Turkovskaya O.V. Use of integrated phytoremediation for cleaning-up of oil-sludge-contaminated soil // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 789–794.
- Муратова А.Ю., Турковская О.В., Антонюк Л.П., Макаров О.Е., Позднякова Л.И., Игнатов В.В. Нефтеокисляющий потенциал ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 248–254.
- Muratova A.Yu., Turkovskaya O.V., Antonyuk L.P., Makarov O.E., Pozdnyakova L.I., Ignatov V.V. Oil-oxidizing potential of associative rhizobacteria of the genus *Azospirillum* // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 210–215.
- ПНД Ф 16.1:2.2.2.3:3.64-10 Методика измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв, грунтов, донных отложений, илов, осадков сточных вод, отходов производства и потребления гравиметрическим методом. М., 2010.
- РосГео С. Т. О. 08-002-98 Технологические методы исследования минерального сырья. М.: Изд-во РосГео, 1998.
- Ali M.H., Khan M.I., Bashir S., Azam M., Naveed M., Qadri R., Bashir S., Mehmood F., Shoukat M.A., Li Y., Alkahtani J., Elshikh M.S., Dwiningsih Y. Biochar and *Bacillus* sp. MN54 assisted phytoremediation of diesel and plant growth promotion of maize in hydrocarbons contaminated soil // Agronomy. 2021. V. 11. Art. 1795.
- Al-Mailem D.M., Kansour M.K., Radwan S.S. Bioremediation of hydrocarbons contaminating sewage effluent using man-made biofilms: effects of some variables // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. V. 174. P. 1736–1751.
- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1951. V. 62. P. 293–300.
- Castellanos T., Ascencio F., Bashan Y. Cell-surface hydrophobicity and cell-surface charge of *Azospirillum* spp. // FEMS Microbiol. Ecol. 1997. V. 24. P. 159–172.
- Dobereiner J., Baldani V.L.D. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria // Can. J. Microbiol. 1979. V. 25. P. 1264–1269.
- Dufrene Y.F., Vermeiren H., Vanderleyden J., Rouxhet P.G. Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion of *Azospirillum brasilense* // Microbiology (SGM). 1996. V. 142. P. 855–865.

- Gorovtsov A.V., Minkina T.M., Mandzheva S.S., Perelomov L.V., Soja G., Zamulina I.V., Rajput V.D., Sushkova S.N., Mohan D., Yao J. The mechanisms of biochar interactions with microorganisms in soil // *Environ. Geochem. Health*. 2020. V. 42. P. 2495–2518.
- Guo S., Liu X., Tang J. Enhanced degradation of petroleum hydrocarbons by immobilizing multiple bacteria on wheat bran biochar and its effect on greenhouse gas emission in saline-alkali soil // *Chemosphere*. 2022. V. 286. Art. 131663.
- Kulkarni K., Bhogale G.M., Nalawade R. Adsorptive removal of fluoride from water samples using *Azospirillum* biofertilizer and lignite // *Korean J. Chem. Eng.* 2017. V. 35. P. 153–163.
- Li X., Wang Y., Luo T., Ma Y., Wang B., Huang Q. Remediation potential of immobilized bacterial strain with biochar as carrier in petroleum hydrocarbon and Ni co-contaminated soil // *Environ. Technol.* 2020. V. 14. P. 1–31.
- Li Z., Zhang X., Xiong X., Zhang B., Wang L. Determination of the best conditions for modified biochar immobilized petroleum hydrocarbon degradation microorganism by orthogonal test // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2017. V. 94. Art. 012191.
- Lim M.W., Lau E.V., Poh P.E. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil – Present works and future directions // *Mar. Pollut. Bull.* 2016. V. 109. P. 14–45.
- Liu H., Tan X., Guo J., Liang X., Xie Q., Chen S. Bioremediation of oil-contaminated soil by combination of soil conditioner and microorganism // *J. Soils Sediments*. 2020. V. 20. P. 2121–2129.
- Madhubashani A.M.P., Giannakoudakis D.A., Amarasinghe B.M.W.P.K., Rajapaksha A.U., Pradeep Kumar P.B.T., Triantafyllidis K.S., Vithanage M. Propensity and appraisal of biochar performance in removal of oil spills: a comprehensive review // *Environ. Pollut.* 2021. V. 288. Art. 117676.
- Mata A.R., Pacheco C.M., Cruz Pérez J.F., Sáenz M.M., Baca B.E. *In silico* comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes // *BMC Microbiology*. 2018. V. 18. P. 20.
- Qin G., Gong D., Fan M.-Y. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar // *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2013. V. 85. P. 150–155.
- Saranya K., Krishnan P.S., Kumutha K., French J. Biochar as an alternate carrier to lignite for the preparation of biofertilizers in India // *Int. J. Curr. Res.* 2011a. V. 33. № 5. P. 009–013.
- Saranya K., Kumutha K., Krishnan P.S. Influence of biochar and *Azospirillum* application on the growth of maize // *Madras Agric. J.* 2011b. V. 98. P. 158–164.
- Tang J., Zhu W., Kookana R., Katayama A. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil // *J. Biosci. Bioeng.* 2013. V. 116. P. 653–659.
- Verma R., Chourasia S.K., Jha M.N. Population dynamics and identification of efficient strains of *Azospirillum* in maize ecosystems of Bihar (India) // *3 Biotech.* 2011. V. 1. P. 247–253.
- Wei X., Peng P., Meng Y., Li T.T., Fan Z.P., Wang Q., Chen J.B. Degradation performance of petroleum-hydrocarbon-degrading bacteria and its application in remediation of oil contaminated soil // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2021. V. 766. Art. 012096.
- Wu D., Zhang X.J., Liu H.C., Zhou Y.G., Wu X.L., Nie Y., Kang Y.Q., Cai M. *Azospirillum oleiclasticum* sp. nov., a nitrogen-fixing and heavy oil degrading bacterium isolated from an oil production mixture of Yumen Oilfield // *Syst. Appl. Microbiol.* 2021. V. 44. Art. 126171.
- Zhang H., Tang J., Wang L., Liu J., Gurav R.G., Sun K. A novel bioremediation strategy for petroleum hydrocarbon pollutants using salt tolerant *Corynebacterium variabile* HRJ4 and biochar // *J. Environ. Sci. (China)*. 2016. V. 47. P. 7–13.
- Zhang B., Zhang L., Zhang X. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar // *RSC Advances*. 2019. V. 9. P. 35304–35311.
- Zhou H., Jiang L., Li K., Chen C., Lin X., Zhang C., Xie Q. Enhanced bioremediation of diesel oil-contaminated seawater by a biochar-immobilized biosurfactant-producing bacteria *Vibrio* sp. LQ2 isolated from cold seep sediment // *Sci. Tot. Environ.* 2021. V. 793. Art. 148529.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinform.* 2012. V. 13. Art. 134.

Bioremediation Potential of Biochar-Immobilized Cells of *Azospirillum brasilense*

A. Yu. Muratova¹*, L. V. Panchenko¹, E. V. Dubrovskaya¹, E. V. Lyubun¹, S. N. Golubev¹, I. Yu. Sungurtseva¹, A. M. Zakharevich², L. R. Biktasheva³, P. Yu. Galitskaya³, and O. V. Turkovskaya¹

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

²*Education and Research Institute of Nanostructures and Biosystems, Saratov State University, Saratov, 410012 Russia*

³*Institute of Environmental Sciences, Kazan Federal University, Kazan, 420097 Russia*

*e-mail: muratova_a@ibppm.ru

Received May 7, 2022; revised May 19, 2022; accepted May 20, 2022

Abstract—A biopreparation consisting of the cells of *Azospirillum brasilense* strain SR80 immobilized on wood biochar was characterized. Sorption of oil by biochar and its colonization by *Azospirillum* were studied in liquid medium. Oil sorption by biochar was found to decrease in the presence of microbial cells. Within the 22–45°C temperature range, the highest oil biodegradation efficiency by biochar-immobilized and suspended

cells was observed at 22 and 38°C, respectively. These data were confirmed by soil experiments. Under conditions of a laboratory pot experiments, the biochar-immobilized microbial culture in combination with two plants (*Sorghum bicolor* and *Medicago falcata*) exhibited the highest oil removal efficiency compared to other variants. The introduced strain *A. brasilense* SR80 exhibited high survival in tilled soil during two-month incubation, as was confirmed by molecular biological assays. Suspended *Azospirillum* cells exhibited higher oil-oxidizing activity than the immobilized ones in a field experiment under real-life conditions of a hot dry summer. The present work shows high dependence of bioremediation technologies upon environmental factors and indicates the need for thorough investigation of the processes involved.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, biochar, immobilized cells, oil hydrocarbons, oil-contaminated soil

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ *COELASTRELLA MULTISTRIATA*
(SPHAEROPLEALES, CHLOROPHYTA) В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ© 2022 г. С. Ю. Мальцева^а, М. С. Куликовский^а, Е. И. Мальцев^а, *^аИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276 Россия

*e-mail: ye.maltsev@gmail.com

Поступила в редакцию 13.04.2022 г.

После доработки 26.04.2022 г.

Принята к публикации 10.05.2022 г.

Исследовано функциональное состояние накопительной культуры зеленой водоросли *Coelastrella multistriata* (Trenkwalder) Kalina et Puncsochánová в течение 60-суточного культивирования. Установлено содержание хлорофиллов *a*, *b* и *c*, суммарных каротиноидов, протеина, витаминов А и Е. Дана оценка интенсивности процессов перекисного окисления липидов в клетках штамма *C. multistriata* MZ–Ch23 по содержанию продуктов перекисной окисления, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой. Определение этих продуктов проводили в биомассе микроводоросли на 15, 25 и 60 сут культивирования на среде BBM, а также после инициации перекисного окисления Fe²⁺. Среди фотосинтетических пигментов максимальное содержание показано для хлорофилла *a* во время экспоненциальной фазы роста – 14.82 мг/г сухой биомассы. Суммарное количество каротиноидов было сопоставимо с другими исследованными штаммами *Coelastrella* – в диапазоне 0.74–4.21% сухой массы. Для штамма MZ–Ch23 отмечена способность накапливать в высоких концентрациях ретинол (170.49–586.09 мкг/л культуры водоросли) и протеин (141.81–212.38 мг/л). Обнаружено, что во время всех фаз культивирования клетки *C. multistriata* характеризуются низкой концентрацией продуктов перекисного окисления липидов (0.005–0.015 нмоль/мг протеина), однако инициация перекисного окисления увеличивает количество ТБК-активных продуктов до 0.187 нмоль/мг протеина на 60 сут. Оптимальной стратегией для получения обогащенной вторичными метаболитами и устойчивой к перекисному окислению биомассы *C. multistriata* является культивирование на среде BBM в течении 25 сут. Это позволяет получать достаточное количество биомассы с высоким содержанием каротиноидов, протеина и витамина А.

Ключевые слова: витамины, зеленые водоросли, каротиноиды, протеин, тиобарбитуратактивные продукты, хлорофилл

DOI: 10.31857/S0026365622100299

Активное изучение возможности широкого использования водорослей в разных сферах биотехнологии (косметологии, сельском хозяйстве, производстве биотоплива) предполагает, что их биомасса станет очень ценным сырьем, т.к. водоросли не только способны накапливать значительные количества вторичных метаболитов, но и позволяют снизить площади задействованных сельскохозяйственных земель (Мокросноп, Золотарева, 2014; Maltsev et al., 2017; Jain et al., 2020). При этом разные таксономические группы водорослей могут решать различные биотехнологические задачи. Зеленые одноклеточные микроводоросли могут с успехом использоваться из-за быстрого ро-

ста в фотоавтотрофных условиях, высокого содержания насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, способности продуцировать большое количество триацилглицеринов (Hu et al., 2013; Maltsev et al., 2019, 2021c). Среди зеленых микроводорослей наиболее часто в качестве модельных объектов для определения биохимических характеристик и изучения продуктивности используются представители рода *Coelastrella* Chodat. Виды *Coelastrella* – это преимущественно одиночные, яйцевидной или эллипсоидной формы клетки с относительно толстой клеточной стенкой и многочисленными ребрами на ее поверхности, пристенным дольчатым хлоропластом и одним пиреноидом с крахмальной оберткой (Chodat, 1922). Среди основных биотехнологических преимуществ штаммов *Coelastrella* можно выделить: 1) способность одновременно накапливать большие концентрации липидов и каротиноидов (Abe et al., 2007; Minyuk et al., 2016, 2017); 2) высокое содер-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; Кар – содержание каротиноидов; ТБК-АП – продукты перекисного окисления липидов, которые определяются тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты); Хл *a* – хлорофилл *a*; Хл *b* – хлорофилл *b*; Хл *c* – хлорофилл *c*.

жание витамина Е в биомассе (Mudimu et al., 2017); 3) растительный источник омега-3 полиненасыщенных жирных кислот с концентрацией более 50% (Lang et al., 2011; Maltsev et al., 2021a); 4) применение в очистке сточных вод сельского хозяйства (Li et al., 2018); 5) возможно получение из клеточных липидов высококачественного биодизеля, соответствующего стандарту EN14214 (Minyuk et al., 2017).

Клеточный метаболизм в нормальных и стрессовых условиях в различных клеточных компартаментах производит АФК, которые могут повредить клеточные биомолекулы, включая липиды, белки и ДНК. В первую очередь АФК инициируют перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот с образованием перекисей липидов, которые могут негативно влиять на функциональное состояние клетки и снизить ее продуктивность в целом (Kaur et al., 2006). В связи с этим актуальным вопросом является поиск маркеров, которые позволят проводить оценку возможности длительного культивирования культур микроводорослей без потери целевых метаболитов в их биомассе. К таким маркерам можно отнести состав пигментов и его изменения в процессе выращивания (Pérez-Pérez et al., 2012). Содержание хлорофиллов является важным физиологическим параметром, который определяет активность фотосинтетического аппарата растений и их реакцию на неблагоприятные условия (Li et al., 2018). Каротиноиды, наряду с хлорофиллами, участвуют в фотосинтезе, а также обеспечивают фотозащиту и выступают в качестве низкомолекулярных антиоксидантов (Maltsev et al., 2021b). Индикаторами окислительного повреждения клеток водорослей, как следствия стрессовых условий, могут выступать продукты перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид и другие цитотоксические соединения (ТБК-активные продукты) (Garg, Manchanda, 2009). В связи с этим концентрация ТБКаП используется в качестве одного из наиболее информативных маркеров оценки степени негативного воздействия на водоросли (Rijstenbil, 2002).

Во время изучения разнообразия микроводорослей отвалов гранитных карьеров был выделен и идентифицирован штамм *C. multistriata* MZ–Ch23. С этим штаммом проведен ряд экспериментов для оценки влияния продолжительности культивирования и состава питательной среды на накопление биомассы, содержание липидов и состав жирных кислот (Maltsev et al., 2021a). Установлено, что на стандартной среде ВВМ 25-суточное культивирование, которое соответствует началу стационарной фазы роста, позволяет получить высокие значения сухой биомассы (до 1.3 г/л) с максимальным содержанием полиненасыщенных жирных кислот (66.8% от общего количества жирных кислот) и омега-3 (57.9%), в частности. В спектре жирных кислот доминантными были

18:3n-3 α-линоленовая (38.12%), 16:3n-3 *цис*-7,10,13-гексадекатриеновая (19.61%) и 16:0 пальмитиновая (18.61%) кислоты. В то же время известно, что стационарная фаза роста у большинства микроорганизмов сопровождается снижением интенсивности метаболизма, переключением на катаболизм протеинов, а также экспрессию генов, отвечающих за биосинтез энзимов репарации, метаболизм антиоксидантов и транспорт нутриентов (Hecker, Völker, 2001).

Учитывая перспективные результаты по накоплению биомассы и составу жирных кислот штаммом *C. multistriata* MZ–Ch23 во время стационарной фазы роста, целью работы было проанализировать функциональное состояние клеток микроводоросли в накопительной культуре в течение 60 сут культивирования с помощью физиологических маркеров и определить оптимальное время, во время которого биомасса водоросли имеет наибольшую биотехнологическую ценность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для исследований был использован штамм зеленой водоросли *Coelastrella multistriata* (MZ–Ch23) из Коллекции культур водорослей и цианобактерий лаборатории молекулярной систематики водных растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, выделенный из вскрывной породы молодого отвала на территории гранитного карьера Гурово (Тульская область, Россия).

Зрелые вегетативные клетки штамма имели эллипсоидную (10–12 × 6–8 мкм), реже шаровидную форму (диаметр 6–14 мкм). Клеточная стенка относительно толстая и бесцветная. Клетки с пристенным дольчатым хлоропластом и одним пиреноидом с крахмальной оберткой. Бесполое размножение осуществляется эллипсоидными или продолговато-яйцевидными автоспорами (6–8 × 4–6 мкм) (рис. 1).

Нуклеотидные последовательности представлены в GenBank: участок V4 18S рДНК – номер доступа MZ620281, участок ITS1–5.8S рДНК–ITS2 – номер доступа MZ620280 (Maltsev et al., 2021a).

В ходе эксперимента штамм выращивали в колбах объемом 250 мл с 150 мл среды ВВМ (Bischoff, Bold, 1963) и 10 мл инокулята с концентрацией клеток $0.18 \pm 0.01 \times 10^6$ шт./мл. После смешивания инокулята со средой концентрация клеток была $0.012 \pm 0.001 \times 10^6$ шт./мл (рис. 2). Культивирование осуществляли в 15 колбах – 5 повторов для сбора биомассы во время трех фаз роста. Концентрацию клеток измеряли с помощью автоматического счетчика клеток Bio-Rad TC20™ (“Bio-Rad”, США); для каждого измерения отбирали 10 мкл суспензии согласно рекомендациям про-

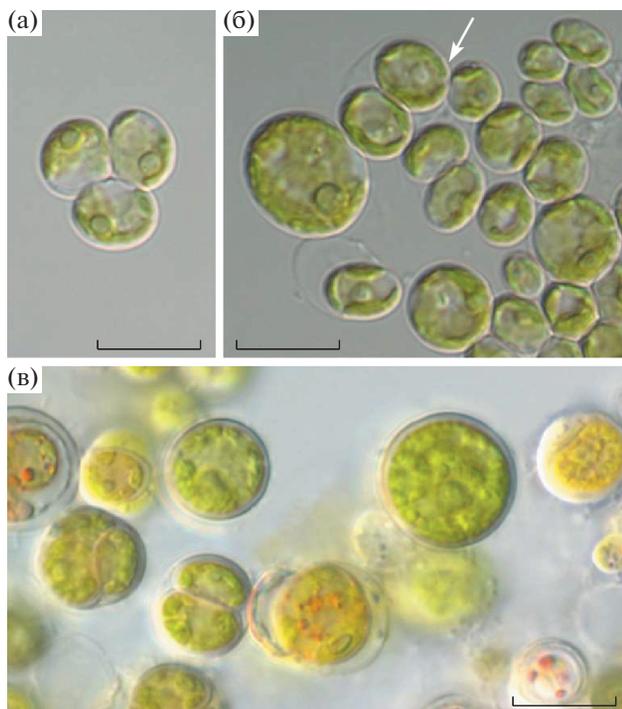


Рис. 1. *Coelastrella multistriata* MZ–Ch23: а – молодые вегетативные клетки; возраст культуры 15 сут; б – зрелая вегетативная клетка в окружении молодых клеток; возраст культуры 25 сут; стрелка указывает на спорангий; в – зрелые вегетативные клетки; возраст культуры 60 сут. Масштабная метка – 10 мкм.

изводителя. Микроводоросли культивировали с помощью орбитальных шейкеров ELMi Sky Line Shaker S-3L (Латвия) с постоянным перемешиванием при 150 об./мин в течение 60 сут; pH суспензии определяли с помощью настольного pH-метра Ohaus a-AV33PH (США). Изучение биохимических показателей проводили во время экспоненциальной фазы роста (15 сут культивирования), в начале стационарной фазы (25 сут) и после длительного выращивания (60 сут) (Maltsev et al., 2021a). Интенсивность света составляла 70 мкмоль фотонов/(м² с) с режимом освещения (ч) 16 : 8 день/ночь. Перед определением биохимических характеристик клетки водорослей отмывали от среды дистиллированной водой, осаждали центрифугированием (4000 об./мин, 10 мин) и удаляли жидкость над осадком. Операцию повторяли три раза.

$$\text{Хл } a = 11.85E_{664} - 1.54E_{647} - 0.08E_{630} \text{ (Jeffrey, Humphrey, 1974);}$$

$$\text{Хл } b = -5.43E_{664} + 21.03E_{647} - 2.66E_{630} \text{ (Jeffrey, Humphrey, 1974);}$$

$$\text{Хл } c1 + c2 = -1.67E_{664} - 7.60E_{647} + 24.52E_{630} \text{ (Jeffrey, Humphrey, 1974).}$$

Содержание каротиноидов определяли экстрактно-фотометрическим методом (Dere et al.,

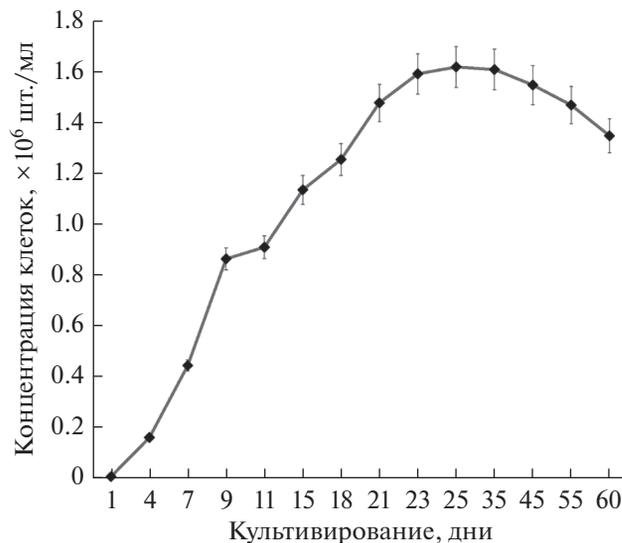


Рис. 2. Кривая роста штамма *Coelastrella multistriata* MZ–Ch23. На панели указана стандартная ошибка среднего.

Содержание хлорофиллов *a*, *b* и *c* определяли экстрактно-фотометрическим методом (Jeffrey, Humphrey, 1974). Для этого 5 мг биомассы водорослей подвергали замораживанию-размораживанию для частичного разрушения клеток. Количество используемой в анализе биомассы обусловлено чувствительностью метода Jeffrey, Humphrey (1974), который позволяет достоверно определить концентрацию пигментов от 0.2 мкг/мл. После разрушения клеток биомассу гомогенизировали в 4 мл 90% ацетона (“PanReac AppliChem”, Испания) с кварцевым песком, и оставляли для экстракции на 24 ч в герметичной пробирке без доступа света при температуре 25°C. Далее экстракт отделяли от осадка центрифугированием (6000 об./мин, 10 мин) и проводили измерения на спектрофотометре Ulab 102 (“Ulab”, Китай) относительно ацетона при длинах волн 664, 647 и 630 нм, что соответствует максимуму поглощения для Хл *a*, *b* и *c* соответственно. Измерения выполняли с использованием программного обеспечения MetaSpec Pro v 2.2 в режиме “Multi-wavelength Analysis”. Вычисление содержания хлорофиллов проводили по формулам и выражали в мг/г сухой биомассы:

1998). Для этого 5 мг биомассы подвергали замораживанию-размораживанию, после чего растирали

с кварцевым песком в 4 мл 100% ацетона. Полученный гомогенат оставляли на 24 ч в темном месте в герметично закрытой посуде для полного извлечения каротиноидов. После этого экстракт отделяли от обломков клеток центрифугированием

(6000 об./мин, 10 мин) и проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 470 нм, что соответствует максимуму поглощения каротиноидов в 100% ацетоне. Расчет проводили по формуле и выражали в мг/г сухой биомассы:

$$\text{Кар} = 1000A_{470} - 2.270Xla - 81.4Xlb/227 \text{ (Dere et al., 1998).}$$

Содержание витаминов определяли методом тонкослойной хроматографии (Hossu et al., 2006). Предварительно 30 мг биомассы водорослей подвергали омылению в 0.5 н. растворе КОН в этаноле (“Sigma-Aldrich”, США). Для этого биомассу помещали в виалу и добавляли 1 мл спиртового раствора КОН, 10 мг аскорбиновой кислоты (“Диаэм”, Россия) и омыляли при температуре 90°C в течение 30 мин. Далее из полученного гидролизата экстрагировали спиртовые формы ретинола и α -токоферола путем многостадийной экстракции гексаном (“Sigma-Aldrich”, США). Для этого экстракцию проводили 4 раза, добавляя по 1.0, 1.0, 1.0 и 0.5 мл гексана к гидролизату, после чего смесь отстаивали и декантировали гексановый экстракт. Объединенные экстракты промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции по универсальной индикаторной бумаге. Далее экстракт упаривали в вакууме при температуре 55–60°C. Полученный сухой остаток растворяли в 100 мкл бензола (“PanReas AppliChem”, Испания) и наносили в объеме 10 мкл на линию старта пластины для тонкослойной хроматографии (силикагель 60; “Sigma-Aldrich”, США), и хроматографировали. В качестве подвижной фазы использовали хлороформ (“Sigma-Aldrich”, США), дистанция прохода растворителя 8.5 см, для детектирования положения пятен витаминов рядом с исследуемыми образцами наносили раствор стандартных веществ. Для проявления веществ использовали детектирующий 1%-раствор фосфорномолибденовой кислоты (“ЛенРеактив”, Россия) в этаноле, в который погружали пластины на 10 с, после чего просушивали от растворителя и прогревали в термостате 5 мин при 100°C. Витамины проявлялись в виде синих пятен на желтом фоне, обесцвечивание фона проводили путем выдерживания пластины в парах аммиака в течении 20 с. Далее пластины сканировали и измеряли площадь и высоту пиков в программе Sorbfil TLC Videodensitometr v2.3.0. Концентрацию определяли путем сравнения с калибровочным графиком, построенным с использованием стандартных растворов ретинола (“Sigma-Aldrich”, США) и α -токоферола (“Sigma-Aldrich”, США), которые разделяли и детектировали на пластине в аналогичных с исследуемыми пробами условиях.

Определение содержания протеинов проводили бицинхоиновым методом (Jain et al., 2020). Для этого 10 мг биомассы подвергали замораживанию-размораживанию и гомогенизировали с кварцевым песком в среде 1 мл этанола для экстракции и удаления хлорофиллов и липофильных веществ. Далее экстракт отделяли от осадка центрифугированием (6000 об./мин, 10 мин), осадок ресуспендировали в 1 мл экстрагирующего фосфатного буфера (0.1 М, pH 7.5, SDS 0.5%; “Sigma-Aldrich”, США) и оставляли на 12 ч при температуре 25°C. Для построения калибровочного графика использовали стандартный раствор бычьего сывороточного альбумина (“Thermo Scientific”, США).

Содержание ТБК-активных продуктов определяли по их способности образовывать в кислой среде при нагревании окрашенный комплекс с 2-тиобарбитуровой кислотой (Zeb, Ullah, 2016). Экстракцию ТБК-активных продуктов проводили 1.2% раствором хлорида калия (“PanReas AppliChem”, Испания). Для этого к 0.1 г биомассы водорослей добавляли 0.9 мл хлорида калия и гомогенизировали с кварцевым песком. Для отделения супернатанта от осадка гомогенат центрифугировали (9000 об./мин, 15 мин).

Для определения содержания ТБКаП в исходном гомогенате к 0.2 мл экстракта прибавляли 1.6 мл фосфатного буфера (0.5 М, pH 7.35) и 1 мл раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (“Sigma-Aldrich”, США), приготовленной на ледяной уксусной кислоте. После этого смесь нагревали 60 мин при 95°C. Далее реакционную среду охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при 532 нм.

Также определяли содержание ТБКаП при индукции процессов пероксидного окисления липидов (ТБКаП_{ин}). В реакционную среду, которая содержала 0.2 мл гомогената и 1.5 мл фосфатного буфера добавляли 0.1 мл 1% раствора сульфата железа II (“ЛенРеактив”, Россия) и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Для определения ТБКаП_{ин} проводили аналогичные действия, описанные выше. Для расчета концентрации использовали следующую формулу:

$$C = D \times 28/31.2,$$

где C – концентрация ТБКаП (нмоль/г); D – оптическая плотность; 28 и 31.2 – коэффициенты, учитывающие специфическое молярное погло-

шение триметинового комплекса ТБК с ТБК-активными продуктами и степень разведения (для объема инкубационной среды – 2.8 мл).

Все измерения были проведены в пяти повторностях, числа в табл. 1 и 2 показывают среднюю величину и ошибку средней. Статистические данные получены в программе Microsoft Excel (v. 1903).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хлорофиллы являются важными пигментами поглощения световой энергии для фотосинтеза, высокая интенсивность которого способствует увеличению биомассы клеток при благоприятных условиях роста. В результате исследований установлено, что штамм *C. multistriata* MZ–Ch23 продуцировал максимальное количество хлорофиллов в экспоненциальной (“зеленой”) фазе роста – 2.35% сухой массы (табл. 1), а наибольшая концентрация Хл *a* достигала 14.82 мг/г или 1.48%. После перехода культуры в стационарную (“красную”) фазу количество хлорофиллов снижалось до 1.1%, а к 60 сут опускалось до 0.12%. При этом после длительного культивирования происходило изменение состава хлорофиллов – на первое место по содержанию выходит Хл *b*, а далее с немного меньшим значением следует Хл *c*. Примечательно, что для штаммов *Coelastrella* и ранее было показано значительное снижение содержания Хл *a*, Хл *b* в стационарной фазе роста по сравнению с экспоненциальной (Abe et al., 2007; Minyuk et al., 2016, 2017). В частности, Abe et al. (2007) установили, что для штамма *C. striolata* var. *multistriata* (Trenkwalder) Kalina et Puncochárová в логарифмической фазе роста содержание Хл *a* варьировало от 0.75 до 15–18 мг/г сухой массы, а Хл *b* – до 6.0 мг/г. Отмечено, что кривая изменения концентрации Хл *a* зависела от объема реактора и времени инкубации, и максимальное содержание Хл *a* достигалось через 10–20 сут от начала культивирования. После перехода культуры в стационарную фазу содержание Хл *a* и Хл *b* опускалось до 0.3 мг/г, что по значениям очень близко к полученным нами результатам на 60 сут (табл. 1). В то же время для штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 установлено, что в начале культивирования содержание хлорофиллов находилось на уровне 5.8% сухой массы для Хл *a* и 2.2% для Хл *b* (Minyuk et al., 2016, 2017), а в стационарной фазе отмечено снижение количества пигментов до уровня 0.2–0.5 и 0.2–0.25% в зависимости от условий и времени инкубирования. Следовательно, полученные нами результаты по количеству хлорофилла в конце культивирования сопоставимы с данными по штамму *Coelastrella striolata* var. *multistriata* (Abe et al., 2007). При этом их содержание в экспоненциальной фазе было в 3 и более раз меньше по сравнению с показателями для *C. rubescens* (Vi-

natzer) Kaufnerová et Eliás (Minyuk et al., 2016, 2017). Значительные отличия по содержанию хлорофиллов могут быть связаны с различными условиями выращивания культуры и в первую очередь – с интенсивностью освещения. Abe et al. (2007) показали, что повышение интенсивности освещения с 13 до 40 мкмоль фотонов/(м²с) сопровождалось увеличением количества Хл *a* в 1.8 раз. В нашем исследовании штамм *C. multistriata* MZ–Ch23 культивировали при интенсивности освещения 70 мкмоль фотонов/(м²с), в работе Abe et al. (2007) интенсивность освещения составляла 65 мкмоль фотонов/(м²с), в то время как штамм *C. rubescens* IPPAS H-350 выращивали под воздействием света большей интенсивности: 136–140 мкмоль фотонов/(м²с) (Minyuk et al., 2016, 2017), что может обуславливать описанные отличия в результатах.

Показательной характеристикой культур микроводорослей является количество синтезируемых метаболитов в единице объема культивируемой суспензии. Культура штамма *C. multistriata* MZ–Ch23 содержала от 2.57 до 11.63 мг/л хлорофиллов через 25 сут культивирования (табл. 2). Эти данные значительно превосходят объемную концентрацию Хл *a* у штамма *Coelastrella* sp. после 16 сут выращивания в стрессовых условиях, вызванных введением в питательную среду ADSW ионов Cu²⁺ с концентрацией 1–3 мг/л (Li et al., 2018). Поддержание культур микроводорослей в стационарной фазе роста может оказывать схожее воздействие на физиологические процессы в клетке, как и стрессирование во время экспоненциальной фазы. В данном случае воздействие высоких доз меди частично моделирует процессы, происходящие в “красной” фазе роста, а именно, запуск процессов биосинтеза факторов репарации и метаболизма антиоксидантов, поскольку медь, накапливаясь в клетках, приводит к генерации АФК, которые вызывают антиоксидантный ответ (İşeri et al., 2011).

Так же нами впервые установлено накопление Хл *c* для представителей рода *Coelastrella*, о чем не сообщалось ранее. Хлорофилл *c* является дополнительным пигментом, присутствует у многих фотосинтезирующих организмов (Jeffrey et al., 2011) и выполняет функцию фотоконцентрации и передачи энергии в реакционный центр (Blankenship, 2002). Накопление Хл *c* штаммом *C. multistriata* MZ–Ch23 во время стационарной фазы роста в количестве 0.41–2.74 мг/г на фоне активации синтеза вторичных метаболитов (каротиноидов) может быть компенсаторной реакцией, направленной на поддержание фотосинтетических процессов при снижении содержания Хл *a* и Хл *b* (табл. 1). Поскольку Хл *c* не имеет изопреноидного хвоста (Blankenship, 2002; Jeffrey et al., 2011), его биосинтез, в отличие от Хл *a*, Хл *b* и каротиноид-

Таблица 1. Биохимические показатели сухой биомассы *Coelastrella multistriata* в зависимости от продолжительности культивирования ($M \pm m; n = 5$)

Параметр	Экспоненциальная фаза (15 сут)		Стационарная фаза (25 сут)		Длительное выращивание (60 сут)	
	масса	%	масса	%	масса	%
Хлорофилл <i>a</i>	14.82 ± 0.74 мг/г	1.48	6.83 ± 0.34 мг/г	0.68	0.32 ± 0.14 мг/г	0.03
Хлорофилл <i>b</i>	7.05 ± 0.34 мг/г	0.71	1.52 ± 0.08 мг/г	0.15	0.50 ± 0.16 мг/г	0.05
Хлорофилл $c_1 + c_2$	1.59 ± 0.07 мг/г	0.16	2.74 ± 0.14 мг/г	0.27	0.41 ± 0.15 мг/г	0.04
Каротиноиды	7.42 ± 0.37 мг/г	0.74	11.34 ± 3.26 мг/г	1.14	42.11 ± 2.11 мг/г	4.21
Ретинол	167.15 ± 8.34 мкг/г	—	342.74 ± мкг/г	—	219.82 ± 5.74 мкг/г	—
α -Токоферол	15.81 ± 0.78 мкг/г	—	22.70 ± 4.10 мкг/г	—	58.36 ± 2.92 мкг/г	—
Протеин	198.91 ± 9.93 мг/г	19.89	122.20 ± 3.91 мг/г	12.42	97.76 ± 4.89 мг/г	9.78
ТБКаП	0.91 ± 0.04 нмоль/г 0.005 нмоль/мг протеина	—	1.27 ± 0.06 нмоль/г 0.011 нмоль/мг протеина	—	1.45 ± 0.63 нмоль/г 0.015 нмоль/мг протеина	—
ТБКаП _{ин}	1.32 ± 0.07 нмоль/г 0.007 нмоль/мг протеина	—	2.56 ± 0.12 нмоль/г 0.021 нмоль/мг протеина	—	18.28 ± 3.95 нмоль/г 0.187 нмоль/мг протеина	—

Таблица 2. Биохимические показатели суспензии *Coelastrella multistriata* в зависимости от продолжительности культивирования ($M \pm m$; $n = 5$)

Параметр	Экспоненциальная фаза (15 сут)	Стационарная фаза (25 сут)	Длительное выращивание (60 сут)
Биомасса, г/л	1.02 ± 0.05	1.71 ± 0.06	1.45 ± 0.06
Количество клеток, ×10 ⁶ шт./мл	11.31 ± 0.45	16.15 ± 0.47	13.44 ± 0.57
pH	8.55 ± 0.45	9.22 ± 0.46	9.41 ± 0.57
Хлорофилл <i>a</i> , мг/л	15.1 ± 0.77	11.63 ± 0.58	0.44 ± 0.03
Хлорофилл <i>b</i> , мг/л	7.24 ± 0.36	2.57 ± 0.13	0.73 ± 0.04
Хлорофилл <i>c</i> ₁ + <i>c</i> ₂ , мг/л	1.63 ± 0.08	4.62 ± 0.23	0.58 ± 0.03
Каротиноиды, мг/л	7.55 ± 0.38	19.49 ± 0.96	61.05 ± 3.05
Ретинол, мкг/л	170.49 ± 8.53	586.09 ± 29.31	318.74 ± 15.98
α-Токоферол, мкг/л	16.13 ± 0.82	38.82 ± 1.94	84.62 ± 4.25
Протеин, мг/л	202.88 ± 10.15	212.38 ± 10.62	141.81 ± 7.12
ТБКаП, нмоль/л	0.93 ± 0.05	2.17 ± 0.11	2.48 ± 0.12
ТБКаП _{ин} , нмоль/л	1.35 ± 0.07	4.38 ± 0.22	31.30 ± 1.57

дов, не требует вовлечения изопреноидных фрагментов. Соответственно, переключение на синтез Хл *c* при активации каротиногенеза может быть одним из механизмов адаптации к неблагоприятным условиям, которыми характеризуется стационарная фаза роста, поскольку наступает в результате нехватки питательных веществ или других стресс-факторов (Necker, Völker, 2001).

Накопление каротиноидов является результатом активации метаболизма антиоксидантов (Necker, Völker, 2001) и направлено на снижение негативного воздействия стрессорных факторов, поскольку каротиноиды обладают более сильными антиоксидантными свойствами, нежели другие внутриклеточные антиоксиданты, например, α-токоферол и витамин С (Sies et al., 1992; Del Mondo et al., 2020). В частности, β-каротин играет важную роль в виолоксантиновом цикле светозащиты, является антиоксидантом, обеспечивающим нейтрализацию АФК и триплетного хлорофилла (Smerilli et al., 2016; Toti et al., 2018). Причем для некоторых высших растений установлен механизм прямого преобразования β-каротина в зеаксантин, который позволяет избежать фотоингибирования (Wright et al., 2011). Зачастую ответом на излишнее образование АФК, которое наблюдается в стационарной фазе роста, является снижение содержания ненасыщенных жирных кислот в клетке (Pamplona, 2008). Поскольку ранее в биомассе *C. multistriata* MZ–Ch23 было установлено высокое содержание ненасыщенных жирных кислот (78.84% от их общего количества; Maltsev et al., 2021a), можно предположить, что исследованный штамм имеет другой механизм повышения устойчивости к действию свободных радикалов, на-

пример, за счет накопления большого количества низкомолекулярных антиоксидантов (в том числе каротиноидов). В целом для штамма *C. multistriata* MZ–Ch23 установлено общее содержание каротиноидов на уровне 7.42–42.11 мг/г (0.74–4.21% сухой массы) и увеличение их содержания с возрастом культуры. Подобная тенденция установлена для штамма *Coelastrella* sp. F50, который показал возможность накопления каротиноидов до 4.08% сухой биомассы (Hu et al., 2013). Abe et al. (2007) сообщают, что штамм *C. striolata* var. *multistriata* характеризовался суммарным содержанием β-каротина, кантаксантина и астаксантина в количестве 0.84% сухой биомассы во время “зеленой” фазы роста и увеличением этого значения до 5.6% во время “красной”, что незначительно превышает полученный нами результат. При этом такие высокие результаты для *C. striolata* var. *multistriata* по накоплению каротиноидов удалось получить при освещении 65 мкмоль фотонов/(м² с) и увеличении в 2 раза (до 500 мг/л) концентрации NaNO₃ в среде BBM (Abe et al., 2007). В тоже время для штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 отмечена противоположная тенденция, а именно уменьшение количества каротиноидов с возрастом культуры – с 1.8% во время экспоненциальной фазы и до 0.6% во время “красной” (Minyuk et al., 2016, 2017).

Витамин А (ретинол) является продуктом вторичного метаболизма микроводорослей, прекурсором которого выступают каротиноиды (Toti et al., 2018). Ретинол и его окисленные формы обеспечивают важные функции в организме человека и животных: способствуют дифференциации и росту тканей, выполняют репродуктивную, иммунную и рецепторную функцию, проявляют антиокси-

дантные свойства (Imdad et al., 2017). Для зеленых водорослей установлена способность синтезировать витамин А в широком диапазоне от 10 до 4280 мкг/г сухой биомассы (Santiago-Morales et al., 2018; Del Mondo et al., 2020). При этом исследованный штамм *C. multistriata* характеризовался способностью к накоплению витамина А в пределах 167.15–342.74 мкг/г с максимальным значением на 25 сут культивирования. Анализ объемного содержания, которое является более показательным выражением продуктивности штамма, показывает возможность получения ретинола до 586.09 мкг/л культуры водоросли после 25 сут культивирования (табл. 2).

Витамин Е (α -токоферол) играет очень важную функцию в клетках микроводорослей – является антиоксидантом и, наряду с β -каротином, препятствует возникновению фотоокислительного стресса (Del Mondo et al., 2020). Как и витамин А, α -токоферол в клетках зеленых водорослей продуцируется в разном количестве: известна способность некоторых видов *Chlorophyta* накапливать витамин Е до 785 мкг/г (Mudimu et al., 2017). В биомассе штамма MZ–Ch23 обнаружено небольшое количество α -токоферола: 15.81–58.36 мкг/г сухой массы. Данный показатель сопоставим с результатами, полученными для штаммов *Enallax costatus* SAG 46.88 (19.22 мкг/г), *Scenedesmus vacuolatus* SAG 211-11 m (43.65 мкг/г) и *Tetradesmus obliquus* SAG 276–1 (50.82 мкг/г) во время стационарной фазы при выращивании на среде BBM с утроенной концентрацией нитратов (Mudimu et al., 2017). При этом другие штаммы рода *Coelastrella* продуцируют значительно больше α -токоферола: 424.35 мкг/г (*C. terrestris* SAG 477a), 508.28 мкг/г (*C. oocystiformis* SAG 277–1) и 509.11 мкг/г (*C. rubescens* SAG 475a) (Mudimu et al., 2017). В целом отмечено, что значительное накопление α -токоферола чаще наблюдается во время стационарной фазы роста по сравнению с логарифмической, что обуславливается активацией вторичного метаболизма антиоксидантных веществ в более стрессовых условиях “красной” фазы (Hecker, Völker, 2001; Mudimu et al., 2017). В то же время относительно низкое содержание α -токоферола у штамма MZ–Ch23 может быть связано с активацией биосинтеза каротиноидов, для образования которых используются изопреноидные фрагменты (DellaPenna, Rogson, 2006). Установлено, что изопреноидные фрагменты расходуются в первую очередь на биосинтез продуктов с большей антиоксидантной активностью – в данном случае это будут каротиноиды, а не витамин Е (Sies et al., 1992; Del Mondo et al., 2020). С другой стороны, как указано выше, у штамма MZ–Ch23 стационарная фаза роста характеризуется низким содержанием хлорофилла, что приводит к снижению интенсивности фотосинтетических процессов, и, соответственно, биосинтеза α -токоферола, поскольку

он может синтезироваться только в условиях активного фотосинтеза (Мокросноп, Золотарева, 2014).

Ранее для штаммов *Coelastrella* было установлено содержание протеина в сухой биомассе на уровне 317.7 мг/г во время экспоненциальной фазы и снижение до 104.9 мг/г в стационарной (Minyuk et al., 2017). Считается, что такое снижение является типичным для стрессированных каротиногенных клеток микроводорослей, а в конкретном случае у штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 вызвано 10-кратным уменьшением концентрации азота и фосфора в стандартной среде BBM. В таких условиях падение количества белка в клетке может быть связано с нехваткой азота и его перераспределением путем аутофагии, вызванной стрессом (Pérez-Pérez et al., 2012; Minyuk et al., 2017). Также для штамма *Coelastrella* sp. известно объемное содержание белка равное 180 мг/л во время стационарной фазы роста на среде ADSW (Li et al., 2018). Показатели, полученные нами для штамма MZ–Ch23 (табл. 1, 2), характеризуют его как более продуктивный в контексте накопления белка в стационарной фазе по сравнению со штаммом IPPAS H-350 (Minyuk et al., 2017). Исследуемый штамм *C. multistriata* имел более высокие показатели как в количестве белка в сухой биомассе (122.2 мг/г по сравнению с 104.9 у штамма *C. rubescens*), так и в объемном отношении (212.39 мг/л по сравнению с 83.4 в стационарной фазе, 202.88 и 54.8 мг/л в экспоненциальной фазе у штамма *C. rubescens*).

Содержание ТБК-активных продуктов может косвенно отражать интенсивность пероксидных процессов в клетке, а также указывать на состояние системы антиоксидантной защиты, поскольку генерируемые АФК атакуют жирные кислоты липидов и приводят к накоплению ТБК-активных продуктов и пероксидов липидов (Wang et al., 2017; Li et al., 2018). Исследуемый штамм *C. multistriata* MZ–Ch23 на всех фазах роста характеризовался низким исходным содержанием ТБКаП – 0.005–0.015 нмоль/мг протеина с наивысшим значением на 60-е сутки. Индукция пероксидного окисления липидов ионами Fe^{2+} привела к увеличению количества ТБКаП_{инн} в 1.4–12.5 раз (табл. 1). Небольшая разница между ТБКаП и ТБКаП_{инн} во время экспоненциальной и стационарной фаз указывает на функциональную стабильность клеток и устойчивость к стрессу. Наибольший эффект оказывает стимулирование пероксидного окисления в конце культивирования – ТБКаП_{инн} возросло до 0.187 нмоль/мг протеина. Такого рода изменения показывают низкую устойчивость штамма к оксидативному стрессу в это время, что может быть связано со значительным содержанием ненасыщенных жирных кислот в клетках (до 78.84%), которые, как известно, являются основным субстратом липопероксидации (Gamliel et al.,

2008; Galván, 2017). В данном случае длительное воздействие факторов, запускающих процессы липопероксидации, постепенно приведут к истощению внутримолекулярных антиоксидантов, а в последствии и к гибели клетки. В то же время, если сравнить содержание ТБКаП в клетках других штаммов *Coelastrella*, то результат покажет перспективность использования в биотехнологии штамма MZ—Ch23. Так, концентрация ТБКаП в интактных клетках штамма *Coelastrella* sp. составила 0.705 нмоль/мг протеина, что более чем в 30 раз выше полученных нами результатов (Li et al., 2018). Последующее 16-сут инкубирование данного штамма в среде ADSW с добавлением Cu^{2+} приводило к значительному повышению концентрации ТБКаП до 3.3—6.5 нмоль/мг протеина, что свидетельствует о накоплении в клетках меди и, соответственно, активации пероксидных процессов. Результатом угнетения процессов антиоксидантной защиты стало значительное снижение содержания ненасыщенных жирных кислот в составе липидов клеток (Li et al., 2018).

Известно, что представители рода *Coelastrella* относятся к стенобионтным микроводорослям по отношению к кислотности среды при культивировании (Minyuk et al., 2016). На примере штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 показано, что оптимум рН среды находится в диапазоне 6.0—7.0. В этих условиях скорость роста, содержание Хл *a*, суммарных каротиноидов и полиненасыщенных жирных кислот были самыми высокими (Minyuk et al., 2016). При выполнении эксперимента в накопительной культуре штамма MZ—Ch23 нами было отмечено быстрое защелачивание суспензии до рН 9.22 уже на 25 сут культивирования (табл. 2), в то время как в начале выращивания значение рН было 6.90. На 60 сут культивирования отмечено наибольшее смещение рН в сторону высоких значений (рН 9.41) Следует отметить, что культура *C. multistriata* показала меньшую способность к защелачиванию среды, чем с *C. rubescens*, в суспензии которой значение рН достигало 10.5 во время выращивания без обогащения культуры CO_2 (Minyuk et al., 2016). В дальнейшем будет продолжена работа по изучению влияния изменения рН среды на функциональное состояние клеток *C. multistriata*.

В целом, предыдущие наши отчеты и настоящее исследование показывают, что биохимические характеристики биомассы штамма *C. multistriata* MZ—Ch23 являются ценными с точки зрения биотехнологического использования. Перспективным представляется его культивирование на стандартной среде ВВМ в течение ранней стационарной фазы. Именно 25-сут культивирование позволяет получить биомассу, с одной стороны, богатую биологически активными веществами (в первую очередь омега-3 жирными кислотами, ка-

ротиноидами, витамином А и протеином), а с другой — устойчивую к пероксидному окислению липидов. На основании вышеизложенного можно сделать общий вывод, что для штаммов *Coelastrella* стрессирование условий культивирования изменением состава питательной среды или добавлением тяжелых металлов является нерациональным подходом, поскольку приводит к ухудшению качества культуры, расходованию антиоксидантных субстратов на подавление усиливающихся процессов пероксидного окисления липидов, и как следствие — к перестройке метаболизма липидов на снижение количества ненасыщенных жирных кислот.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Биохимические исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-10076). Поддержание культуры микроводоросли осуществлялось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700045-3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мокросноп В.М., Золотарева Е.К. Микроводоросли как продуценты токоферолов // *Biotechnol. Acta.* 2014. V. 7. P. 26—33.
- Abe K., Hattori H., Hirano M. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* // *Food Chem.* 2007. V. 100. P. 656—661.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.026>
- Bischoff H.W., Bold H.C. Phycological studies IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species. University of Texas Publication 6318, 1963. 95 p.
- Blankenship R.E. Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Hoboken: Wiley Blackwell, 2002. 321 p.
- Chodat R. Matériaux pour l'histoire des algues de la Suisse // *Bulletin de la Société Botanique de Geneve, série 2.* 1922. V. 13. P. 66—114.
- Del Mondo A., Smerilli A., Sané E., Sansone C., Brunet C. Challenging microalgal vitamins for human health // *Microb. Cell Fact.* 2020. V. 19. 201.
<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01459-1>
- DellaPenna D., Pogson B.J. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids // *Annu. Rev. Pl. Biol.* 2006. V. 57. P. 711—738.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301>

- Dere Ş., Güneş T., Sivaci R. Spectrophotometric determination of chlorophyll – A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents // Tr. J. Botany. 1998. V. 22. P. 13–17.
- Hecker M., Völker U. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria // Adv. Microbial Physiol. 2001. V. 44. P. 35–91.
https://doi.org/10.1016/S0065-2911(01)44011-2
- Hossu A.-M., Rădulescu C., Ilie M., Bălălaşu D., Magearu V. Qualitative and semiquantitative TLC analysis of vitamins A, D and E // Revista de Chimie. 2006. V. 57. P. 1188–1189.
- Hu C.-W., Chuang L.-T., Yu P.C., Chen C.-N.N. Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrrella* sp. F50 // Food Chem. 2013. V. 138. P. 2071–2078.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.133
- Galván I. Evidence of evolutionary optimization of fatty acid length and unsaturation // J. Evol. Biol. 2017. V. 31. P. 172–176.
https://doi.org/10.1111/jeb.13198
- Gamliel A., Afri M., Frimer A.A. Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps // Free Rad. Biol. Med. 2008. V. 44. P. 1394–1405.
https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.028
- Garg N., Manchanda G. ROS generation in plants: boon or bane? // Plant Biosyst. 2009. V. 143. P. 81–96.
https://doi.org/10.1080/11263500802633626
- Imdad A., Mayo-Wilson E., Herzer K., Bhutta Z.A. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from six months to five years of age // Cochrane Database Syst. Rev. 2017. CD008524.
https://doi.org/10.1002/14651858.cd008524.pub3
- İşeri Ö.D., Körpe D.A., Yurtcu E., Sahin F.I., Haberal M. Copper-induced oxidative damage, antioxidant response and genotoxicity in *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Cucumis sativus* L. // Plant. Cell. Rep. 2011. V. 30. P. 1713.
https://doi.org/10.1007/s00299-011-1079-x
- Jain A., Jain R., Jain S. Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. N.Y.: Springer, 2020. 282 p.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1974. V. 167. P. 191–194.
https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3
- Jeffrey S., Wright S., Zapata M. Microalgal classes and their signature pigments // Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography (Cambridge Environmental Chemistry Series) / Eds. Roy S., Llewellyn C., Egeland E., Johnsen G. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. P. 3.
- Kaur G., Alam M.S., Jabbar Z., Javed K., Athar M. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers // J. Ethnopharmacol. 2006. V. 108. P. 340–348.
https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.021
- Lang I., Hodac L., Friedl T., Feussner I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection // BMC Pl. Biol. 2011. V. 11. P. 124.
https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-124
- Li X., Yang W.L., He H., Wu S., Zhou Q., Yang C., Zeng G., Lou L., Lou W. Responses of microalgae *Coelastrrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater // Bioresour. Technol. 2018. V. 251. P. 274–279.
https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.058
- Maltsev Y.I., Konovalenko T.V., Barantsova I.A., Maltseva I.A., Maltseva K.I. Prospects of using algae in biofuel production // Regul. Mech. Biosyst. 2017. V. 8. P. 455–460.
https://doi.org/10.15421/021770
- Maltsev Y., Krivova Z., Maltseva S., Maltseva K., Gorshkova E., Kulikovskiy M. Lipid accumulation by *Coelastrrella multistriata* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) during nitrogen and phosphorus starvation // Sci. Rep. 2021a. V. 11. P. 19818.
https://doi.org/10.1038/s41598-021-99376-9
- Maltsev Y., Maltseva K., Kulikovskiy M., Maltseva S. Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids and fatty acid composition // Biology. 2021b. V. 10. P. 1060.
https://doi.org/10.3390/biology10101060
- Maltsev Y.I., Maltseva I.A., Kulikovskiy M.S., Maltseva S.Yu., Sidorov R.A. Analysis of a new strain of *Pseudomuriella en-gadinensis* (Sphaeropleales, Chlorophyta) for possible use in biotechnology // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 609–617.
https://doi.org/10.1134/S1021443719040083
- Maltsev Y., Maltseva I., Maltseva S., Kocielek J.P., Kulikovskiy M. A new species of freshwater algae *Nephrochlamys yushanlensis* sp. nov. (Selenastraceae, Sphaeropleales) and its lipid accumulation during nitrogen and phosphorus starvation // J. Phycol. 2021c. V. 57. P. 606–618.
https://doi.org/10.1111/jpy.13116
- Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids // Algae. 2017. V. 32. P. 245–259.
https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6
- Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chivkunova O., Chekanov K., Lobakova E., Sidorov R., Solovchenko A. pH and CO₂ effects on *Coelastrrella* (*Scotiellopsis*) *rubescens* growth and metabolism // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 566–574.
https://doi.org/10.1134/S1021443716040105
- Mudimu O., Koopmann I.K., Rybalka N., Friedl T., Schulz R., Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α-tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α-tocopherol production // J. Appl. Phycol. 2017. V. 29. P. 2867–2875.
https://doi.org/10.1007/s10811-017-1188-1
- Novakovskaya I.V., Egorova I.N., Kulakova N.V., Patova E.N., Shadrin D.M., Anissimova O.V. Morphological and phylogenetic relations of members of the genus *Coelastrrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from the Ural and Khentii Mountains (Russia, Mongolia) // Phytotaxa. 2021. V. 527. P. 1–20.
https://doi.org/10.11646/phytotaxa.527.1.1
- Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity // Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics. 2008. V. 1777. P. 1249–1262.
https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.07.003

- Pérez-Pérez M.E., Lemaire S.D., Crespo J.L.* Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae // *Plant Physiol.* 2012. V. 160. P. 156–164. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199992>
- Rijstenbil J.W.* Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation // *J. Plankton Res.* 2002. V. 24. P. 1277–1288.
- Santiago-Morales I.S., Trujillo-Valle L., Márquez-Rocha F.J., Hernández J.F.L.* Tocopherols, phycocyanin and superoxide dismutase from microalgae: as potential food antioxidants // *Appl. Food Biotechnol.* 2018. V. 5. P. 19–27. <https://doi.org/10.22037/afb.v5i1.17884>
- Sies H., Stahl W., Sundquist A.R.* Antioxidant functions of vitamins // *Ann. New York Acad. Sci.* 1992. V. 669. P. 7–20. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb17085.x>
- Smerilli A., Orefice I., Corato F., Olea A.G., Ruban A.V., Brunet C.* Photoprotective and antioxidant responses to light spectrum and intensity variations in the coastal diatom *Skeletonema marinoi* // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 19. P. 611–627. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13545>
- Toti E., Chen C.-Y.O., Palmery M., Valencia D.V., Peluso I.* Non-provitamin a and provitamin a carotenoids as immunomodulators: recommended dietary allowance, therapeutic index, or personalized nutrition? // *Oxidat. Med. Cell. Longevity.* 2018. 4637861. <https://doi.org/10.1155/2018/4637861>
- Wright A.H., DeLong J.M., Gunawardena A.H.L.A.N., Prange R.K.* The interrelationship between the lower oxygen limit, chlorophyll fluorescence and the xanthophyll cycle in plants // *Photosynth. Res.* 2011. V. 107. P. 223–235. <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9621-9>
- Wang T.-Y., Libardo M.D.J., Angeles-Boza A.M., Pellois J.-P.* Membrane oxidation in cell delivery and cell killing applications // *ACS Chem. Biol.* 2017. V. 12. P. 1170–1182. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00237>
- Zeb A., Ullah F.* A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods // *J. Anal. Meth. Chem.* 2016. 9412767. <https://doi.org/10.1155/2016/9412767>

Functional State of *Coelastrella multistriata* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyta*) in an Enrichment Culture

S. Yu. Maltseva¹, M. S. Kulikovskiy¹, and Y. I. Maltsev^{1,*}

¹ *Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia*

*e-mail: ye.maltsev@gmail.com

Received April 13, 2022; revised April 26, 2022; accepted May 10, 2022

Abstract—The functional state of an enrichment culture of a green alga *Coelastrella multistriata* (Trenkwalder) Kalina et Puncochárová in the course of 60-day cultivation was studied. The concentrations of chlorophylls *a*, *b*, and *c*, total carotenoids, protein, and vitamins A and E was determined. The rates of lipid peroxide oxidation in the cells of *C. multistriata* strain MZ–Ch23 were determined using the concentrations of peroxidation products reacting with 2-thiobarbituric acid. The concentrations of these products were determined in the algal biomass on days 15, 25, and 60 of cultivation in the BBM medium, as well as after initiation of peroxide oxidation with Fe²⁺. Among the photosynthetic pigments, the highest content (14.82 mg/g dry biomass) was shown for chlorophyll *a* during the exponential growth phase. The total amount of carotenoids was comparable to the values for other studied *Coelastrella* strains, 0.74–4.21% of the dry biomass. Strain MZ–Ch23 was shown to accumulate high concentrations of retinol (170.49–586.09 µg/L of the algal culture) and protein (141.81–212.38 mg/L). While during all phases of the cultivation *C. multistriata* cells exhibited low concentrations of the products of lipid peroxide oxidation (0.005–0.015 nmol/mg protein), initiation of peroxide oxidation increased the concentration of TBA-active products up to 0.187 nmol/mg protein on day 60. Cultivation in BBM medium for 25 days proved to be the optimal strategy for obtaining *C. multistriata* biomass enriched with secondary metabolites and resistant to peroxide oxidation. This resulted in significant amounts of the biomass with high levels of carotenoids, protein, and vitamin A.

Keywords: vitamins, green algae, carotenoids, protein, thiobarbiturate-active products, chlorophyll

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИПОДБОР ПЕРСПЕКТИВНОГО ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД АКВАКУЛЬТУРЫ© 2022 г. Н. Р. Акмуханова^а, Б. К. Заядан^а, А. К. Садвакасова^а, М. М. Тореханова^а,
Н. П. Тимофеев^б, М. О. Бауенова^а, Д. А. Тодоренко^б, Д. Н. Маторин^{б, *}^аКазахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, 050040 Казахстан^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dnmatorin@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2022 г.

После доработки 04.04.2022 г.

Принята к публикации 06.04.2022 г.

В статье исследованы 3 штамма зеленых микроводорослей (*Chlorella vulgaris* SP BB-2, *Parachlorella kessleri* Vh-2 и *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard CC-124) для биологической очистки вод (биоремедиации) аквакультуры от загрязняющих веществ. Показана повышенная скорость роста и накопление биомассы у штамма *C. vulgaris* SP BB-2. Обнаружено, что этот штамм эффективно использует азот и фосфор из сточных вод для своего роста и развития, и показывает высокую эффективность по показателю химического потребления кислорода (ХПК). Кроме того, из изученных микроводорослей биомасса штамма *C. vulgaris* SP BB-2 обладает наиболее высоким содержанием белка, что позволяет рекомендовать ее в качестве добавки в корма для аквакультуры. Регистрация индукционных и световых кривых флуоресценции хлорофилла выявила изменения в энергозапасующих фотосинтетических процессах клеток штамма *C. vulgaris* SP BB-2 при выращивании на сточной воде аквакультуры. Это проявлялось в высоких показателях максимального квантового выхода фотосистемы II (ФСII) (F_V/F_M), эффективности транспорта электронов (Φ_{E0}), индекса производительности ФСII (PI_{ABS}) и увеличении коэффициента максимальной утилизации световой энергии (α). Штамм *C. vulgaris* SP BB-2 может быть рекомендован для очистки загрязненных вод, а высокочувствительные параметры индукции флуоресценции хлорофилла (PI_{ABS} , Φ_{E0}) могут быть использованы в качестве индикаторов состояния микроводорослей.

Ключевые слова: микроводоросли, биоремедиация, флуоресценция хлорофилла *a*, JIP-тест**DOI:** 10.31857/S0026365622100123

Перспективным методом очистки сточных вод аквакультуры является культивирование микроводорослей (Mohsenroug et al., 2021). Биоремедиация с использованием микроводорослей может быть экономически эффективной и экологически чистой. При этом культивирование микроводорослей в сточных водах аквакультуры может обеспечивать, помимо очистки, получение клеточной биомассы, богатой липидами, белками, углеводами и другими продуктами (Guo et al., 2013). Микроводоросли используют питательные вещества, присутствующие в сточных водах аквакультуры, преобразуя их в биомассу и, тем самым, улучшая экономические показатели производства биомассы микроводорослей в целом (Nayak et al., 2016). Также микроводоросли в процессе фотосинтеза обогащают водную среду кислородом, ускоряя окислительные процессы и минера-

лизацию органических примесей в воде. Кроме этого, многие микроводоросли способны потреблять не только минеральные вещества, но и простые органические соединения (Carorgno et al., 2015). Использование продуктивных штаммов микроводорослей в сточных водах аквакультуры предоставляет возможность получения дешевой биомассы микроводорослей, обладающей высокой питательной ценностью для рыб, личинок, ракообразных и моллюсков (Reitan et al., 1997; Gao et al., 2016). Добавки на основе микроводорослей могут обогащать корма белками, незаменимыми аминокислотами, жирными кислотами и пигментами, необходимыми для получения высококачественной продукции аквакультуры.

Хлорофилл, находящийся в тилакоидных мембранах хлоропластов водорослей, является своего рода природным индикатором фотосинтетической активности клеток за счет испускания квантов света (Schreiber, 2004; Kalaji et al., 2014), поэтому флуоресценция хлорофилла активно используется для ис-

Сокращения: РЦ – реакционный центр; ФСII – фотосистема II.

следования состояния фотосинтезирующих организмов (Prašil, Borowitzka, 2011; Маторин, Рубин, 2012). Флуоресцентные методы могут дать подробную информацию о фотосинтетическом электронном транспорте микроводорослей в режиме реального времени (Маторин, Рубин, 2012).

В настоящей работе представлены результаты сравнительного исследования 3 штаммов зеленых микроводорослей, и показана перспективность штамма *Chlorella vulgaris* SP BB-2 для использования в процессах очистки сточных вод аквакультуры и получения биомассы. Микробиологическими и флуориметрическими методами охарактеризованы параметры роста и фотосинтетических процессов этого штамма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* SP BB-2, выделенный из загрязненного озера Биликоль, расположенного на юге Республики Казахстан (42°59'18" с.ш., 70°41'14" в.д.), и штаммы микроводорослей *Parachlorella kessleri* Bh-2 и *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard CC-124 из коллекции Казахского Университета имени аль-Фараби. Выбранные штаммы из коллекции были охарактеризованы как нетребовательные к использованию специфических питательных веществ при культивировании (Заядан и соавт., 2017).

Культивирование микроводорослей в лабораторных условиях и определение скорости роста и биомассы. Штаммы микроводорослей культивировали в лабораторных условиях в трех средах:

а) лабораторные среды (контроль): среда Тамия для *C. vulgaris* SP BB-2 и *P. kessleri* Bh-2, среда L2-min для штамма *C. reinhardtii* CC-124 (Заядан и соавт., 2017);

б) пробы сточной воды, взятые из водоема рыбного хозяйства тепловодных рыб (тиляпия), расположенного в селе Саймасай Алматинской области (42°44'72" с.ш., 77°33'06" в.д.);

в) вода из скважины (42°44'73" с.ш., 77°33'06" в.д.), из которой она подается в водоем рыбного хозяйства.

В сточных водах водоема обнаружены (мг/л): аммиак – 25.12, нитриты – 3.8, нитраты – 16.07 и фосфаты – 5.13. Биохимическое потребление кислорода (БПК₅) составило 8.5 мг/О₂/л и химическое потребление кислорода (ХПК) – 96 мг/О₂/л. Также показано наличие других микроэлементов, таких как железо, магний, цинк, молибден, которые необходимы для различной физиологической активности микроводорослей. Таким образом, сточная вода аквакультуры характеризовалась высоким содержанием органоминеральных веществ. Химический состав воды из скважины имел следующий состав (мг/л): железо – 0.2, мар-

ганец – 0.1, сульфаты – 100, хлорид – 5, аммоний – 0.6, нитраты – 1.2, фториды – 1.5. Общая жесткость воды составляла 10 моль/л.

Микроводоросли предварительно 8–10 сут выращивали на соответствующих питательных средах в конических колбах объемом 250–1000 мл при круглосуточном искусственном освещении лампами Flora Led 35 D120 (80 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) и при температуре 25°C. Контроль за темпом роста микроводорослей в культуре осуществляли на основании учета изменений их численности с помощью камеры Горяева (Заядан и соавт., 2017).

В опытах по очистке сточных вод аквакультуры использовали лабораторную установку прямоугольного типа объемом 10 л (35 × 12 × 25 см). Культивирование микроводорослей проводили в течение 14 сут при барботировании воздухом с 1.5% CO₂ (скорость барботажа 0.3 л/мин), при температуре 25°C и освещенности 80 мкмоль м⁻² с⁻¹. Начальное количество клеток микроводорослей составляло 0.5 × 10⁶ кл./мл во всех экспериментальных вариантах.

Продуктивность исследуемых штаммов микроводорослей определяли по накоплению веса сухой биомассы в соответствии со стандартным методом для общего количества взвешенных твердых веществ (Lee et al., 2013).

Анализ изменения концентрации ионов в среде при культивировании микроводорослей. Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли путем измерения окисляемости бихроматом калия, регистрируя оптическую плотность образцов при λ = 600 нм на спектрофотометре PD-303UV (Япония) (Clesceri et al., 1998).

Содержание аммонийного азота (NH₄⁺) определяли с помощью реактива Несслера, измеряя оптическую плотность образцов при λ = 414 нм в соответствии с методами, описанными в работе (Clesceri et al., 1998). Определение концентрации фосфора в виде ортофосфата (PO₄³⁻) проводили при 610 нм с использованием молибдата аммония и малахитового зеленого на спектрофотометре PD-303UV (Япония) (Cogan et al., 1999).

Анализ биохимического состава полученной биомассы. Определение общего содержания белка проводили по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Углеводы определяли согласно (Dubois et al., 1951), а липиды – согласно (Marsh, Weinstein, 1966). Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре PD-303UV (Япония). Процентное содержание белков, углеводов и липидов определяли относительно веса сухой биомассы микроводорослей.

Биофизические методы исследования. Регистрацию световых кривых параметров флуоресценции хлорофилла проводили на флуориметре

Water-PAM (“Walz, Effelrich”, Германия). Световые зависимости измеряли при последовательном увеличении интенсивности света от 0 до 1400 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Регистрировали параметры флуоресценции F_0 и F_M в темноте и на свету. Рассчитывали квантовый выход фотосистемы II (ФСII) и скорость нециклического транспорта электронов. Обозначения и определения фотосинтетических параметров приведены в соответствии с общепринятой номенклатурой (Schreiber, 2004).

Параметры индукционных кривых флуоресценции хлорофилла регистрировали на портативном флуориметре Aquapen-C 100 (“Photon System Instruments”, Чехия). Перед измерением образцы выдерживали в темноте в течение 10 мин. Регистрировали индукцию флуоресценции с высоким временным разрешением (начиная с 0.05 мс) при освещении светом ($\lambda = 455 \text{ нм}$) интенсивностью 3000 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

Для количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе параметров индукционной кривой был использован JIP-тест (Strasser et al., 2004; Lazár, Schansker, 2009; Kalaji et al., 2014). По соответствующим формулам (Strasser et al., 2004; Kalaji et al., 2014) рассчитывали следующие параметры: F_V/F_M – максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в открытых реакционных центрах ФСII; V_j – относительная амплитуда фазы O–J (после 2 мс освещения), отражает количество закрытых реакционных центров (РЦ) по отношению к общему числу РЦ ФСII; ϕ_{E_0} – квантовый выход электронного транспорта (при $t = 0$); ABS/RC – поток энергии, поглощаемый одним активным реакционным центром (РЦ), PI_{ABS} – индекс производительности, показатель функциональной активности ФСII, отнесенный к поглощенной энергии.

Все измерения проводили не менее чем в пяти повторностях. На рисунках представлены данные средних значений и стандартные отклонения. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с уровнем достоверности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отбор штамма микроводорослей с высокими значениями роста и фотосинтетической активностью. Культивирование микроводорослей на сточных водах аквакультуры является весьма перспективным подходом для биоремедиации, однако не все виды микроводорослей способны расти на среде сточных вод. На первом этапе был проведен скрининг и изучены биофизические параметры микроводорослей с целью выбора штамма с вы-

сокими значениями скорости роста на сточной воде.

На рис. 1а представлены кривые роста клеток исследуемых штаммов микроводорослей на сточной воде рыбного хозяйства. Исходное количество клеток в начале эксперимента составляло 0.5×10^6 кл./мл во всех опытных вариантах. Исследования показали, что микроводоросли *C. vulgaris* SP BB-2 на сточной воде быстрее росли по сравнению с остальными культурами микроводорослей. Количество клеток этого штамма на 6 сут культивирования на сточной воде составляло 6.1×10^6 кл./мл, тогда как для штаммов *C. reinhardtii* CC-124 и *P. kessleri* Bh-2 количество клеток было 3.8×10^6 и 4.0×10^6 кл./мл соответственно. На среде Тамия количество клеток *C. vulgaris* SP BB-2 на 6 сут составило 3.8×10^6 кл./мл, а на воде из скважины 2.7×10^6 кл./мл (рис. 1б). Таким образом, по результатам изучения роста микроводорослей можно утверждать, что штамм *C. vulgaris* SP BB-2 наиболее активно развивается в сточной воде аквакультуры.

Для оценки изменений фотосинтетической активности в клетках водорослей измерены параметры индукционных и световых кривых флуоресценции хлорофилла. Параметр флуоресценции F_V/F_M позволяет определить максимальную эффективность процессов ФСII, связанную с разложением воды и выделением кислорода (Schreiber, 2004). Проведенные нами исследования показали, что максимальный квантовый выход первичных фотохимических реакций F_V/F_M (ϕ_{P_0}) у всех штаммов микроводорослей, выросших на лабораторных средах, находится на достаточно высоком уровне (0.58–0.62) (табл. 1). Отмечается небольшое увеличение этого параметра у штамма *C. vulgaris* SP BB-2 по сравнению с другими культурами. На сточных водах этот параметр был достоверно увеличен у *C. vulgaris* SP BB-2 при выращивании на 3 сут культивирования по сравнению со средой Тамия. При этом спектры поглощения суспензий разных штаммов водорослей практически не различались (данные не представлены) при регистрации на 3 и 7 сут культивирования, что свидетельствует об отсутствии влияния сточной воды на пигментный аппарат. При очень длительном культивировании (10–20 сут) отмечалось уменьшение значения F_V/F_M , что, по-видимому, обусловлено исчерпанием биогенных элементов в сточной воде за счет потребления их водорослями. При выращивании на воде из скважины, параметр F_V/F_M был существенно снижен у всех штаммов микроводорослей (табл. 1).

На рис. 2 представлены кинетики индукции флуоресценции микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 на сточной воде и среде Тамия, а также на воде из скважины. В кинетике индукции флуоресценции в ответ на свет высокой интенсивности

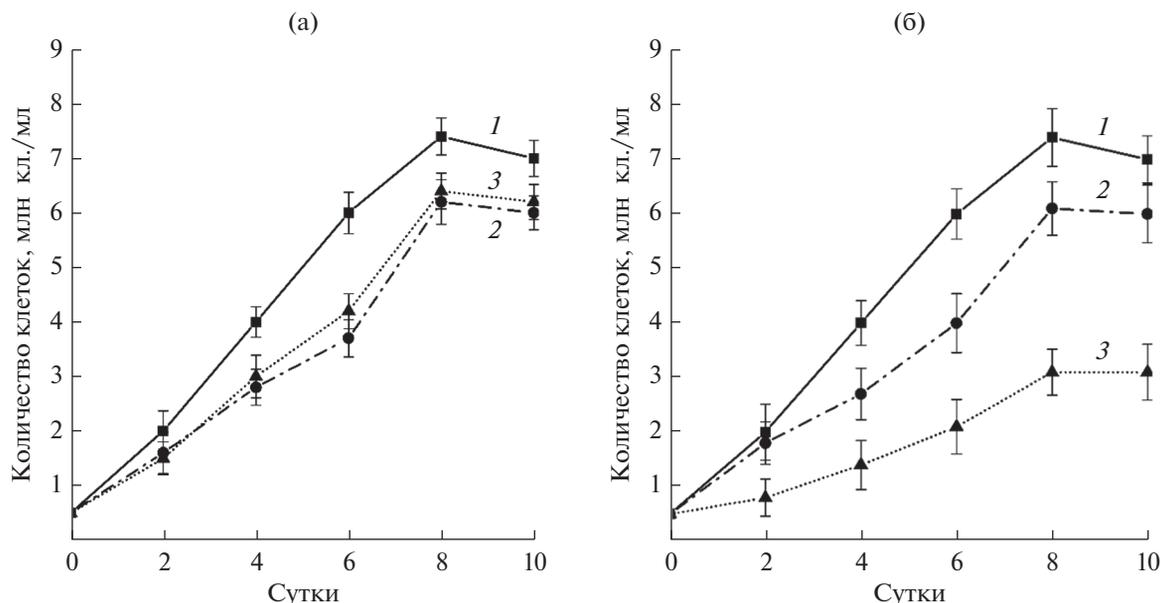


Рис. 1. Динамика роста штаммов микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 (1), *C. reinhardtii* CC-124 (2) и *P. kessleri* Bh-2 (3) на сточной воде аквакультуры (а) и штамма *C. vulgaris* SP BB-2 при культивировании на сточной воде (1), среде Тамия (2) и воде из скважины (3) (б).

наблюдалось несколько стадий, известных как O-J-I-P переходы (Strasser et al., 2004). Начальный уровень O соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при “открытых” РЦ ФСII (F_0), когда все первичные акцепторы в ФСII (Q_A) окислены. Фаза O-J обусловлена светоиндуцированным восстановлением Q_A , тогда как следующие фазы отражают, главным образом, дальнейшее накопление восстановленного Q_A , обусловленное снижением его реокисления в результате восстановления акцепторов Q_B и пула хинонов (Lazár, Schansker, 2009; Kalaji et al., 2014). Согласно полученным нами результатам, у штамма микроводоросли *C. vulgaris* SP BB-2, выращенного на сточной воде аквакультуры, увеличивалась фаза фотохимического тушения (J-I-P), связанная с утилизацией световой энергии при фотосинтезе. При выращивании этих водорослей на воде из скважины эта фаза сильно уменьшена, но увеличена фаза O-J, что указывает на уменьшение оттока электронов от акцептора Q_A . Параметры кинетической кривой O-J-I-P, рассчитанные с использованием JIP-теста, представлены в табл. 1. Определено, что все параметры были близки у штаммов микроводорослей, растущих на сточных водах и на лабораторных средах. Отмечалось увеличение параметров квантового выхода электронного транспорта в ФСII (ϕ_{E_0}) и индекса производительности (PI_{ABS}) у *C. vulgaris* SP BB-2 при выращивании на сточной воде аквакультуры. Параметр PI_{ABS} является показателем функциональной активности ФСII, отнесенным к поглощенной

энергии (ABS), и характеризуется высокой чувствительностью к разным экологическим факторам (Kalaji et al., 2014). Увеличение этих параметров у штамма *C. vulgaris* SP BB-2 в сточных водах сопровождалось уменьшением значения параметров V_j (относительная амплитуда фазы O-J) что, вероятно, связано с увеличением доли активных реакционных центров ФСII относительно поглощаемого света (Lazár, Schansker, 2009). При выращивании всех штаммов микроводорослей на воде из скважины параметры ϕ_{E_0} и индекс производительности PI_{ABS} были снижены, особенно PI_{ABS} , а параметры ABS/RC и V_j , соответственно, увеличены. Это подтверждает ухудшение реакций фотосинтеза водорослей, растущих на воде из скважины.

Для исследования реакции микроводорослей на световую нагрузку регистрировали световые кривые параметров флуоресценции. На рис. 2 представлены кинетики относительной скорости нециклического электронного транспорта ($rETR$) штамма микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2, выращенных на сточной воде, среде Тамия и воде из скважины. Как видно из рисунка, при выращивании этого штамма на сточной воде аквакультуры скорость нециклического электронного транспорта увеличена, а при выращивании на воде из скважины уменьшена.

По световым кривым $rETR$ рассчитывались относительная максимальная скорость электронного транспорта (ETR_{max}) и коэффициент максимальной утилизации световой энергии (α) (табл. 1). У штамма

Таблица 1. Параметры индукционных и световых кривых флуоресценции штаммов микроводорослей при выращивании на сточной воде аквакультуры, лабораторных средах и на воде из скважины на 3 сут

Параметры флуоресценции	<i>C. vulgaris</i> SP BB-2	<i>P. kessleri</i> Bh-2	<i>C. reinhardtii</i> CC-124
	Сточная вода		
F_V/F_M	0.64 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.59 ± 0.02
V_J	0.55 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.6 ± 0.01
Φ_{E_0}	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01
ABS/RC	4.51 ± 0.09	4.76 ± 0.12	5.19 ± 0.11
PI_{ABS}	0.29 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.03
ETR_{max} , отн. ед.	142 ± 2.1	138 ± 1.6	134 ± 2.1
α	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.2 ± 0.01
	Среда Тамия	Среда Тамия	Среда L2-min
F_V/F_M	0.62 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.58 ± 0.01
V_J	0.56 ± 0.02	0.62 ± 0.01	0.65 ± 0.03
Φ_{E_0}	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.2 ± 0.03
ABS/RC	5.1 ± 0.11	5.14 ± 0.09	5.95 ± 0.2
PI_{ABS}	0.21 ± 0.05	0.19 ± 0.03	0.17 ± 0.04
ETR_{max} , отн. ед.	124 ± 1.9	120 ± 1.6	119 ± 1.6
α	0.22 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.17 ± 0.02
	Вода из скважины		
F_V/F_M	0.49 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.02
V_J	0.71 ± 0.03	0.66 ± 0.02	0.68 ± 0.01
Φ_{E_0}	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01
ABS/RC	7.21 ± 0.51	8.28 ± 0.32	7.81 ± 0.44
PI_{ABS}	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
ETR_{max} , отн. ед.	94 ± 1.7	84 ± 1.6	83 ± 1.5
α	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02

C. vulgaris SP BB-2 при выращивании на сточной воде по сравнению со средой Тамия отмечалось увеличение этих показателей, что согласуется с изменениями в электрон-транспортной цепи, зарегистрированными по индукционным кривым флуоресценции. У всех штаммов микроводорослей при выращивании на воде из скважины все эти параметры были снижены.

Факт высокой скорости роста штамма *C. vulgaris* SP BB-2 на сточной воде подтвердился при анализе прироста биомассы (табл. 2). При выращивании штаммов *C. vulgaris* SP BB-2, *P. kessleri* Bh-2 и *C. reinhardtii* CC-124 на воде из скважины наблюдали низкий прирост биомассы со значениями 1.51, 1.49 и 1.25 г/л соответственно. В то время как прирост биомассы на лабораторных средах составил 2.47 г/л для штамма *C. vulgaris* SP BB-2, 2.45 г/л для *P. kessleri* Bh-2 и 2.42 г/л для *C. reinhardtii* CC-124. При выращивании на сточной воде аквакультуры из исследованных штаммов мик-

роводорослей наиболее высокую продуктивность по биомассе показал штамм *C. vulgaris* SP BB-2. Полученные результаты показывают, что сточные воды аквакультуры могут быть эффективно использованы в качестве питательных сред для накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2.

Эффективность очистки сточных вод аквакультуры с помощью микроводорослей. Эффективность удаления загрязняющих веществ является важным критерием для выбора штамма микроводорослей в очистке сточных вод. В основном этот процесс связан с потреблением органического углерода, азота и фосфора из среды (Bohutskyi et al., 2015). Для оценки эффективности штаммов микроводорослей в очистке сточных вод аквакультуры были измерены такие показатели как ХПК (химическое потребление кислорода), концентрация аммонийного азота и фосфора. По результатам исследования все культуры микроводорос-

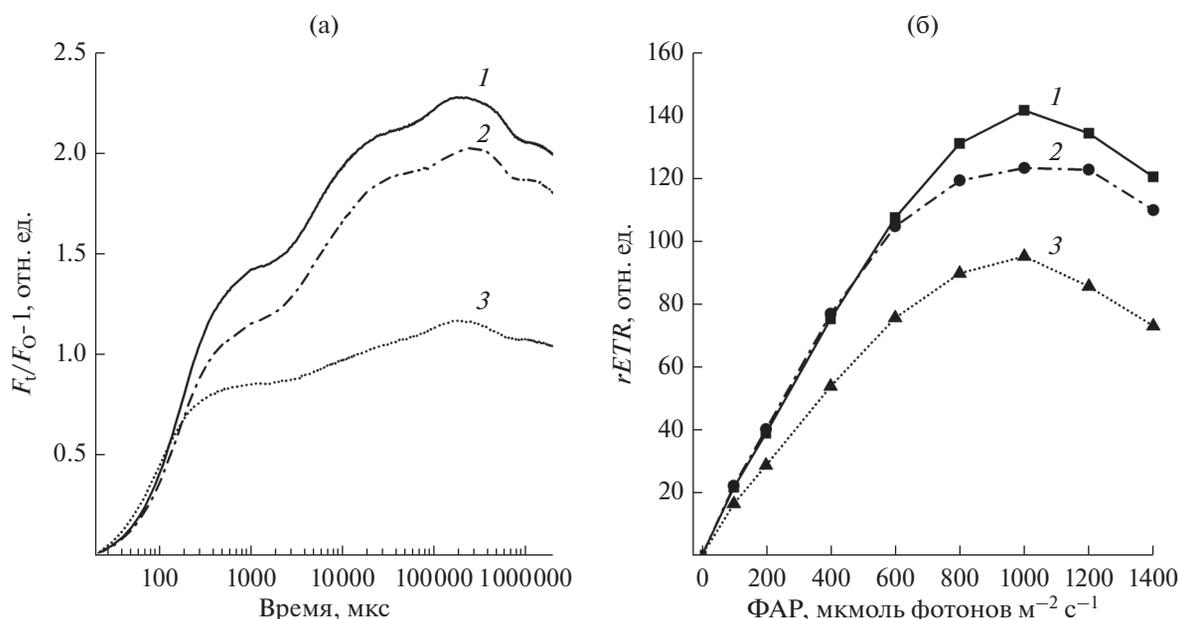


Рис. 2. Кинетики индукции флуоресценции (а) и относительной скорости нециклического электронного транспорта ($rETR$) (б) штамма водорослей *C. vulgaris* SP BB-2, выращенного на сточной воде аквакультуры (1), среде Тамия (2) и воде из скважины (3). ФАР – фотосинтетически активная радиация.

лей показали потенциал в очистке сточных вод аквакультуры от органических и биогенных веществ при выращивании.

ХПК является косвенным показателем наличия органического вещества в сточных водах. Из данных рис. 3 следует, что в присутствии всех штаммов микроводорослей происходило снижение ХПК. Но наибольшую эффективность показал штамм *C. vulgaris* SP BB-2.

Микроводоросли способны усваивать азот в форме аммиака, нитрата, нитрита и мочевины, но аммонийный азот является более предпочтительным (Mata et al., 2012; Delgadillo-Mirquez et al., 2016). Нами было изучено потребление штаммами микроводорослей аммонийного азота из сточной воды аквакультуры (рис. 4). У всех штаммов микроводорослей наблюдалась высокая активность потребления аммонийной формы азота. Его практически полное удаление из среды достигалось на 8 сут роста у всех исследуемых штаммов.

Фосфор также является еще одним из важных макроэлементов, который влияет на рост микроводорослей (Subramaniyam et al., 2016). Изменение концентраций фосфора в виде ортофосфата показано на рис. 4б. Потребление фосфора в виде ортофосфата в первые 6 сут культивирования у всех штаммов было сравнимым и составило >75% от исходного значения. К концу культивирования на 14 сут этот показатель для *C. vulgaris* SP BB-2 составил 100%. Полученные результаты показывают, что все штаммы микроводорослей имеют высокую скорость удаления фосфатов из сточных вод аквакультуры, однако *C. vulgaris* SP BB-2 показывает наибольшую эффективность.

Биохимический состав биомассы микроводорослей. Микроводоросли привлекают внимание как потенциальный сырьевой источник для пищевых и кормовых целей (Dickinson et al., 2013). Нами был проанализирован состав основных биоорганических компонентов полученной биомассы после культивирования в сточных водах. По ре-

Таблица 2. Накопление биомассы штаммов микроводорослей при выращивании на сточной воде аквакультуры, лабораторных средах и на воде из скважины на 14 сут

Среды для культивирования микроводорослей	Выход биомассы, г/л		
	<i>C. vulgaris</i> SP BB-2	<i>P. kessleri</i> Bh-2	<i>C. reinhardtii</i> CC-124
Сточная вода	2.89 ± 0.01	2.38 ± 0.01	2.25 ± 0.01
Лабораторные среды	2.47 ± 0.01	2.45 ± 0.01	2.42 ± 0.01
Скважина	1.51 ± 0.03	1.49 ± 0.01	1.25 ± 0.01

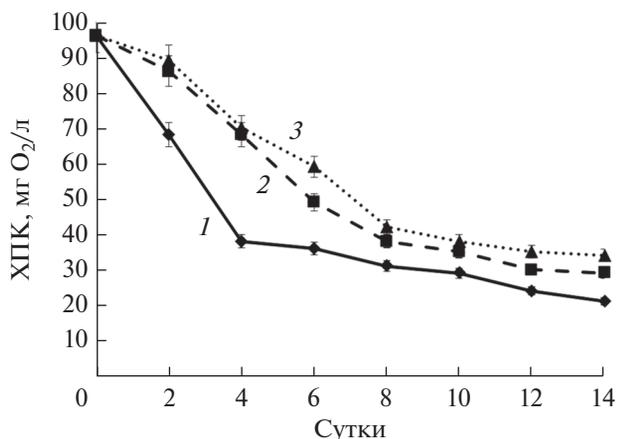


Рис. 3. Динамика показателя ХПК при культивировании штаммов микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 (1), *C. reinhardtii* CC-124 (2) и *P. kessleri* Bh-2 (3) на сточной воде аквакультуры.

результатам исследования содержание белка в полученной биомассе *C. vulgaris* SP BB-2 составило $57.0 \pm 1.2\%$, для *C. reinhardtii* CC-124 – $35.55 \pm 1.1\%$ и для *P. kessleri* Bh-2 – $32.3 \pm 1.1\%$ (табл. 3). Содержание липидов для *C. vulgaris* SP BB-2 составило $16 \pm 1.2\%$ и для *C. reinhardtii* CC-124 и *P. kessleri* Bh-2 – $15 \pm 1.2\%$ при выращивании на сточных водах. Показатели общего содержания углеводов для всех штаммов были схожими (табл. 3). Таким образом, штамм *C. vulgaris* SP BB-2 при культивировании на сточных водах показал высокое содержание белка, что позволяет рекомендо-

вать использование этих микроводорослей в кормовых целях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Активное использование микроводорослей в качестве биоремедиации сточных вод помогает очищать воды от избыточного количества минеральных и органических соединений. На сточных водах обычно культивируют микроводоросли, способные к миксотрофному росту, поскольку в этом случае возможна параллельная утилизация органических источников углерода (Cabanelas et al., 2013).

Выделяя кислород в процессе фотосинтеза, микроводоросли обеспечивают окисление органических загрязняющих веществ в среде. Кроме того, микроводоросли способны ассимилировать из сточных вод азот и фосфор, что выгодно отличается от обычных методов ремедиации. Одним из подходов для решения проблемы очистки сточных вод является выбор высокоактивных штаммов микроводорослей (Malla et al., 2015).

В нашей работе был отобран штамм микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 для использования в очистке рыбохозяйственных сточных вод с возможностью получения кормовой биомассы. По результатам исследований этот штамм продемонстрировал повышенную скорость роста на сточной воде аквакультуры. Этот штамм показал также эффективность снижения показателя ХПК, который используется в качестве косвенного показателя количества органических соединений, присутству-

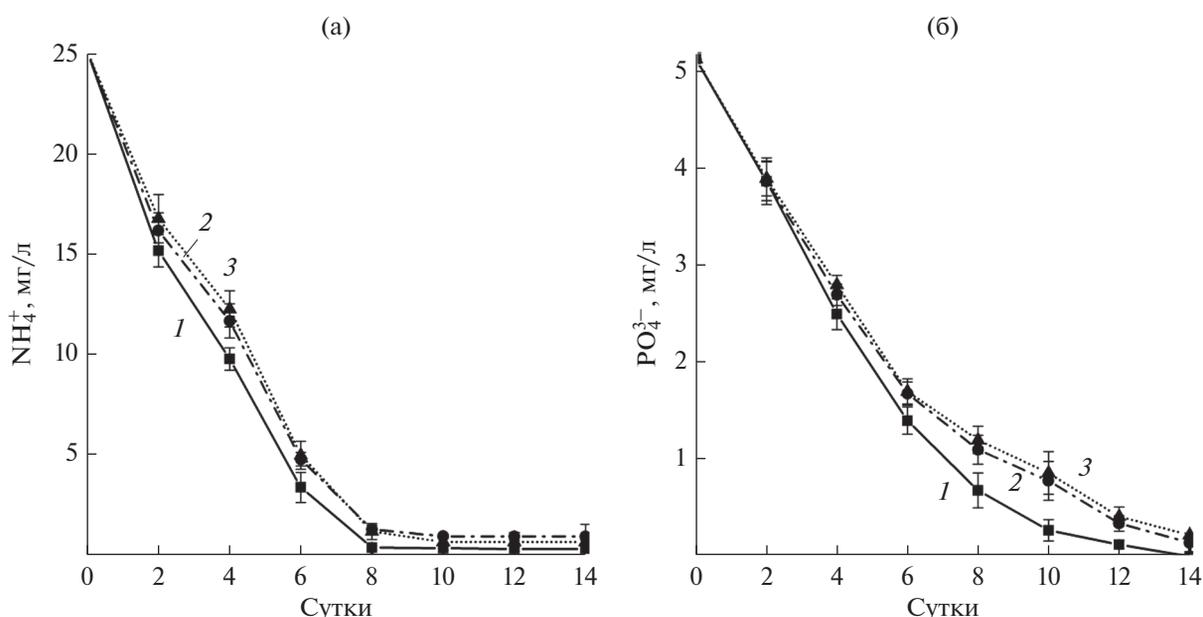


Рис. 4. Уменьшение концентрации NH_4^+ (а) и PO_4^{3-} (б) при культивировании штаммов микроводорослей *C. vulgaris* SP BB-2 (1), *C. reinhardtii* CC-124 (2) и *P. kessleri* Bh-2 (3) на сточной воде аквакультуры.

Таблица 3. Содержание белков, углеводов и липидов в биомассе разных штаммов микроводорослей после культивирования в сточных водах аквакультуры на 14 сут (% от веса сухого вещества)

Параметры, %	<i>C. vulgaris</i> SP BB-2	<i>P. kessleri</i> Bh-2	<i>C. reinhardtii</i> CC-124
Белок	57.0 ± 1.2	32.3 ± 1.1	35.55 ± 1.1
Углеводы	11.4 ± 1.4	11.4 ± 1.2	11.56 ± 1.1
Липиды	16 ± 1.2	15 ± 1.2	15 ± 1.2

ющих в сточных водах, и его снижение указывает на то, что микроводоросли могут обладать потенциалом для использования органических соединений (Hu et al., 2012). Высокая скорость снижения ХПК является показателем жизнеспособности микроводорослей при изначально высоких уровнях ХПК (Wang et al., 2012). Этот штамм продемонстрировал также эффективность в отношении удаления фосфатов из сточной воды аквакультуры.

С использованием флуоресцентных методов было обнаружено, что штамм *C. vulgaris* SP BB-2 также обладает высокой фотосинтетической активностью, что важно для процесса очистки стоков, так как выделяемый при фотосинтезе кислород позволяет проводить аэрацию сточных вод (Guldhe et al., 2017). Проведенный нами комплексный анализ параметров световых и индукционных кривых флуоресценции хлорофилла показал, что у микроводоросли *C. vulgaris* SP BB-2 в сточных водах происходит увеличение таких параметров фотосинтеза как максимальный квантовый выход ФСII (F_V/F_M), максимальная относительная скорость транспорта электронов (ETR_{max}), коэффициент максимальной утилизации световой энергии (α), эффективность транспорта электронов (Φ_{E0}) и индекса производительности (PI_{ABS}). Одновременно это сопровождается уменьшением доли Q_B -невосстанавливающих центров (V_j). Из этого набора параметров для мониторинга состояния фотосинтеза водорослей в водоемах можно предложить наиболее чувствительные параметры индукции флуоресценции хлорофилла – PI_{ABS} и Φ_{E0} .

Регистрация изменений фотосинтетической активности по этим параметрам флуоресценции позволит неинвазивно контролировать жизнеспособность и активность водорослей во время очищения вод. В частности, во многих работах отмечалось, что квантовый выход ФСII зависит от концентрации биогенных элементов в среде (Маторин, Рубин, 2012). При исчерпании биогенных элементов и наступлении азотного или фосфорного дефицита может происходить выключе-

ние работы ФСII, что отражается на параметрах флуоресценции (Prašil, Borowitzka, 2011). В настоящее время существуют малогабаритные приборы, которые позволяют вести непрерывный контроль содержания и состояния водорослей в течение длительного времени, и получаемая информация может быть передана по любым телекоммуникационным каналам в удобной для пользователя форме (Маторин, Рубин, 2012).

Использование сточных вод в качестве питательных сред для культивирования микроводорослей является весьма перспективным, поскольку позволяет объединить технологии очистки водных ресурсов и накопления биомассы микроводорослей. В практике аквакультуры микроводоросли являются важными источниками питания рыб при прямом потреблении, либо в качестве косвенно приготовленного корма. Биомасса микроводорослей богата белками, липидами и углеводами, которые являются необходимыми питательными веществами для водных животных. В настоящее время много литературных данных об исследованиях процессов культивирования микроводорослей с использованием сточных вод (Sabanelas et al., 2013). Однако отмечают тот факт, что не каждый штамм микроводорослей способен адаптироваться к росту на сточных водах (Zhang et al., 2014). Результаты наших исследований показали, что штамм *C. vulgaris* SP BB-2 обладает лучшей адаптационной способностью расти на сточных водах водоемов рыбохозяйственного назначения из всех исследованных штаммов микроводорослей. Штамм *C. vulgaris* SP BB-2 может быть эффективно использован при биоремедиации сточных вод с целью их очистки от органоминеральных загрязнений. Кроме того, этот штамм показал высокое накопление биомассы с повышенным содержанием белка, и поэтому может быть рекомендован в качестве побочного продукта для получения дешевой кормовой добавки в аквакультуре.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды” и при поддержке грантов РФФИ № 20-04-00465 и РНФ № 20-64-46018.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Заядан Б.К., Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К. Каталог коллекций культур микроводорослей и цианобактерий. Алматы.: Абзал-Ай, 2017. 135 с.
- Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей. М.: Ижевск, 2012. 256 с.
- Bohutskiy P., Liu K., Nasr L.K., Byers N., Rosenberg J.N., Oyler G.A., Betenbaugh M.J., Bouwer E.J. Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 6139–6154.
- Cabanelas I.T.D., Ruiz J., Arbib Z., Chinalia F.A., Garrido-Pérez C., Rogalla F., Nascimento I.A., Perales J.A. Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 131. P. 429–436.
- Caporgno M.P., Taleb A., Olkiewicz M., Font J., Pruvost J., Legrand J., Bengoa C. Microalgae cultivation in urban wastewater: nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane // *Algal Res.* 2015. V. 10. P. 232–239.
- Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D.C.: APHA-AWWA-WEF, 1998. 2671 с.
- Cogan E.B., Birrell G.B., Griffith O.H. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates // *Anal. Biochem.* 1999. V. 271. P. 29–35.
- Dickinson K.E., Whitney C.G., McGinn P.J. Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD // *Algal Res.* 2013. V. 2. P. 127–134.
- Delgadillo-Mirquez L., Lopes F., Taidi B., Pareau D. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture // *Biotechnol. Rep.* 2016. V. 11. P. 18–26.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J.A. Colorimetric method for the determination of sugars // *Nature.* 1951. V. 168. P. 167.
- Gao F., Li C., Yang Z.H., Zeng G.M., Feng L.J., Liu J.Z., Liu M., Cai H.W. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal // *Ecol. Eng.* 2016. V. 92. P. 55–61.
- Guldhe A., Ansari F.A., Singh P., Bux F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation // *Ecol. Eng.* 2017. V. 99. P. 47–53.
- Guo Z., Liu Y., Guo H., Yan S., Mu J. Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production // *J. Environ. Sci.* 2013. V. 25. P. S85–S88.
- Hu B., Min M., Zhou W., Li Y., Mohr M., Cheng Y. Influence of exogenous CO₂ on biomass and lipid accumulation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* cultivated in concentrated municipal wastewater // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 166. P. 1661–1673.
- Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Kalaji V., Bosa K., Al-lakhverdiev S., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D.B., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Seródio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M. Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues // *Photosynth. Res.* 2014. V. 122. P. 121–158.
- Lazár D., Schansker G. Models of chlorophyll *a* fluorescence transients // *Photosynthesis in Silico.* Springer Netherlands. 2009. V. 29. P. 85–123.
- Lee Y., Chen W., Shen H., Han D., Li Y., Jones H.D.T., Timlin J.A., Hu Q. Basic culturing and analytical measurement techniques // *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* / Eds. Richmond A., Hu Q. New York: Blackwell Publishing Ltd., 2013. P. 37–68.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagents // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
- Malla F.A., Khan S.A., Sharma G.K., Gupta N., Abraham G. Phycoremediation potential of *Chlorella minutissima* on primary and tertiary treated wastewater for nutrient removal and biodiesel production // *Ecol. Eng.* 2015. V. 75. P. 343–349.
- Marsh J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // *J. Lipid Res.* 1966. V. 7. P. 574–576.
- Mata T.M., Melo A.C., Simões M., Caetano N.S. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus* // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 107. P. 151–158.
- Mohsenpour S.F., Hennige S., Willoughby N., Adeyoye A., Gutierrez T. Integrating micro-algae into wastewater treatment: a review // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 752. 142168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>
- Nayak M., Karemore A., Sen R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application // *Algal Res.* 2016. V. 16. P. 216–223.
- Prašil O., Borowitzka M.A. Chlorophyll *a* Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications. Dordrecht: Springer, 2011. 326 p.
- Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Øie G., Olsen Y. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae // *Aquaculture.* 1997. V. 155. P. 207–221.
- Schreiber U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview // *Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* / Ed. G. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 279–319.

Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient // Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis / Ed. G. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 321–362.

Subramaniam V., Ramraj S., Ganeshkumar V. Bioresource technology cultivation of *Chlorella* on brewery wastewater and nano-particle biosynthesis by its biomass // Bioresour. Technol. 2016. V. 211. P. 698–703.

Wang H., Xiong H., Hui Z., Zeng X. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids // Bioresour. Technol. 2012. V. 104. P. 215–220.

Zhang T.Y., Wu Y.H., Hu H.Y. Domestic wastewater treatment and biofuel production by using microalga *Scenedesmus* sp. ZTY1 // Water Sci. Technol. 2014. V. 69. P. 2492–2496.

Determination of the Promising Microalgal Strain for Bioremediation of the Aquaculture Wastewater

N. R. Akmukhanova¹, B. K. Zayadan¹, A. K. Sadvakasova¹, M. M. Torekhanova¹,
N. P. Timofeev², M. O. Bauenova¹, D. A. Todorenko², and D. N. Matorin^{2, *}

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040 Kazakhstan

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: dnmatorin@mail.ru

Received February 24, 2022; revised April 4, 2022; accepted April 6, 2022

Abstract—Applicability of three strains of green microalgae (*Chlorella vulgaris* SP BB-2, *Parachlorella kessleri*, and *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard CC-124) for bioremediation (contaminants removal) of aquaculture wastewater was investigated. *C. vulgaris* strain SP BB-2 exhibited the highest growth rate and biomass accumulation. This strain was found to utilize nitrogen and phosphorus from wastewater for growth and development and showed high efficiency according to chemical oxygen demand (COD). Moreover, among the studied strains, *C. vulgaris* SP BB-2 produced biomass with the highest protein content, which may be recommended as a feed additive for the aquaculture. Analysis of the induction and rapid light curves of chlorophyll fluorescence revealed alterations in the energy storage photosynthetic processes of *C. vulgaris* SP BB-2 cells when grown on the aquaculture wastewater. Thus, high values of the maximum quantum yield of primary photochemistry in photosystem II (PSII) (F_v/F_M), quantum yield of electron transport (Φ_{E_0}), PSII performance index on absorption basis (PI_{ABS}), and the light utilization coefficient (α) were observed. *C. vulgaris* strain SP BB-2 may be recommended for wastewater treatment, while its highly sensitive parameters of chlorophyll fluorescence induction (PI_{ABS} , Φ_{E_0}) may be used as indicators of the state of the microalgae.

Keywords: microalgae, bioremediation, chlorophyll *a* fluorescence, JIP test

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИЗАВИСИМОСТЬ СОСТАВА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
ЛЯДВЕНЦА РОГАТОГО (*LOTUS CORNICULATUS*) ОТ СТАДИИ
ВЕГЕТАЦИИ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА© 2022 г. Ан. Х. Баймиев^а, *, Е. С. Акимова^а, И. С. Коряков^а, А. А. Владимиров^а, Ал. Х. Баймиев^а^аИнститут биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: baymiev@anrb.ru

Поступила в редакцию 17.03.2022 г.

После доработки 11.04.2022 г.

Принята к публикации 17.04.2022 г.

Бобово-ризобиальный симбиоз – уникальное природное явление, способное обеспечивать бобовое растение минеральным азотом, фиксированным из атмосферы. В зоне умеренного климата вследствие сезонности растения вынуждены в начале каждого раунда вегетации образовывать новые взаимодействия с ризобиями с формированием специализированных структур на корнях, называемых клубеньками, где, собственно, и происходит фиксация молекулярного азота. В разные периоды роста и развития потребность растения в минеральном азоте сильно различается, что может оказывать влияние на трофические связи с микросимбионтами. Нами в данной работе на примере многолетнего бобового растения лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.) была проведена оценка влияния стадии вегетации макросимбионта на состав его клубеньковых бактерий и их характеристики. Было обнаружено, что микроорганизмы, формирующие клубеньки на корнях лядвенца, в начале вегетации имели наибольший уровень генетического разнообразия. К середине же развития растения данный уровень снижался, а к концу вегетации снова повышался. Анализ азотфиксирующей активности бактерий показал, что наиболее активно фиксируют азот штаммы микроорганизмов, выделенные из клубеньков, собранных на начальных стадиях развития макросимбионта, в то время как у штаммов, выделенных из клубеньков в конце вегетации активность азотфиксации значительно ниже. Вероятно, бобовые растения на разных этапах развития используют различные стратегии при выборе своих микросимбионтов.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, лядвенец рогатый, симбиотические гены ризобий, стадии вегетации растения

DOI: 10.31857/S0026365622100172

Азот является важнейшим элементом, оказывающим огромное влияние на плодородие почвы и урожайность сельскохозяйственных культур. Основная масса азота, содержащегося в населяющих нашу планету живых организмах, своим происхождением обязана деятельности микроорганизмов, способных ассимилировать молекулярный азот атмосферы, восстанавливая его до аммиака. Этот процесс называется биологической азотфиксацией (Ohyama, Sueyoshi, 2010). Наиболее эффективными азотфиксаторами являются клубеньковые бактерии (ризобии) – микроорганизмы, вступающие в симбиоз с бобовыми и образующие на корнях данных растений специализированные структуры – клубеньки, в которых и происходит процесс азотфиксации. Важным направлением исследований в этой области является изучение возможностей увеличения эффективности симбиотической азотфиксации. Несмотря на высокую специфичность взаимодействия бобовых расте-

ний с их клубеньковыми бактериями, в ризосфере формируется большое разнообразие генетических вариантов (штаммов) ризобий, отличающихся по своей эффективности симбиотической азотфиксации. Это приводит к тому, что не все клубеньки формируются эффективными микроорганизмами, что, в свою очередь, сказывается на продуктивности растения (Проворов и соавт., 2008).

Основным генетическим компонентом в бобово-ризобиальном взаимодействии являются симбиотические гены бактерий (*sym*-гены), которые определяют во многом специфичность и эффективность данного симбиоза. *Sym*-гены включают в себя ответственные за фиксацию азота *nif*-гены, которые кодируют синтез и регуляцию фермента нитрогеназы; *nod*-гены, кодирующие синтез Nod-факторов, отвечающих за инициацию и специфичность образуемого симбиоза; а также *fix*-гены, которые также необходимы для азотфиксации, часто сцепленные с

nif-генами, но не гомологичные с ними (Проворов, 1996; Franche et al., 2009). На сегодняшний день проведено большое количество работ, свидетельствующих о высокой мобильности *sym*-генов и подверженности их горизонтальному переносу (ГПГ) (Fischer, 1994; Проворов, Воробьев, 2000; Nandasena et al., 2006; Andam et al., 2007; Barcellos et al., 2007; Zhao et al., 2008). Доказано, что данный процесс является неотъемлемой частью эволюции бобово-ризобиальных взаимоотношений (Freiberg et al., 1997; Bailly et al., 2007; Estrella et al., 2009; Marchetti et al., 2010) и зачастую приводит к появлению штаммов с измененной хозяйской специфичностью или к приобщению новых видов микроорганизмов к группе клубеньковых бактерий (Zaneveld et al., 2008). Участие ГПГ в эволюции ризобий подтверждается локализацией *sym*-генов на мобильных генетических элементах (плазмиды или интегрированные конъюгативные элементы – ICESym), а также характерной для них панмиктической структурой популяций (Provočov, Vorobyev, 2008). Широкая экспансия *sym*-генов в ассоциированных с растениями бактериальных сообществах посредством ГПГ, как считается, является наиболее вероятным способом формирования современного разнообразия ризобий и проявляется в различиях филогении симбиотических генов и генов “домашнего хозяйства” (Bailly et al., 2007; Проворов, Воробьев, 2010). В последнее время появляется понимание того, что панмиктичность популяции, характерная для ризобиальных бактерий, которая приводит к высокой полиморфности, некоторым образом опосредована растительным компонентом и тому есть определенные подтверждения. Показано, что бобовые играют более важную роль в формировании популяционной структуры ризобий, чем эдафические факторы (Carelli et al., 2000; Andronov et al., 2003). В присутствии растений-хозяев происходит увеличение размеров ризобиальных популяций, которое сочетается с их повышенной гетерогенностью (Andrade et al., 2002). Более того, появились данные, что растения и вовсе способны индуцировать горизонтальный перенос симбиотических генов между ризосферными бактериями. Было показано, что частота горизонтального переноса *sym*-генов *Azorhizobium caulinodans* – микросимбионта *Sesbania rostrata* – была значительно увеличена в ризосфере растения-хозяина. Утверждается, что транскрипционный регуляторный белок семейства LysR AhaR запускает процесс горизонтального переноса генов в ответ на растительные флавоноиды, которые индуцируют экспрессию генов нодуляции через другой белок типа LysR, NodD. Таким образом, ризобия способна получать сигналы в ризосфере и активировать перенос своих симбиотических генов в другие ризобии, изменяя их характеристики (Ling et al., 2016).

Целью данной работы являлось исследование изменения состава клубеньковых бактерий лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) в зависимости от стадии его вегетации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись 284 штамма бактерий, выделенные из клубеньков многолетнего бобового растения лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), собранных на разных стадиях его вегетации: во время набухания почек (апрель, май), в период формирования бутонов (июнь) и после закладки растениями почек на зиму с первыми заморозками (октябрь).

Изолирование микроорганизмов из клубеньков проводили методом получения пункций из зоны размножения бактерий и рассеивом ее на питательной агаризованной среде YM (0.1% дрожжевой экстракт; 1% маннит; 0.05% K_2HPO_4 ; 0.05% $MgSO_4$; 0.01% NaCl; 1.5% агар) до отдельных колоний (Баймиев и соавт., 2010). Из каждого клубенька получали по одной чистой культуре бактерий. Предварительную проверку изолятов на принадлежность их к группе клубеньковых бактерий проверяли методом ПЦР-анализа наличия гена *nifH*, характерного для всех видов ризобий.

Выделение тотальной ДНК из бактерий осуществляли методом термокоагуляции. Для этого в 1.5 мл пробирки со 100 мкл 1% Triton X100 и 1% суспензии смолы Chelex100 (“Bio-Rad”, США) помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспендирования инкубировали при температуре 95°C 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР.

Молекулярно-генетический анализ штаммов бактерий. Генетическое разнообразие полученных штаммов исследовали с помощью RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990) с использованием следующих “случайных” праймеров: 1) LMBD 5'-gggcgctg-3'; 2) AFK-1 5'-acggtggacg-3'; 3) OPA 5'-gcgtccattc-3'.

Для амплификации гена 16S рРНК были использованы универсальные праймеры fD1 5'-cccgggataccaagcttaaggaggtgatccagcc-3', rD1 5'-ccgaatctgctgacaacagagtttgatcctggctcag-3', фланкирующие его часть размером около 1500 п.н. (Weisburg et al., 1991). Для амплификации фрагмента гена *recA* были взяты праймеры RecAF 5'-ttcggcaaggmtcgrtsatg-3' и RecAR 5'-acatsacccgatcttcagc-3'. Для амплификации фрагментов *sym*-генов *nifH* и *nodC* были использованы праймеры NifHF 5'-ttctatggaaggcggcattggaagct-3'; NifHR 5'-atctcgccgacatgacgatataatttc-3' и NodCF 5'-cgtttctcttatcgggtgctc-3'; NodCR 5'-cagctgctctcgtattgat-3' соответственно (Баймиев и соавт., 2015).

ПЦР-ПДРФ-анализ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) (Laguette, 1996) гена 16S рРНК проводили с использованием мелко-щепящих эндонуклеаз рестрикции *Hpa*II и *Rsa*I.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 (“Applied Biosystems, Inc.”, США) с использованием наборов “Big Dye Terminator v.3.1”.

Филогенетический анализ исследуемых штаммов проводили на основании множественного выравнивания (Clustal W) секвенированных фрагментов генов 16S рРНК, *recA*, *nodC* и *nifH*. Построение филогенетических деревьев осуществляли с помощью Megalign из пакета программ Lasergene с использованием метода neighbor-joining (NEIGHBOR). Нуклеотидные последовательности для сравнительного анализа были взяты из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности взятых в анализ генов всех исследованных штаммов были зарегистрированы в базе данных GenBank под следующими номерами:

1) 16S рРНК: OL872300, OL872361, OL872741, OL884437, OM914882, OM914885, OM914886, OL884438, OL884442, OL884446, OL884457, OL884458, OL884630, OL884456, OL884611, OM914933.

2) *recA*: OM752311, OM752312, OM752310, OM888662, OM888663, OM913901, OM913902, OM942752, OM942753, OM942754, OM811973, OM811972, OM811974, OM811975, OM811976, OM811977.

3) *nifH*: OM327772, OM327773, OM417617, OM864668, OM864669, OM864670, OM864671, OM686847, OM686848, OM686846, OM650802, OM650801, OM650803, OM650804, OM675983, OM675984.

4) *nodC*: OM509456, OM519321, OM519322, OM519320, OM868043, OM868044, OM868045, OM615896, OM615898, OM615897, OM519323, OM519324, OM519325, OM519326, OM509455, OM615895.

Инокуляция семян лядвенца рогатого анализируемыми штаммами бактерий. Для проведения опытов брали семена, которые ранее нами были собраны с лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*). Поскольку они имеют твердую оболочку, то перед инокуляцией их сначала скарифицировали концентрированной серной кислотой 15 мин, а затем тщательно несколько раз промывали стерильной водой (метод химической скарификации). Далее семена проращивали в течение 36–48 ч на влажной фильтровальной бумаге в стерильных чашках Пет-

ри. Полученные проростки в дальнейшем помещали в стерильные пробирки, каждая из которых содержала по 200 мкл суспензии анализируемых штаммов бактерий по отдельности, и выдерживали в них 20 мин при равномерном перемешивании (50 об./мин). Для приготовления суспензий использовали культуры микроорганизмов, выращенные в жидкой среде УМ в течение 4 сут до 10^9 КОЕ/мл. Далее инокулированные пророщенные семена сажали по 6 штук в контейнер со стерильным влажным песком (400 г) и выращивали в течение месяца в условиях искусственного освещения (16 ч светопериод) при 24–26°C. Для каждого штамма делали по 3 повтора.

Анализ азотфиксирующей активности клубеньковых бактерий осуществляли методом редукции ацетилена (Умаров, 1989). Для этого от побега отделяли корни, промывали их стерильной водой и помещали в стеклянные флаконы объемом 15 мл. Закрывали резиновыми пробками. Затем вносили ацетилен в объеме 10%. Помещали флаконы с образцами и контрольными пробами (флаконы с ацетиленом и без него) в темное место. Через 1 ч проводили анализ содержания ацетилена и этилена по времени выхода каждого газа в исследуемых образцах на газовом хроматографе с пламенным ионизационным детектором Shimadzu GC-2014 (“Shimadzu”, Япония). Количество ацетилена и этилена определяли по калибровочной кривой. Величину азотфиксирующей активности рассчитывали следующим образом:

$$X = C_3/3,$$

где C_3 – концентрация этилена в исследуемом образце, 3 – коэффициент пересчета от редукции ацетилена к азотфиксации. Каждый штамм анализировали в трех биологических повторностях.

Статистический анализ. Для оценки генотипического разнообразия штаммов использовали нормализованный коэффициент Шеннона: $H_s = -\sum g_i \ln(g_i) / \ln N$, где g_i – частота i -го генотипа, а N – объем выборки (Śliwka et al., 2006). Данные по анализу азотфиксации были представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (SEM). Статистически значимые различия между средними значениями оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зона умеренного климата характеризуется ярко выраженной сезонностью, что, в свою очередь, привносит особенности в развитие растений, произрастающих в этой области. В ходе вегетации многолетних растений, в том числе и бобовых, начиная от всхода или набухания почки до созревания семени происходят изменения их потреб-

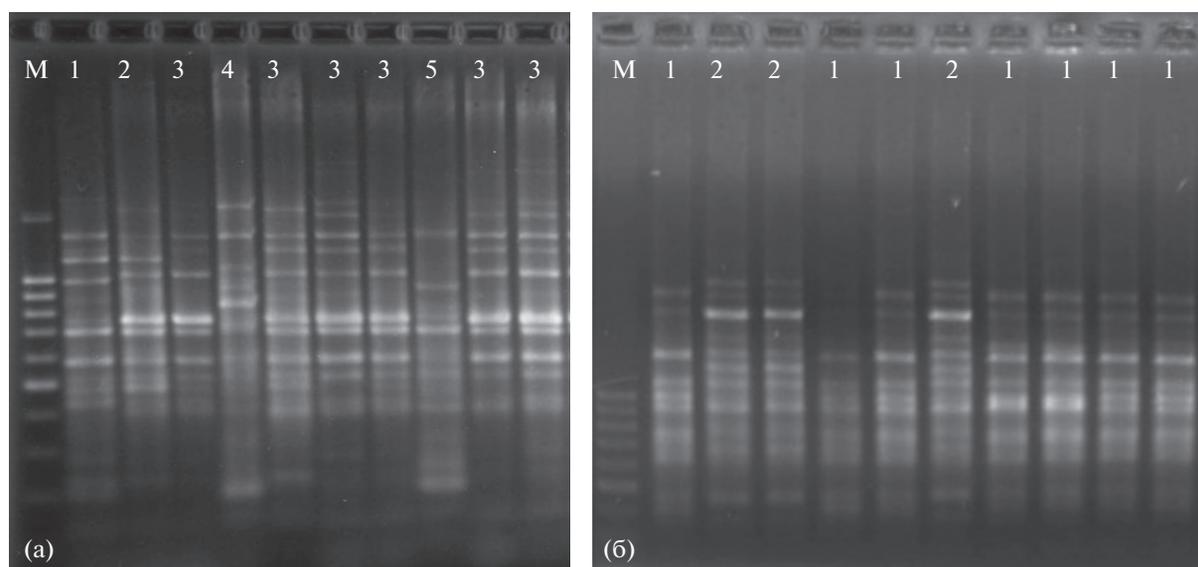


Рис. 1. Примеры фореграмм RAPD-анализа ДНК ризобий, изолированных из клубеньков лядвенца рогатого: а – штаммы, полученные из “весенних” клубеньков; б – штаммы, выделенные из “летних” клубеньков. Цифрами обозначены номера генетически однородных групп. М – 100 п.н. маркер.

ности в минеральном питании, в частности, в азоте. Наиболее интенсивно растение нуждается в азоте в начале вегетации, в то время как на конечных этапах необходимость в нем снижается. Бобовые для обеспечения себя минеральным азотом имеют уникальную возможность вступать в симбиоз с клубеньковыми бактериями, которые, взамен на питательные вещества, предоставляют растениям азот, фиксируемый ими из атмосферы. Для того чтобы понять, как меняются взаимоотношения бактерий и растения в ходе его развития, нами было исследовано генетическое разнообразие и некоторые биохимические параметры ризобий, полученных из клубеньков, которые были сформированы на разных стадиях вегетации растений.

В качестве объекта исследования были выбраны микросимбионты многолетнего бобового растения лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*), выделенные из клубеньков, собранных на разных этапах его развития.

Анализ штаммов на генетический полиморфизм методом RAPD с использованием 3 коротких случайных олигонуклеотидных праймеров показал, что бактерии, полученные из клубеньков растений в разные периоды вегетации, имеют различную степень гетерогенности (рис. 1).

Был обнаружен интересный факт. Показано, что наибольший полиморфизм наблюдался у бактерий, полученных из клубеньков растений на начальной стадии вегетации, собранных в весенний период, где коэффициент разнообразия Шеннона (Hs) достигал значения 0.72. Далее в ходе развития это разнообразие значительно снижалось и к середине вегетационного периода Hs составляло

0.59. А при подготовке к зимнему покою растение опять начинало активно образовывать клубеньки, и они формировались снова более разнообразным пулом бактерий (Hs = 0.64). Также необходимо отметить, что в этот период в клубеньках кроме ризобий выявлялись микроорганизмы, не относящиеся к группе клубеньковых бактерий, в основном принадлежащие к роду *Pseudomonas* (табл. 1).

При предварительном анализе родства методом 16S ПДРФ внутри полученных штаммов были обнаружены филогенетически однородные группы бактерий. У представителей данных групп далее были секвенированы гены 16S рРНК и *recA*, а также симбиотические гены *nodC* и *nifH*. Методом сравнительного анализа определенных нуклеотидных последовательностей с аналогичными последовательностями из базы данных GenBank были выявлены филогенетические положения исследуемых штаммов бактерий.

Установлено, что все изолированные штаммы ризобий из клубеньков лядвенца рогатого, как на основании сравнительного анализа гена 16S рРНК, так и *recA*, принадлежали к роду *Mesorhizobium* (рис. 2). При этом обнаружено, что исследуемые бактерии образуют две группы, одна из которых филогенетически родственна микроорганизмам *M. loti*/*M. ciceri*, а другая значительно отличается от известных видов данного рода. Наибольшую схожесть с образующими отдельную кладу бактериями имеет *M. amorphae*, но процент ее гомологии с ними менее 97%, что не позволяет их отнести к этому виду. Скорее всего, представители отмеченной группы микроорганизмов принадлежат к неопisanному на сегодняшний день виду рода

Таблица 1. Количественный состав бактерий из клубеньков лядвенца рогатого, собранных на разной стадии вегетации растений

Сезон сбора клубеньков	Количество изолятов относящихся к филогенетической группе	Количество гомогенных групп бактерий	Коэфф. разнообразия Шеннона, Hs	Представители филогенетически однородных групп
Весна	14	9	0.74	LotVes2.7
	17	8		LotVes3.15
	10	5		LotVes3
Лето	36	5	0.59	LotLet2.12
	38	4		LotLet3.10
	33	1		LotLet4.5
	17	7		LotLetA1.1
	1	1		LotLetA3.1
	24	6		LotLetA4.1
	1	1		LotLetA4.3
	39	15		LotLetB1.1
Осень	5	1	0.64	LotLetB4.1
	8	5		LotOs1.10
	18	6		LotOs2.2
	8	2		LotOs3.3
	14	4		LotOs5.12

Общее количество изолятов 284

Mesorhizobium и требуют дальнейшего их исследования.

Несмотря на филогенетическое разнообразие бактерий, обнаруживаемых в клубеньках лядвенца, по консервативной части генома, оказалось, что они почти все содержат симбиотические гены, характерные для *Mesorhizobium loti*. Единственным исключением являются микроорганизмы из группы *Mesorhizobium* sp. LotOs1.10, полученные из клубеньков на поздних стадиях вегетации растений. У данных бактерий последовательности гена *nodC* показали очень высокую схожесть с аналогичными последовательностями, описанными у бактерий *M. temperatum*, хотя *nifH* имеет гомологию с соответствующим геном *M. loti* (рис. 3).

Для выявления различий по степени эффективности штаммов клубеньковых бактерий, собранных на разных стадиях вегетации растений, нами был проведен анализ их азотфиксирующей активности. В ходе проделанной работы было выявлено, что наибольшую эффективность азотфиксации показывали штаммы ризобий, полученные из клубеньков лядвенца, собранных на начальной фазе его вегетации. Далее, к середине вегетационного периода азотфиксирующая активность ризобий начинала снижаться, а у бактерий, формирующих “осенние” клубеньки, она имела наименьшее значение (рис. 4).

Очевидно, что у растения при взаимодействии со значительным разнообразием штаммов клубеньковых бактерий в начале вегетации является больше выбора в селекции наиболее подходящих вариантов ризобий.

Сезонность, характерная для умеренного климата, не может не сказаться на симбиотическом взаимодействии бактерий и растений, в том числе и на бобово-ризобиальном симбиозе. Состав бактерий, образующих клубеньки на корнях, имеет значительную зависимость от состояния растения и его трофических связей с клубеньками. Наибольшее разнообразие микроорганизмов в клубеньках бобовых растений, скорее всего, продиктовано тем, что в период высокой потребности в азоте макросимбионт максимально быстро пытается использовать симбиотическое взаимодействие с бактериями для обеспечения себя минеральным питанием. При этом клубеньки, образованные некоторыми штаммами, могут оказаться слишком “дорогими” в плане обеспечения их питанием. Это подтверждают также наши данные об азотфиксирующей активности бактерий, полученные из клубеньков в начале вегетации, которые показывают наибольшие значения. В дальнейшем в ходе развития у растения отмирают затратные варианты клубеньков, и остаются преимущественно наиболее оптимальные вариации с максимально

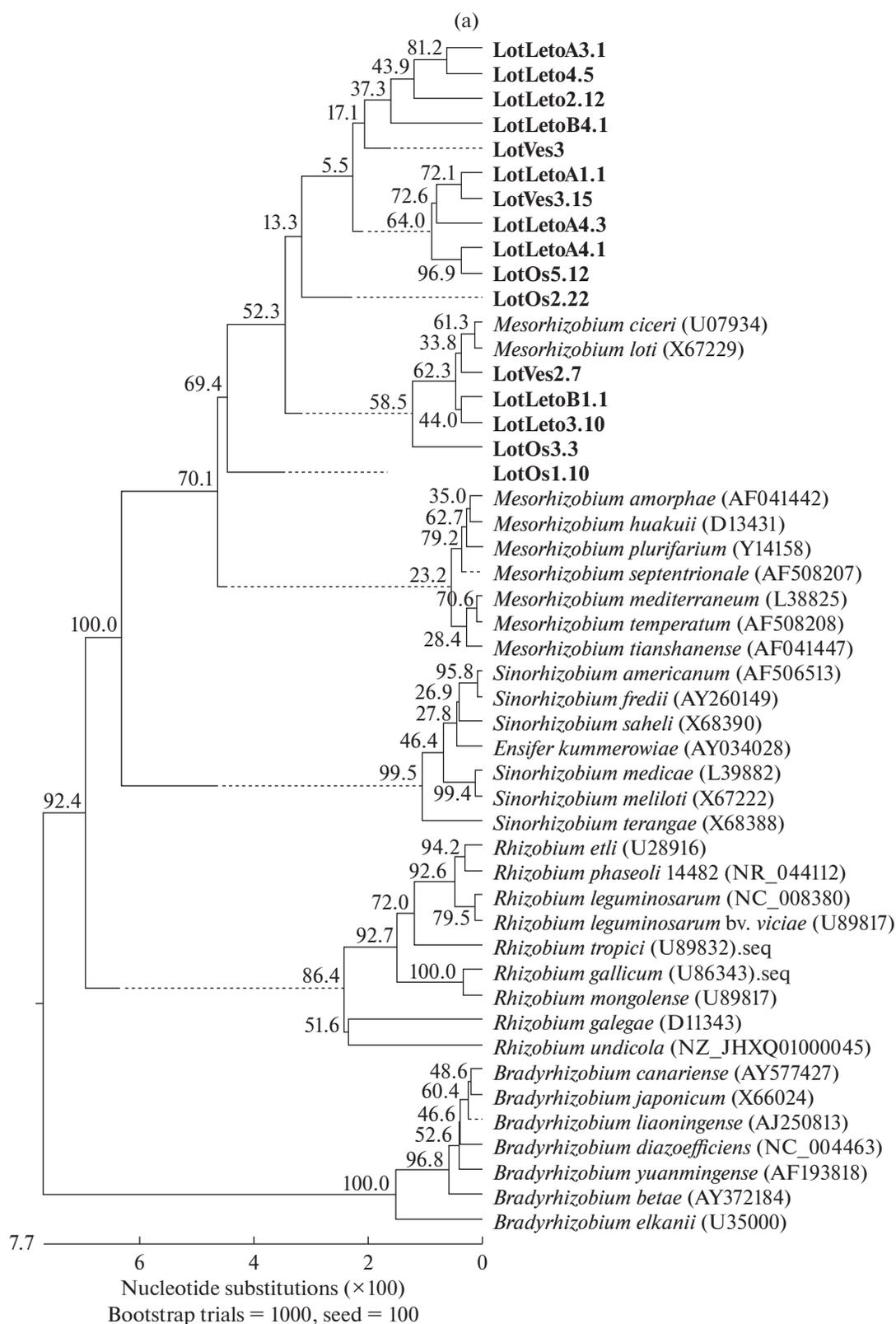


Рис. 2. Филогенетические деревья клубеньковых бактерий, построенные на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК (а) и *recA* (б). Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованные в данной работе.

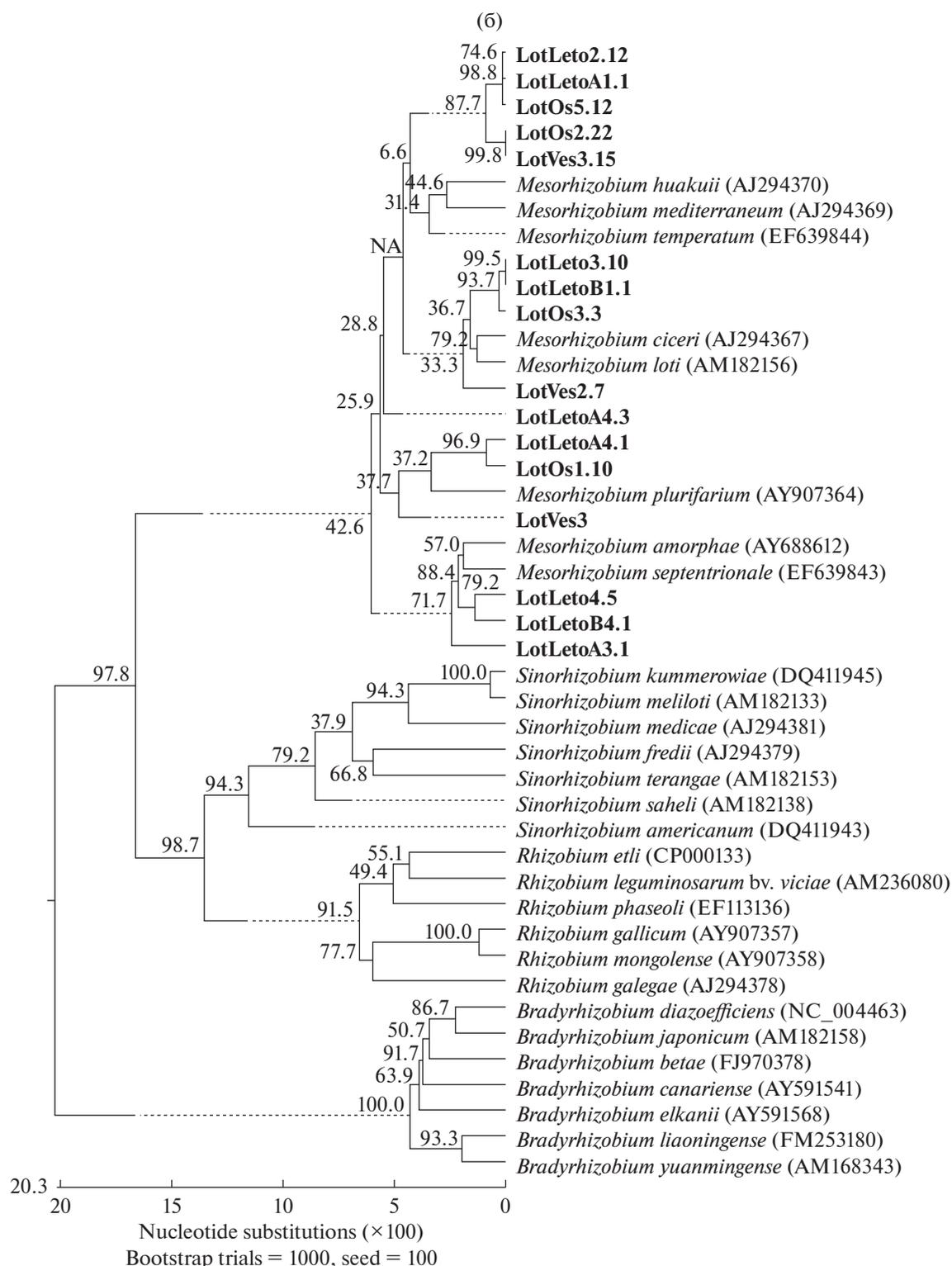


Рис. 2. Продолжение.

выгодным соотношением N/C, поскольку снижается потребность в азотном питании. Это мы и обнаруживаем при анализе изолятов микроорганизмов, полученных из клубеньков, собранных в

середине вегетации, где наблюдается наименьшая гетерогенность бактерий. Далее, в конце вегетации у растений начинают образовываться клубеньки, задача которых не столько в фиксации азота, о

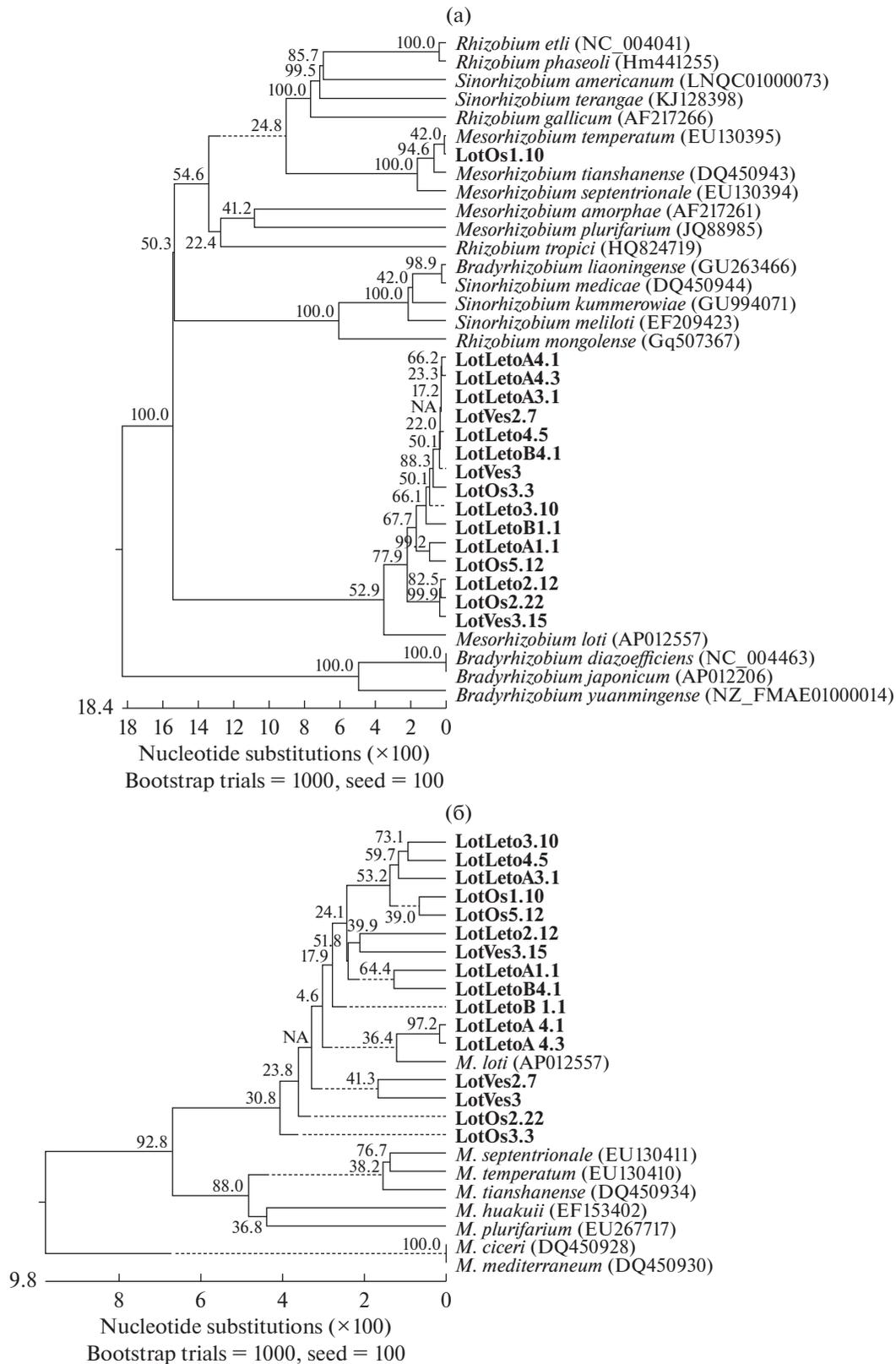


Рис. 3. Филогенетические деревья клубеньковых бактерий, построенные на основании сравнительного анализа последовательностей генов: *nodC* (а) и *nifH* (б). Жирным шрифтом отмечены штаммы микроорганизмов, исследованные в данной работе.

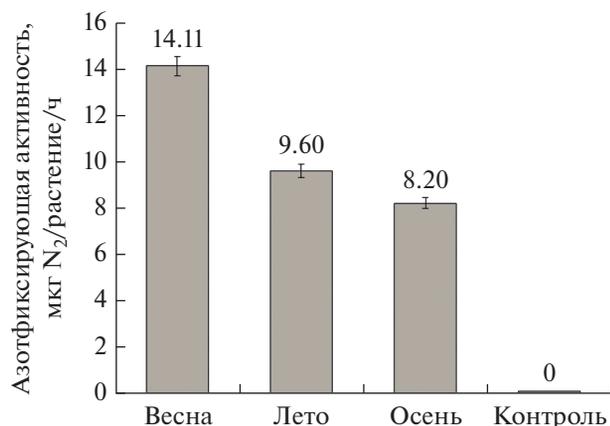


Рис. 4. Азотфиксирующая активность штаммов ризобий, полученных из клубеньков, собранных на разных стадиях вегетации растений. Показаны средние значения в пересчете на одно инокулированное растение. Контроль – растение без обработки.

чем свидетельствуют данные снижения азотфиксирующей активности этих бактерий, сколько в амплификации микроорганизмов в ризосфере, несущих пригодный для данного растения набор симбиотических генов, которые в следующий сезон в начале вегетации могут оказаться их донорами при формировании новых штаммов. Таким образом, цикл может повторяться из раза в раз. Кроме того, на этой стадии развития растения редуцируются трофические связи между ним и клубеньком, что, вероятно, сильно сказывается на контроле со стороны макросимбионта состава бактерий в клубеньках. Как нами было обнаружено, это выражается в присутствии в клубеньках микроорганизмов, не относящихся к ризобиям,

например, *Pseudomonas* sp., а также бактерий *Mesorhizobium* sp. (штамм LotOs1.10), содержащих ген *nodC*, характерный для *M. temperatum*, тогда как остальные микроорганизмы имели аналогичный ген, свойственный для бактерий *M. loti*, которые являются типичными микросимбионтами для данного вида растения. Упомянутый выше штамм представляет собой уникальное образование, содержащее химерный набор *sym*-генов. В данном случае этот пример является ярким показателем участия комбинаторных механизмов в формировании набора симбиотических генов у клубеньковых бактерий путем рекомбинационных процессов вследствие активной вовлеченности *sym*-генов в горизонтальный перенос. И обнаружение подобных штаммов более вероятно с нашей точки зрения именно в клубеньках на поздней стадии вегетации растения, поскольку на начальных этапах строгий контроль направлен на отбор эффективных вариантов бактерий (рис. 5).

На самом деле формирование штаммов – процесс постоянный, и перед растением всегда стоит выбор, каким бактериям отдавать предпочтение. Достаточно много доказательств того, что для растения наиболее важным является наличие у бактерии подходящего набора симбиотических генов, нежели ее видовая принадлежность (Carelli et al., 2000; Andronov et al., 2003). Еще одним подтверждением этого могут служить полученные нами данные, где было обнаружено, что с лядвенцем рогатого вступают в симбиоз, наряду с *Mesorhizobium loti* (обычный симбионт данного растения), также микроорганизмы предположительно другого вида, но имеющие симбиотические гены бактерий *Mesorhizobium loti*. Очевидно, что в данном случае при выборе микросимбионтов растение

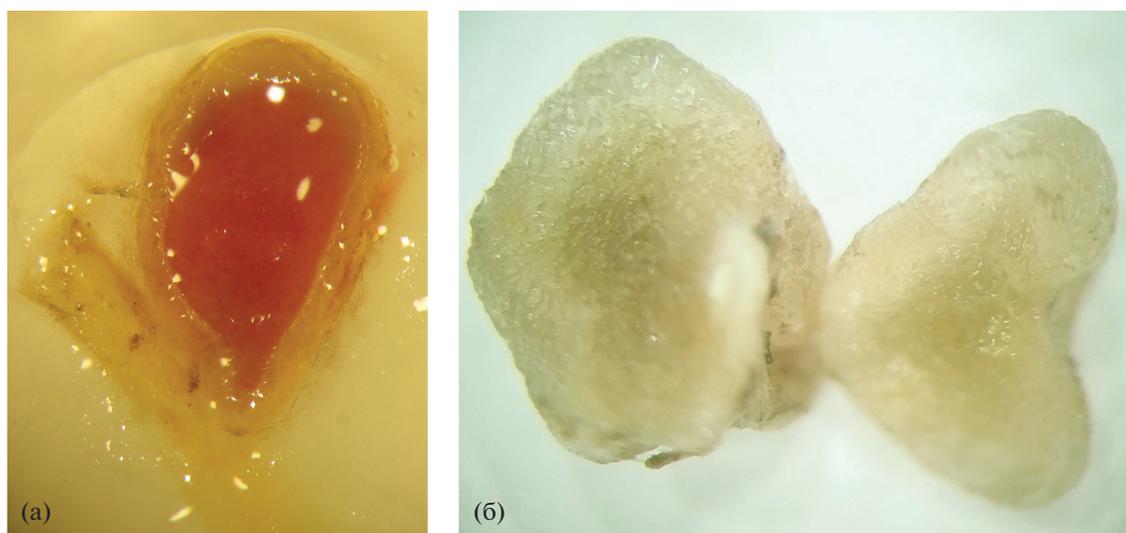


Рис. 5. Клубеньки лядвенца рогатого в начале (а) и в конце вегетации, образованные на стадии закладки почек на зиму (б) в разрезе.

отбирает микроорганизмы с нужными симбиотическими генами, независимо от того, в какой бактерии они присутствуют и, вероятно, имеют возможность функционировать.

В заключение можно отметить, что участие растения в выборе своих микросимбионтов очевидно, и, поскольку это происходит постоянно в ходе всего вегетационного периода, когда растение претерпевает значительные физиолого-морфологические изменения, это непременно сказывается на специфичности образования симбиоза. В начале вегетации есть потребность в активном минеральном питании, и в этот период клубеньки образуются более активными с точки зрения азотфиксации штаммами. В середине жизненного цикла растению необходимо поддерживать баланс между минеральным питанием и обеспечением клубеньков питательными веществами. В конце же вегетации бобовые подготавливают на следующий сезон своих микросимбионтов путем амплификации их в клубеньках, которые при разрушении будут выделять в ризосферу потенциальных микросимбионтов и доноров симбиотических генов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-24-00207.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Баймиев Ан.Х., Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Чубукова О.В., Баймиев Ал.Х. Анализ симбиотических генов клубеньковых бактерий бобовых растений Южного Урала // Генетика. 2015. Т. 51. С. 1359–1367.

Baymiev An.K., Ivanova E.S., Gumenko R.S., Chubukova O.V., Baymiev Al.K. Analysis of symbiotic genes of leguminous root nodule bacteria grown in the Southern Urals // Russ. J. Genet. 2015. V. 51. P. 1172–1180.

Баймиев Ан.Х., Птицын К.Г., Баймиев Ал.Х. Влияние интродукции караганы древовидной на состав ее клу-

беньковых бактерий // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 123–128.

Baymiev An.K., Ptitsyn K.G., Baimiev Al.K. Influence of the introduction of *Caragana arborescens* on the composition of its root nodule bacteria // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 115–120.

Проворов Н.А. Эволюция генетических систем симбиоза у клубеньковых бактерий // Генетика. 1996. Т. 32. С. 1029–1040.

Provorov N.A. Evolution of symbiotic genetic systems in rhizobia // Russ. J. Genet. 1996. V. 32. P. 891–900.

Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1573–1587.

Provorov N.A., Vorob'ev N.I. Evolutionary genetics of nodule bacteria: molecular and population aspects // Russ. J. Genet. 2000. V. 36. P. 1323–1335.

Проворов Н.А., Воробьев Н.И., Андронов Е.Е. Макро- и микроэволюция бактерий в системах симбиоза // Генетика. 2008. Т. 44. С. 6–20.

Provorov N.A., Vorobyov N.I., Andronov E.E. Macro- and microevolution of bacteria in symbiotic systems // Russ. J. Genet. 2008. V. 44. P. 6–20.

Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Роль горизонтального переноса генов в эволюции клубеньковых бактерий, направляемой растением-хозяином // Успехи современной биологии. 2010. Т. 130. № 4. С. 336–345.

Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: МГУ, 1989. 136 с.

Andam C.P., Mondo S.J., Parker M.A. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 4684–4690.

Andrade D.S., Murphy P.J., Giller K.E. The diversity of Phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 4025–4034.

Andronov E.E., Terefework Z., Roumiantseva M.L., Dzyubenko N.I., Onichtchouk O.P., Kurchak O.N., Dresler-Nurmi A., Young J.P.W., Simarov B.V., Lindstöm K. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene centre in the Caucasus // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 1067–1074.

Bailly X., Olivieri I., Brunel B., Cleyet-Marel J.C., Béna G. Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 5223–5236.

Barcellos F.G., Menna P., Batista J.S., Hungria M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 2635–2643.

Carelli M., Gnocchi S., Fancelli S., Mengoni A., Paffetti D., Scotti C., Bazzicalupo M. Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 4785–4789.

Estrella M.J., Munoz S., Soto M.J., Ruiz O., Sanjuán J. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus te-*

- nis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina) // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 1088–1098.
- Fischer H.M.* Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia // *Microbiol. Rev.* 1994. V. 58. P. 352–386.
- Franche C., Lindström K., Elmerich C.* Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants // *Plant Soil.* 2009. V. 321. P. 35–59.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X.* Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes // *Nature.* 1997. V. 387. P. 394–401.
- Laguette G., Mavingui P., Allard M., Charnay M., Louvrier P., Mazurier S., Rigottier-Gois N., Amarger N.* Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars // *J. Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. P. 2029–2036.
- Ling J., Wang H., Wu P., Li T., Tang Y., Naseer N., Zheng H., Masson-Boivin C., Zhong Z., Zhu J.* Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 13875–13880.
- Marchetti M., Capela D., Glew M., Cruveiller S., Chane-Woon-Ming B., Gris C., Timmers T., Poinot V., Gilbert L.B., Heeb P., Medigue C., Batut J., Masson-Boivin C.* Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. P. e1000280.
- Nandasena K.G., O'Hara G.W., Tiwari R.P., Howieson J.G.* Rapid *in situ* evolution of nodulating strains for *Biserrula peltocina* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 7365–7367.
- Ohyama T., Sueyoshi K.* Nitrogen Assimilation in Plants. Research Singpot, Kerala, 2010. 378 p.
- Provorov N.A., Vorobyov N.I.* Evolution of symbiotic bacteria in “plant-soil” systems: interplay of molecular and population mechanisms // *Progress in Environmental Microbiology* / Ed. Kim M.-B. N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2008. P. 11–67.
- Śliwka J., Sobkowiak S., Lebecka R., Avendaño-Córcoles J., Zimnoch-Guzowska E.* Mating type, virulence, aggressiveness and metalaxyl resistance of isolates of *Phytophthora infestans* in Poland // *Potato Research.* 2006. V. 49. P. 155–166.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 697–703.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6531–6535.
- Zaneveld J.R., Nemergut D.R., Knight R.* Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns // *Microbiology (SGM).* 2008. V. 154. P. 1–15.
- Zhao C.T., Wang E.T., Chen W.F., Chen W.X.* Diverse genomic species and evidences of symbiotic gene lateral transfer detected among the rhizobia associated with *Astragalus* species grown in the temperate regions of China // *FEMS Microb. Lett.* 2008. V. 286. P. 263–273.

The Composition of *Lotus corniculatus* Root Nodule Bacteria Depending on the Host Plant Vegetation Stage

An. Kh. Baymiev¹*, E. S. Akimova¹, I. S. Koryakov¹, A. A. Vladimirova¹, and Al. Kh. Baymiev¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

*e-mail: baymiev@anrb.ru

Received March 17, 2022; revised April 11, 2022; accepted April 17, 2022

Abstract—The legume-*Rhizobium* symbiosis is a unique natural phenomenon responsible for providing a legume plant with mineral nitrogen fixed from the atmosphere. In the temperate climatic zone, due to seasonal cycles, plants have to form new interactions with rhizobia at the beginning of each round of vegetation with the formation of specialized structures on the roots, called root nodules, where molecular nitrogen is actually fixed. Nitrogen requirements of the host vary depending on the period of plant growth and development, which may affect its trophic relationships with the microsymbionts. In the present work, using the perennial leguminous plant *Lotus corniculatus* L. as an example, we assessed the influence of the macrosymbiont vegetation stage on the composition of its root nodule bacteria and carried out the characterization of these microbial communities. The highest microbial genetic diversity was found in the communities developing at the beginning of *L. corniculatus* vegetation. At the medium stage of plant development, the diversity decreased, while by the end of vegetation it increased again. Analysis of the nitrogen-fixing activity revealed the highest values for microbial strains isolated from the root nodules collected at the early stages of the macrosymbiont development, while it was lower in the strains isolated at the end of vegetation. At different stages of their development legumes may probably use different strategies for selection of microsymbionts.

Keywords: root nodule bacteria, *Lotus corniculatus*, symbiotic genes of rhizobia, stages of plant vegetation

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИБИНАРНЫЕ БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 209P
И *KYTOCOCCUS SCHROETERI* H01: ДУАЛИСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ
КИТОКОККОВ И ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ
В ПРИСУТСТВИИ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА А-ТИПА¹

© 2022 г. Е. В. Дювенжи^а, Е. Д. Неволина^а, С. В. Мартьянов^а,
М. В. Журина^а, О. В. Калмантаева^б, М. А. Макарова^а, Е. А. Бочкова^а,
В. В. Фирстова^б, В. К. Плакунов^а, А. В. Ганнесен^{а, *}

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^б“Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии”
Роспотребнадзора, Оболенск, Московская обл., 142279 Россия

*e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

Поступила в редакцию 06.04.2022 г.

После доработки 19.04.2022 г.

Принята к публикации 19.04.2022 г.

В ходе изучения взаимоотношений между *Staphylococcus aureus* 209P и *Kytococcus schroeteri* H01 в составе бинарных биопленок было показано, что эти бактерии чувствительны к натрийуретическому пептиду А-типа (НУП-А) в концентрации 6.5×10^{-10} М. Способность клеток этих бактерий к коагрегации и агрегации к поверхности также изменялись в присутствии гормона, при этом основные изменения затрагивали начальную стадию адгезии при формировании биопленки. Изменения в процессе агрегации клеток обеих бактерий косвенно подтвердились с помощью метода микробной адгезии к растворителям (MATS), который выявил снижение сродства клеток к гексадекану – гидрофобному растворителю. Рассев на КОЕ бинарных сообществ показал доминирование КОЕ стафилококков, а клетки *K. schroeteri* составляли минорную часть биомассы. Однако их присутствие влияло на агрегацию и действие, оказываемое НУП-А на микробное сообщество. *K. schroeteri* играл в сообществе дуалистическую роль, с одной стороны, улучшая адгезию стафилококков, а с другой – являясь их антагонистом в биопленке. Кроме того, *K. schroeteri* обеспечивал изменение в характере действия НУП-А на *S. aureus* с нейтрального/стимулирующего на ингибирующий в бинарных сообществах.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, *Kytococcus schroeteri*, бинарные биопленки, микробные сообщества, микробиота кожи, предсердный натрийуретический пептид, гормоны человека, MATS

DOI: 10.31857/S0026365622100251

Микробиота кожи – сложное сообщество микроорганизмов, включающее в себя сотни родов и видов, тесно взаимосвязанных друг с другом и с организмом хозяина (Grice et al., 2009). Несмотря на значительные успехи в изучении микробиоты человека, достигнутые в последние десятилетия, практически ничего не известно о том, каким образом микроорганизмы взаимодействуют друг с другом в сообществе. Также очень мало сведений о регуляторной роли различных соединений в отношении сообществ микроорганизмов.

Грамположительные кокки *Staphylococcus aureus* и *Kytococcus schroeteri* являются компонентами микробиоты кожи человека. *S. aureus* – это один из наиболее изучаемых видов микроорганизмов, поскольку он является условным патогеном, способным вызывать различные заболевания, от относительно легких кожных инфекций, таких как акне, фурункулез, флегмона, фолликулит, до тяжелых болезней, таких как пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардит, инфекционно-токсический шок и сепсис (Tong et al., 2015; Parlet et al., 2019). При этом, у высокого процента населения золотистый стафилококк присутствует в качестве компонента микробиоты, не вызывая при этом заболеваний (Balasubramanian et al., 2017). *K. schroeteri* – это слабо изученный компонент комменсальной микробиоты

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622100251 для авторизованных пользователей.

кожи. Ранее данный микроорганизм относили к микрококкам, однако по результатам молекулярно-генетических и биохимических исследований китокотки были выделены в отдельное семейство (Becker et al., 2002). Несмотря на малоизученность и относительную безопасность данного микроорганизма, имеется достаточное количество сообщений об инфекциях, вызываемых *K. schroeteri*, в частности, о клинических случаях эндокардита в результате имплантации протеза клапана или шунтирования в сердце (Aerpinus et al., 2008; Youstri et al., 2010; Schaumburg et al., 2013).

Оба вида бактерий способны к формированию биопленок в определенных микронишах на коже, таких как полости желез, поверхности слизистых. Биопленки представляют собой микробные сообщества, погруженные во внеклеточный полимерный матрикс, обеспечивающий находящимся в нем клеткам защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды. Биопленки являются основной формой существования микроорганизмов в природе, в том числе и на коже человека (Ramasamy et al., 2019). Это особенно характерно для сообщества микробиоты кожи, где физико-химические условия просто не позволяют бактериям расти в планктонной форме.

Исследования последних лет показывают, что микробиота кожи играет важную роль в функционировании кожи, иммунной системы человека, тесно связана с системами гуморальной регуляции (Blennow et al., 2011). Недавно было показано, что гормоны, как компоненты систем гуморальной регуляции человека, способны оказывать влияние на микробиоту кожи. Это влияние может быть результатом длительной коэволюции тела человека и его микробных комменсалов (Lyte et al., 2004). Натрийуретические пептиды (НУП) представляют собой класс гормонов, регулирующих многие физиологические процессы в организме человека (обмен кальция, тонус сосудов и пр.; Potter et al., 2009). В последнее время появляется все больше данных о воздействии НУП и на некоторых представителей микробиоты человека (Gannesen et al., 2018a; Louis et al., 2022). Кроме того, как и в случае катехоламинов (Reading et al., 2006), микроорганизмы потенциально могут иметь собственные рецепторные комплексы, взаимодействующие с НУП (Rosay et al., 2015).

В настоящее время актуален поиск соединений, способных оказывать влияние на микроорганизмы без прямого антибактериального воздействия, а значит, не вызывающих развития резистентности. К примеру, в косметологии растет интерес к поиску новых соединений, которые можно было бы включить в состав косметических продуктов и способных поддерживать микробный баланс кожи человека. Такие соединения могут быть использованы в будущем в качестве компонентов новых

антимикробных и антибиопленочных препаратов. В связи с этим, НУП привлекают особое внимание в качестве влияющих на развитие бактерий соединений. На сегодняшний день известны следующие НУП: предсердный натрийуретический пептид (пептид А-типа, НУП-А), натрийуретический пептид типа В, или мозговой (НУП-В), типа С (НУП-С), типа D (НУП-D), а также уродилатин.

Согласно уже опубликованным данным, НУП оказывают действие на рост, вирулентность некоторых бактерий и формирование биопленок (Veron et al., 2007; Rosay et al., 2015; Gannesen et al., 2018a; Bagelman, Zvigule-Neidere, 2021; Louis et al., 2022). Ряд исследований демонстрирует, что НУП оказывают наибольшее действие, главным образом, на биопленки, в меньшей степени — на планктонные культуры, что можно объяснить тем, что внутри организма человека и на его поверхности микроорганизмы существуют, в основном, в виде мультивидовых биопленок (Ramasamy et al., 2019). Было показано ингибирующее действие НУП-А и НУП-С на моновидовые биопленки *S. acnes* и *S. aureus*. Однако клетки *S. acnes* росли лучше в бинарной биопленке в присутствии обоих гормонов. На основании этого можно заключить, что НУП повышают конкурентные свойства *S. acnes* в отношении стафилококка (Gannesen et al., 2018a). По данным еще одного недавнего исследования, НУП-А предотвращает формирование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* и значительно ускоряет дисперсию уже сформированных. Было также показано, что НУП-А усиливает антибиопленочное действие антибиотиков с разным механизмом действия, вызывая почти полную дисперсию биопленок (Louis et al., 2022). В другой работе был продемонстрирован эффект, оказываемый НУП-А и НУП-С на биопленки *S. aureus* и *S. epidermidis* (Ганнесен и соавт., 2018; Gannesen et al., 2018b). Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие НУП зависит от условий культивирования. При температуре 37°C рост моновидовых биопленок *S. epidermidis* и *S. aureus*, соответственно, стимулировался и ингибировался. При температуре 33°C эффект на оба микроорганизма менялся на противоположный: НУП ингибировали рост моновидовых биопленок у *S. epidermidis* и стимулировали у *S. aureus* (Ганнесен и соавт., 2018; Gannesen et al., 2018b). Еще одно исследование показало эффект НУП-А на моновидовые и бинарные биопленки *S. acnes* и *S. epidermidis*. Показано, что НУП-А стимулирует агрегацию *S. acnes* и метаболическую активность клеток *S. epidermidis*. Также, НУП-А снижает скорость роста *S. epidermidis* и стимулирует рост биопленок *S. acnes* (Ovcharova et al., 2021).

Итак, НУП-А представляет значительный интерес как регуляторное соединение, которое может воздействовать на различные микробные сообще-

ства, в особенности на сообщества, содержащие представителей аэробных актинобактерий, эффект данных соединений на которые практически не изучен. Этот интерес также основан на потенциальной возможности использования НУП в качестве регулятора или ингибитора микробных биопленок в качестве компонента комплексных антимикробных препаратов (Louis et al., 2022). Кроме того, малое количество данных о взаимодействии микроорганизмов друг с другом в сообществах, и, в частности, отсутствие таких данных о *S. aureus* и *K. schroeteri* – потенциальных болезнетворных агентах, делает такие исследования актуальными и востребованными.

Целью данной работы было изучение действия НУП-А на моновидовые и бинарные биопленки *K. schroeteri* и *S. aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Штаммы и культивирование. В работе были использованы штаммы *S. aureus* 209P и *K. schroeteri* H01. Штамм *K. schroeteri* H01 был выделен с кожи человека, охарактеризован и протипирован ранее (Журина и соавт., 2017; Boukerb et al., 2019). Культуры хранили в пробирках с 5 мл полужидкой среды LB (“Диа-М”, Россия), с добавлением 0.4% агара (“Диа-М”, Россия), под слоем стерильного минерального масла. Для экспериментальной работы образцы биомассы выращивали на обогащенной клостридиальной среде (RCM) с 1.5% агара при 33.5°C до образования колоний, как описано ранее (Данилова и соавт., 2021). Среда RCM была выбрана как наиболее подходящая для выращивания изучаемых микроорганизмов (Mart’yanov et al., 2021). Состав среды RCM, г/л: дрожжевой экстракт – 13, пептон – 10, глюкоза – 5, NaCl – 5, ацетат натрия – 3, крахмал – 1, гидрохлорид цистеина – 0.5; pH 6.8–7.0. Для получения посевного материала биомассу колонии помещали в 50-миллилитровую коническую пробирку с 15 мл среды LB и инкубировали в течение 24 ч при 33.5°C и 150 об./мин.

Натрийуретический пептид. В работе использовали НУП-А (“Alfa-Aesar”, США) с молекулярным весом 3080.47 г/моль. Для приготовления стокового раствора пептида 1 мг гормона растворяли в 1 мл стерильной MilliQ (MQ) воды до достижения концентрации 1.623×10^{-4} М, раствор хранили при –20°C, как описано ранее (Ovcharova et al., 2021). Затем готовили серию десятикратных разведений в стерильной воде MQ для использования в работе. Физиологическая концентрация в плазме крови 6.5×10^{-12} М была выбрана в качестве основной в данной работе (Stepniakowski et al., 1992; Yoshimura et al., 1994).

Рост моновидовых биопленок на тефлоновых кубиках. Эксперименты проводили по методике,

описанной ранее (Данилова и соавт., 2020, 2021). После стерилизации пробирок со средой и кубиками в пробирки вносили необходимое количество гормона для достижения физиологической концентрации 6.5×10^{-12} М (Ф), а также 6.5×10^{-11} М (10Ф), 6.5×10^{-10} М (100Ф) и 6.5×10^{-9} М (1000Ф) и по 50 мкл заранее подготовленной клеточной суспензии из посевного материала, имеющей оптическую плотность (ОП) 0.5 при 540 нм. После этого все пробирки, включая положительные и холостые контроли, инкубировали в течение 24 или 72 ч при 33°C и 150 об./мин для получения формирующихся и зрелых биопленок соответственно. Температура 33°C соответствует температуре участков кожи, на которых обитают данные виды микроорганизмов (Agiyaratnam, Rood, 1990). По завершении инкубации измеряли оптическую плотность планктонных культур и экстрактов КФ из биопленок.

Рост биопленок на стекловолоконных фильтрах.

В работе со стекловолоконными фильтрами исследовали биопленки в двух модельных системах, различающихся по полноте стадии первичной адгезии (Kiseleva et al., 2022). В первой модельной системе биопленки получали на фильтрах (“Whatman”, Великобритания) класса GF/F диаметром 21 мм, помещенных на поверхность агаризованной среды RCM на чашках Петри. Следовательно, стадия первичной клеточной адгезии в данной системе редуцирована. В основе второй модельной системы лежал рост биопленок в пробирках с фильтрами, погруженными в жидкую среду RCM. Инокулят засеивали в жидкую среду, таким образом, биопленки формировались из планктонной культуры, и стадия начальной адгезии не была редуцирована.

Бактериальные суспензии доводили до $ОП_{540} = 0.5$ и 1 стерильным физиологическим раствором (0.9% NaCl в дистиллированной воде). Культуры с $ОП = 0.5$ использовали для изучения моновидовых биопленок, а культуры с $ОП = 1$ смешивали в равных пропорциях для получения бинарных сообществ. В первой модельной системе стерильные фильтры помещали на агаризованную среду RCM (20 мл) на чашки Петри с добавлением необходимого количества НУП-А (контроль – без добавления). Затем 20 мкл бактериальной суспензии помещали в центр каждого фильтра. Чашки инкубировали в течение 24 ч (формирующиеся биопленки) и 72 ч (зрелые биопленки) при 33°C, что соответствует температуре участков кожи, на которых обитают данные виды микроорганизмов.

Во второй модельной системе 6 мл жидкой среды RCM добавляли в толстостенные широкогорлые пробирки и помещали внутрь фильтры вертикально таким образом, чтобы они находились на одном уровне, были полностью покрыты средой и не соприкасались друг с другом. Затем в пробирку

вносили необходимое количество НУП-А и 100 мкл бактериальной суспензии (контроль – без добавления). Моновидовые и бинарные био пленки выращивали в течение 24 и 72 ч при 33°C. По истечении инкубации один фильтр с биомассой био пленки использовали для определения метаболической активности ее клеток, а другой фильтр использовали для определения количества КОЕ и оценки клеточной агрегации, как было описано ранее (Kiseleva et al., 2022).

Оценка метаболической активности. Для оценки метаболической активности клеток применяли методику окраски био пленок на фильтрах с помощью 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2-тетразолия бромида (МТТ), как было описано ранее (Плакунов и соавт., 2016; Ovcharova et al., 2021; Kiseleva et al., 2022). Фильтры с биомассой био пленок окрашивали в течение 30 мин 3 мл раствора 0.1% МТТ в стерильной среде LB при комнатной температуре. Затем фильтры отмывали дистиллированной водой для удаления остатков красителя. Экстракцию формазана проводили в 3 мл диметилсульфоксида (ДМСО) на каждый фильтр. ОП раствора измеряли при $\lambda = 540$ нм.

Оценка количества КОЕ в био пленках. Фильтры с биомассой помещали в пробирки с 10 мл стерильного физраствора, перемешивали стеклянной палочкой и встряхивали в течение 1 мин для создания гомогенной суспензии, как описано ранее (Ovcharova et al., 2021; Kiseleva et al., 2022). Затем готовили серию разведений полученной суспензии и помещали их на чашки Петри с агаризованной средой RCM. Чашки инкубировали в течение 48 ч при 33°C, после чего подсчитывали число колоний и количество КОЕ в био пленке на фильтре.

Оценка агрегации клеток. Агрегацию клеток в био пленках оценивали микроскопическим методом, как описано ранее (Ovcharova et al., 2021; Kiseleva et al., 2022). Суспензию фильтров с биомассой, полученную в опытах с КОЕ, наносили на предметное стекло, фиксировали и окрашивали КФ. Анализ агрегации клеток проводили с помощью светового микроскопа Jena (“Zeiss”, Германия) при увеличении объектива 90×. Анализировали размер агрегатов в клетках и соотношение одиночных клеток и агрегатов. Таким образом, предполагали, сколько КОЕ потенциально произрастало из одиночных клеток или из клеточных агрегатов. Для каждого образца проводили визуальный контроль максимально возможного числа полей зрения, после чего делали не менее 5 фотографий наиболее репрезентативных участков препарата, на которых вели подсчеты.

Изучение свойств клеточной поверхности *K. schroeteri* и *S. aureus*. Для изучения потенциальных изменений в свойствах клеточной поверхности в присутствии НУП-А был использован метод мик-

робной адгезии к растворителям (microbial adhesion to solvents, MATS; Bellon-Fontaine et al., 1996). Планктонные культуры выращивали в 25 мл жидкой среды RCM с добавлением или без добавления НУП-А в 250-миллилитровых конических колбах, в которые вносили по 417 мкл инокулята с ОП₅₄₀ = 0.5 на колбу. Моновидовые бактериальные культуры инкубировали при 33°C и 150 об./мин в течение 24 ч. Затем суспензии дважды отмывали физраствором и разбавляли до ОП₄₀₀ 0.8. В экспериментах 2.6 мл суспензии переносили в химически чистые стеклянные пробирки с резиновыми пробками. Для определения преобладающих кислотно-основных взаимодействий неполярные растворители с одинаковыми ван-дер-ваальсовыми свойствами поверхности использовали в паре с полярными (хлороформ–гексадекан и этилацетат–декан). В пробирки вносили по 0.4 мл полярного акцептора электронов по Льюису (хлороформ) или донора электронов (этилацетат). В другие пробирки, соответственно, вносили гексадекан и декан. Использовали растворители производства “Merck” (Германия). Пробирки закрывали и аккуратно встряхивали на шейкере в течение 1 мин. Затем, после разделения фаз, измеряли ОП₄₀₀ водной фазы. Сродство к растворителю определяли, используя формулу $(1 - A/A_0) \times 100$, где А – ОП₄₀₀ водной фазы после встряхивания, А₀ – ОП₄₀₀ суспензии перед встряхиванием. Эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях.

Конфокальная микроскопия и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Метод FISH использовали для детекции *S. aureus* 209P в бинарном сообществе. Перед экспериментами определяли вероятность ложноположительной гибридизации. Для *S. aureus* использовали зонд 5'-GAA-GCA-AGC-TTC-TCG-TCC-G-3' (“Синтол”, Россия), меченный родамином R6G (Lawson et al., 2011).

Моновидовые и бинарные био пленки выращивали в 24-луночных планшетах со стеклянным дном, как описано ранее (Данилова и соавт., 2021). В лунки планшетов вносили по 1 мл среды с добавлением гормона или без, после чего вносили суспензию и культивировали при 33°C и 150 об./мин в течение 24 или 72 ч. Выросшие био пленки фиксировали 1 мл 96% этанола в течение 20 мин. Затем этанол удаляли, био пленки, содержащие стафилококк, гибридизовали зондом по методике, описанной ранее (Ovcharova et al., 2021), с изменениями в составе гибридизационного буфера, необходимыми для использованного зонда (Lawson et al., 2011). После конечного отмывания все образцы дополнительно красили универсальным красителем SYTO9 Green (“Thermo”, США) в течение 15 мин, как описано ранее (Kiseleva et al., 2022). Отмытые от красителя образцы высушивали и покрывали фиксирующей смолой Prolong Gold antifade mountant (“Thermo Fisher”, США)

для защиты от быстрой потери свечения. Планшеты оборачивали алюминиевой фольгой и хранили в темноте при 4°C.

Визуализацию образцов проводили с помощью конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (Япония) с масляной иммерсией при увеличении объектива 60× (объектив UPLXAP060XO 60.0X/1.518 Oil, N/A 1,42, U-DIC60). Для визуализации использовали диодные лазеры 488 и 561 нм для окрашенных SYTO9 и R6G образцов соответственно. Мощность лазеров составляла 10% от максимальной. Анализ образцов слепым методом и получение трехмерных изображений проводили по принципу, описанному ранее (Kiseleva et al., 2022) с интервалом по оси Z 0.36 мкм. Анализ файлов с разрешением .oib осуществляли в программе ImageJ (НИН, США) с использованием плагинов Bio-formats и Comstat2 (Университет Копенгагена, Дания). Сначала файлы .oib конвертировали в формат OME-TIFF без сжатия и сохраняли в одном файле. Затем рассчитывали параметр “занятая поверхность в слоях” для каждого z-стека в каждом файле в Comstat2 с индивидуальным порогом 1 и без фильтрации объема. Для каждого образца проводили максимально возможный визуальный анализ, после чего собирали трехмерные изображения не менее чем пяти наиболее репрезентативных полей зрения.

Статистическая обработка. Все эксперименты проводили не менее чем в трех независимых повторностях. Визуализацию данных проводили с помощью пакета Microsoft EXCEL 2010. Статистическую проверку проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост моновидовых биопленок на тефлоновых кубиках. Вначале для определения общего действия НУП-А на микроорганизмы проанализировали диапазон концентраций НУП-А и их влияние на моновидовые планктонные культуры и биопленки *K. schroeteri* и *S. aureus*. Использовали физиологическую концентрацию 6.5×10^{-12} М в качестве исходной, а также три десятикратно увеличенные концентрации для моделирования различных патологических состояний организма человека. Было показано, что после 72 ч инкубирования НУП-А не оказывал значительного эффекта на рост планктонной культуры и биопленок, как в случае с *K. schroeteri*, так и *S. aureus* (рис. 1). В случае *K. schroeteri*, НУП-А оказывал слабый ингибирующий эффект на планктонную культуру, проявлявшийся при повышении концентрации гормона: при концентрации НУП-А 6.5×10^{-9} М ОП₅₄₀ составляла $84.3 \pm 6.8\%$ от контроля (рис. 1а).

В случае *S. aureus*, физиологическая концентрация усиливала рост биопленок до $122.6 \pm 21.2\%$ от

контроля, но эффект не был статистически значимым (рис. 1б). При повышении концентрации выше физиологической стимуляция не наблюдалась. Также не было обнаружено эффекта на планктонных культурах.

Тем не менее, ранее было показано, что НУП-А оказывает различное действие на биопленки в разных моделях (Ovcharova et al., 2021; Mart'yanov et al., 2021; Gannesen et al., 2021). Так, НУП-А в концентрации 6.5×10^{-10} М оказывал значительный эффект на сообщество *S. epidermidis* и *C. acnes* (Ovcharova et al., 2021). Таким образом, несмотря на первичное отсутствие наблюдаемого эффекта, было решено использовать концентрацию НУП-А 6.5×10^{-10} М для более глубокого изучения вопроса о том, оказывает ли гормон действие на сообщество *S. aureus* и *K. schroeteri* в других системах.

Рост биопленок на стекловолоконных фильтрах. Биопленки выращивали на фильтрах в различных системах, чтобы выявить, влияет ли НУП-А в концентрации 6.5×10^{-10} М (100Ф) на биопленки *S. aureus* и *K. schroeteri*, и имеются ли различия в формировании биопленок при наличии и в отсутствии первичной адгезии соответственно (рис. 2). Сначала в системе с редуцированной начальной адрезией на чашках в контрольных образцах наблюдали увеличение числа КОЕ в контрольных образцах с $8.1 \times 10^8 \pm 2.0 \times 10^8$ (24 ч) до $1.4 \times 10^9 \pm 8.3 \times 10^8$ КОЕ на фильтр (72 ч, рис. 2а). НУП-А оказывал значительный стимулирующий эффект на количество КОЕ после 24 ч инкубации ($2.6 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$ КОЕ на фильтр), однако после 72 ч эффект становился незначительным. Метаболическая активность клеток в моновидовых биопленках *K. schroeteri* не изменялась в зрелых биопленках (72 ч) в присутствии НУП-А. После 24 ч инкубации, при этом, обнаружили значительное увеличение ОП экстрактов формазана в присутствии гормона (от 3.5 ± 0.18 до 5.4 ± 0.9 ; рис. 2б).

Присутствие гормона в среде не оказывало влияния на количество КОЕ в моновидовых биопленках *S. aureus* ни после 24, ни после 72 ч инкубации (рис. 2в). В целом, число КОЕ увеличилось в зрелых биопленках (в контрольных образцах с 1.3×10^9 до 5.2×10^9 КОЕ на фильтр). В присутствии НУП-А после 24 ч инкубации наблюдали некоторое снижение числа КОЕ до $6 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^7$ КОЕ на фильтр. Метаболическая активность в присутствии НУП-А также не менялась значительно ни после 24, ни после 72 ч инкубации по сравнению с контролем (рис. 2г). При этом в целом ОП₅₄₀ экстрактов формазана была ниже, чем в образцах *K. schroeteri* (рис. 2г).

В бинарных биопленках при подсчете КОЕ выявляли только колонии *S. aureus*, что свидетельствовало, во-первых, об их конкурентном

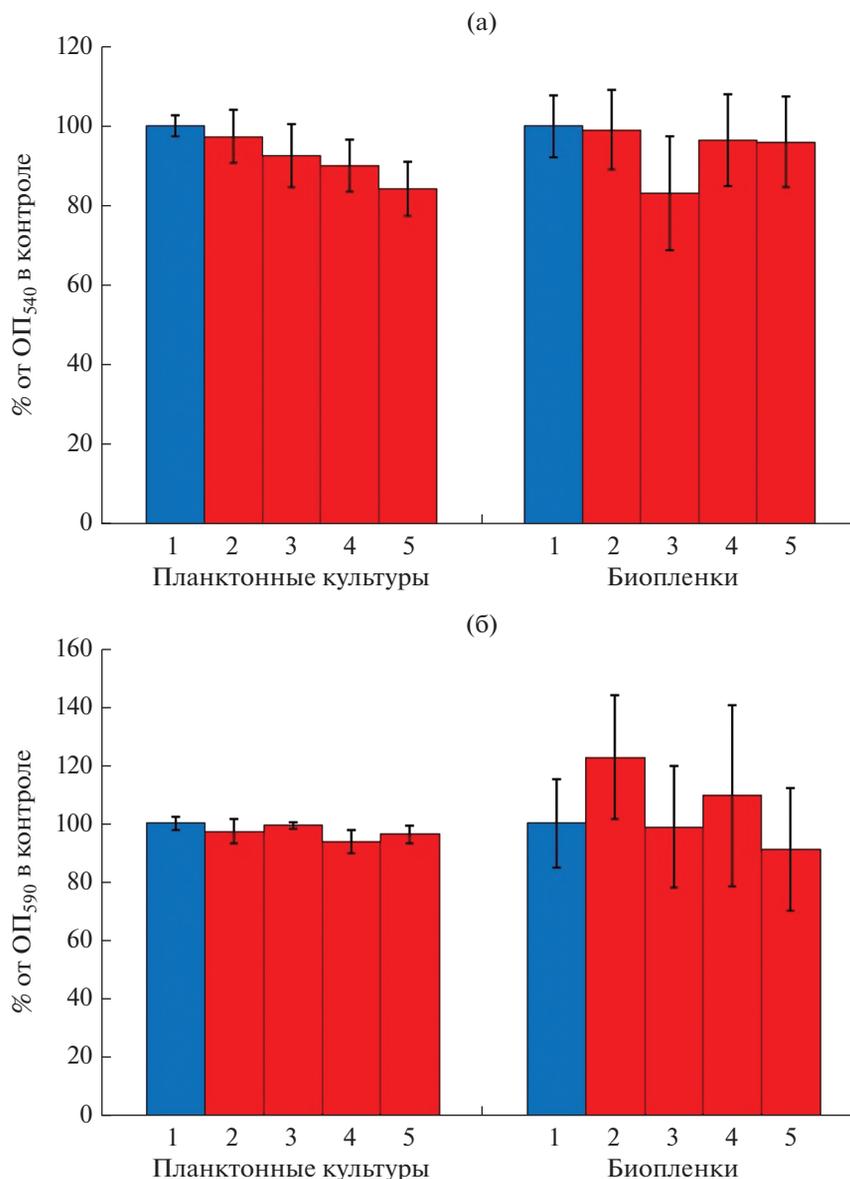


Рис. 1. Действие различных концентраций атриального натрийуретического пептида (НУП-А) на моновидовые планктонные культуры и биопленки *K. schroeteri* и *S. aureus* на тefлоновых кубиках: а – *K. schroeteri* 72 ч; б – *S. aureus* 72 ч. 1 – контроль; 2 – НУП-А 6.5×10^{-12} (Ф); 3 – НУП-А 6.5×10^{-11} (10Ф); 4 – НУП-А 6.5×10^{-10} (100Ф); 5 – НУП-А 6.5×10^{-9} (1000Ф).

преимущество перед *K. schroeteri*. После 24 ч инкубации количество КОЕ под влиянием гормона увеличилось до $1.3 \times 10^9 \pm 3.8 \times 10^8$ КОЕ на фильтр, при контрольном значении $3.6 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^9$ КОЕ на фильтр. После 72 ч эти значения составляли $5.1 \times 10^9 \pm 2.2 \times 10^9$ и $4 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^9$ соответственно (рис. 2д). НУП-А не оказывал значительного эффекта на метаболическую активность бинарных биопленок, однако ОП₅₄₀ была ближе к ее значению у моновидовых биопленок *K. schroeteri* (рис. 2е).

Следовательно, несмотря на видимое отсутствие КОЕ китокочков в бинарных биопленках, изменения в значении ОП₅₄₀ свидетельствует о том, что потенциально китокочки не были полностью подавлены, однако их количество было существенно ниже, что не позволило эффективно выявить их КОЕ.

Во второй модельной системе рост биопленки шел из формирующейся параллельно планктонной культуры и, соответственно, стадия первичной адгезии клеток не редуцировалась. Это сказалось на результатах. Показано, что число КОЕ в

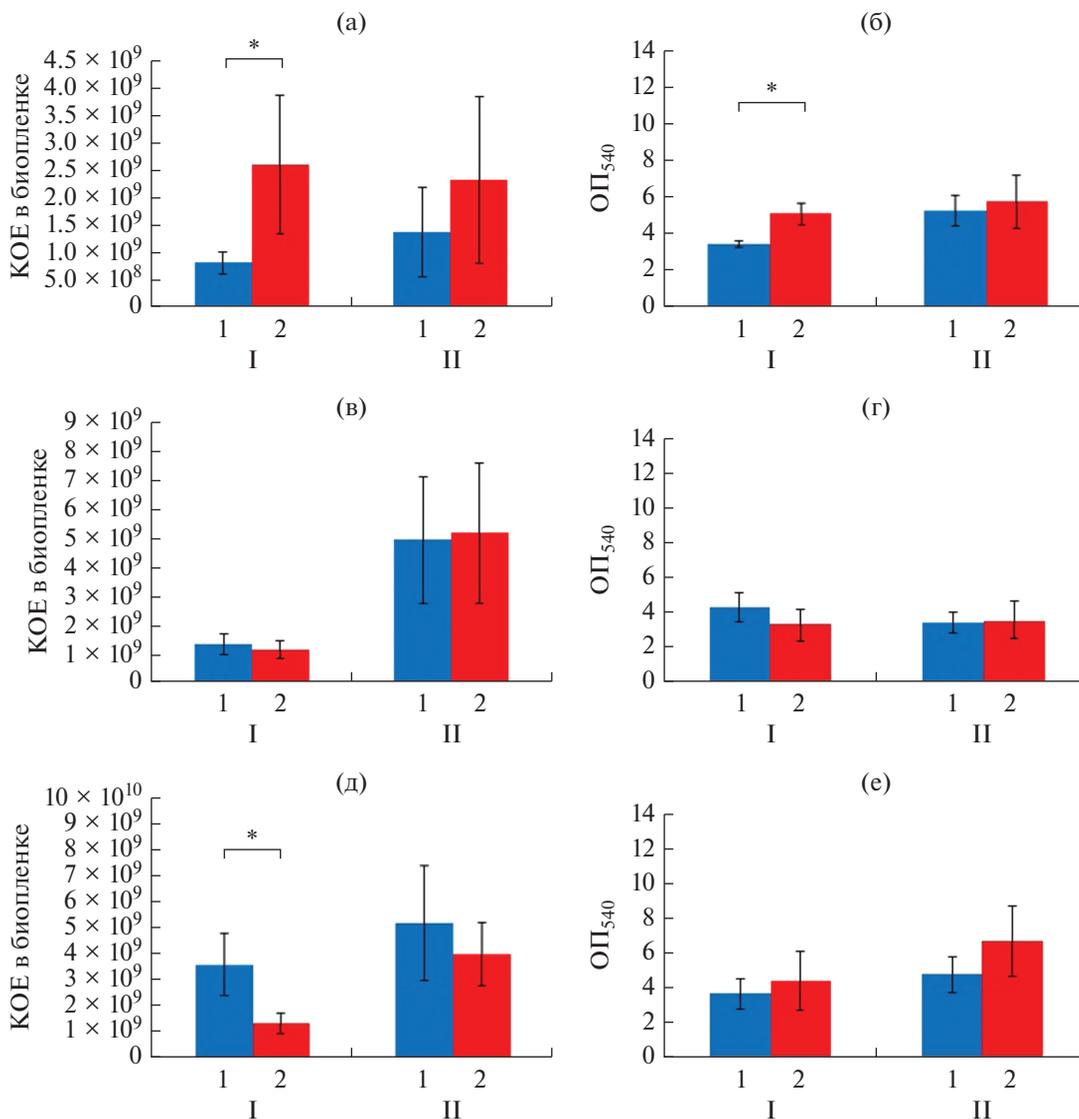


Рис. 2. Действие НУП-А на моновидовые и бинарные биопленки *K. schroeteri* и *S. aureus*, выращенные на агаризованной среде RCM: а – число КОЕ моновидовых биопленок *K. schroeteri*; б – метаболическая активность моновидовых биопленок *K. schroeteri*; в – число КОЕ моновидовых биопленок *S. aureus*; г – метаболическая активность моновидовых биопленок *S. aureus*; д – число КОЕ бинарных биопленок *K. schroeteri* и *S. aureus*; е – метаболическая активность бинарных биопленок *K. schroeteri* и *S. aureus*. I – инкубация 24 ч; II – инкубация 72 ч. 1 – контроль; 2 – НУП-А 6.5×10^{-10} (100Ф). * $p < 0.05$.

моновидовых биопленках *K. schroeteri* значительно увеличивалось после 72 ч инкубации по сравнению с 24 ч в контроле (с $5.2 \times 10^7 \pm 2 \times 10^7$ до $1.2 \times 10^8 \pm 3.3 \times 10^7$ КОЕ на фильтр) (рис. 3а). В присутствии НУП-А после 24 ч инкубации число КОЕ увеличивалось до $1.2 \times 10^8 \pm 6.4 \times 10^7$, а после 72 ч – до $3.0 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^8$ КОЕ на фильтр. Между тем метаболическая активность моновидовых биопленок *K. schroeteri* значительно не менялась, хотя в зрелых биопленках она была более чем вдвое выше, чем в формирующихся. *Kytococcus* растет медленнее, чем *Staphylococcus*, следовательно, присутствие стадии первичной адгезии потенциально

могло увеличить время формирования биопленки, что привело к различию в значениях ОП в биопленках после 24 и 72 ч. Эти различия не наблюдались на чашках Петри (рис. 3б).

В моновидовых биопленках *S. aureus* число КОЕ снижалось после 72 ч инкубации по сравнению с формирующимися биопленками, а в контрольных образцах составляло $1.6 \times 10^8 \pm 3.8 \times 10^7$ и $6.5 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$ КОЕ на фильтр после 24 и 72 ч соответственно, что отличалось от данных для системы с редуцированной стадией адгезии. НУП-А оказывал подавляющий эффект на количество КОЕ в формирующихся биопленках и снижал это

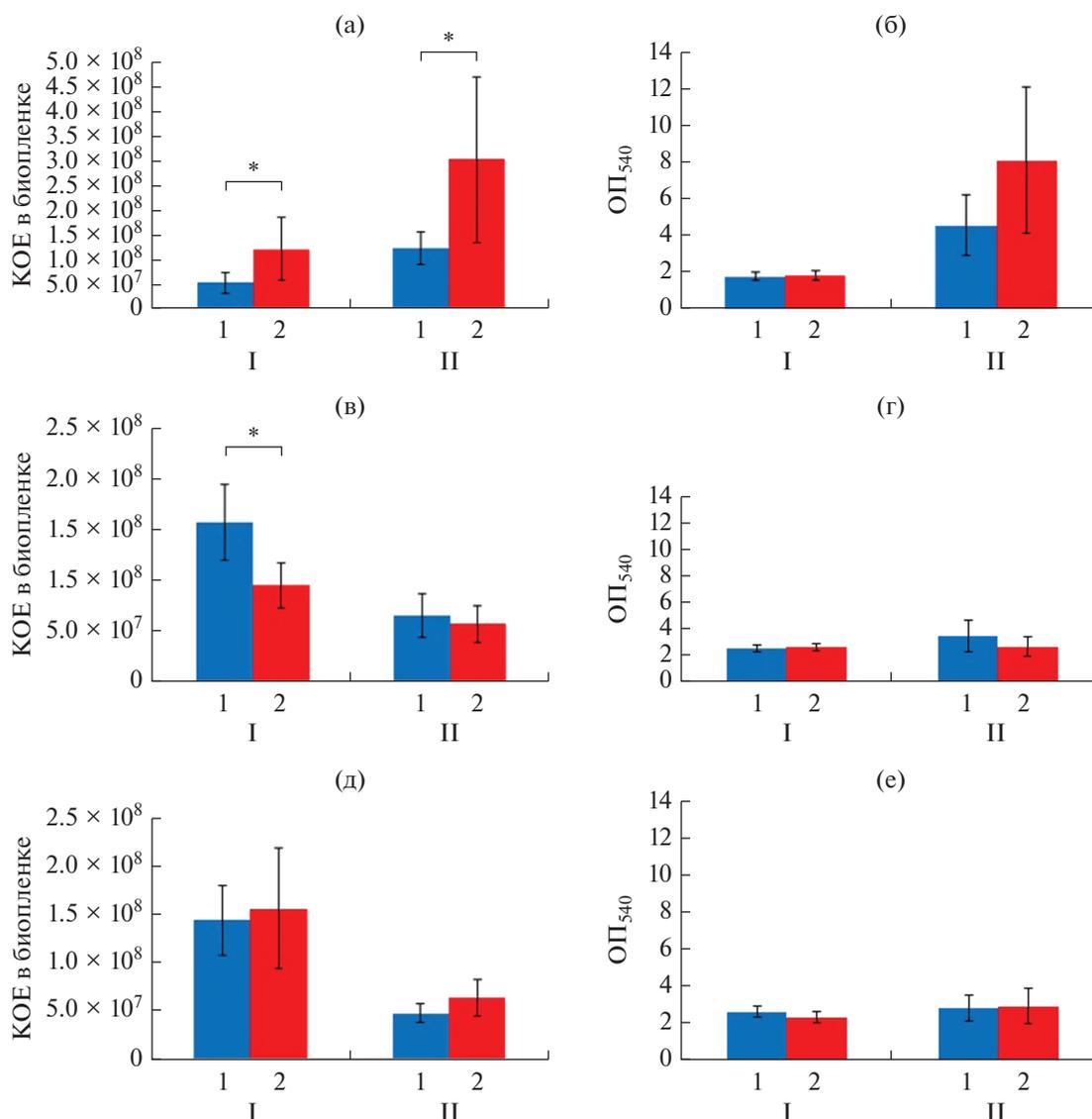


Рис. 3. Действие НУП-А на моновидовые и бинарные биопленки *K. schroeteri* и *S. aureus* выращенные на жидкой среде: а – число КОЕ моновидовых биопленок *K. schroeteri*; б – метаболическая активность моновидовых биопленок *K. schroeteri*; в – число КОЕ моновидовых биопленок *S. aureus*; г – метаболическая активность моновидовых биопленок *S. aureus*; д – число КОЕ в бинарных биопленках; е – метаболическая активность бинарных биопленок. I – инкубация 24 ч; II – инкубация 72 ч. 1 – контроль; 2 – НУП-А 6.5×10^{-10} (100Ф). * $p < 0.05$.

значение после 24 ч до $9.5 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^7$ КОЕ на фильтр (рис. 3в). Метаболическая активность биопленок *S. aureus* значительно не менялась, но в целом она была ниже, чем в первой системе вследствие меньшего количества биомассы (рис. 3г). Следовательно, можно предположить, что в формирующихся 24 ч биопленках клетки менее активны метаболически, или что каждая КОЕ содержит меньше число клеток, что требует подтверждения.

В бинарных биопленках *K. schroeteri* и *S. aureus* с нередуцированной стадией первичной адгезии также наблюдали преимущество в росте *S. aureus*. Количество КОЕ *S. aureus* было на том же уровне, что и в моновидовых биопленках, однако в при-

сутствии *K. schroeteri* ингибирующее действие НУП-А после 24 ч пропадало (рис. 3д). Метаболическая активность клеток в бинарной биопленке была несколько выше, чем в моновидовых биопленках *S. aureus*. Таким образом, можно предполагать, что и в данной системе китокочки не были полностью вытеснены (рис. 3е).

Число КОЕ в исследованиях биопленок может быть не совсем точным параметром. Даже после разрушения биопленки значительное число клеток может оставаться в виде клеточных агрегатов, что может исказить результат подсчета КОЕ. Следовательно, метод подсчета КОЕ следует комбинировать с анализом агрегации. Поэтому для

уточнения результатов подсчета КОЕ использовали анализ агрегации клеток с использованием световой микроскопии. Для этого исследовали агрегацию клеток в моновидовых и бинарных биопленках, подсчитывали число агрегатов отдельных клеток и количество клеток в агрегатах. Вначале проанализировали биопленки на агаризованной среде RCM. *K. schroeteri* продемонстрировал высокую степень агрегации в биопленках (70% и больше), после 24 ч инкубации средний размер агрегата в контрольных образцах был 6.8 ± 0.8 клеток, а после 72 ч он увеличился до 22.6 ± 8.4 клеток в контроле (рис. 4а, 4б, рис. S1, S2). Таким образом, большая часть КОЕ в биопленках китококков была представлена клеточными агрегатами, и можно говорить о том, что длительное культивирование *K. schroeteri* увеличивает число трудноразрушаемых клеточных агрегатов. НУП-А при этом не оказывал значительного влияния на агрегацию. Следовательно, в системе с редуцированной начальной адгезией на чашках Петри НУП-А стимулировал рост *K. schroeteri* в формирующихся 24-часовых биопленках. Это следует из одновременного отсутствия изменений в агрегации и увеличения числа КОЕ. На зрелые биопленки НУП-А не оказывал значимого эффекта, так как параметры были близки к значениям контрольных образцов. Таким образом, вероятно, присутствие гормона увеличивает рост биопленки в начале культивирования и, потенциально, дисперсию биопленки в стационарной фазе.

В случае *S. aureus* наблюдали практически равный вклад отдельных клеток и клеточных агрегатов в подсчет КОЕ. Уровень отдельных клеток в контроле после 24 ч инкубации составлял 43.5% и после 72 ч – 44.8% (рис. 4б). Размер агрегатов был меньше, чем размер агрегатов, образованных *K. schroeteri* (4.9 ± 1.4 после 24 ч и 4.3 ± 1 после 72 ч в контроле; рис. 4г; рис. S1, S2). НУП-А незначительно влиял на уровень агрегации и размер агрегатов у стафилококков (рис. 4в, 4г; рис. S1, S2). Таким образом, в системе с редуцированной адгезией действия гормона на *S. aureus* не наблюдали.

В бинарных биопленках *K. schroeteri* и *S. aureus* соотношение между отдельными клетками и агрегатами в контроле после 24 ч инкубации было близко к равновесному, в то время как после 72 ч равновесие сместилось в сторону агрегатов (68%; рис. 4д). Размер агрегатов также значительно увеличился в контрольных образцах в течение времени созревания биопленки (с 3.3 ± 0.3 до 5 ± 1.5 клеток; рис. 4е). НУП-А увеличивал долю агрегатов в биопленке после 24 ч с 54.2 ± 6.7 до $68.8 \pm 5.5\%$ и средний размер с 3.2 ± 0.3 до 7.1 ± 1.8 клеток. Таким образом, увеличение агрегации в суточном микробном сообществе в системе с редуцированной стадией адгезии на чашках Петри может быть причиной уменьшения числа КОЕ. Кроме того, размер агрегатов в бинарных

биопленках был схож с таковым в биопленках стафилококков. В зрелых биопленках эффекта гормона в данной системе не наблюдали. Также, увеличение агрегации в суточных бинарных биопленках позволяет предполагать, что потенциально НУП-А усиливал рост и деление клеток.

При изучении агрегации клеток в биопленках на жидкой среде RCM с полным циклом стадий адгезии были получены следующие результаты. В контрольных образцах биопленок возрастом 24 и 72 ч доля агрегатов и отдельных клеток была практически одинаковой – примерно 50% (рис. 5а). Добавление НУП-А слегка сдвигало баланс в сторону агрегатов в биопленках возрастом 24 ч, а в зрелых биопленках эффекта не наблюдали. Размер агрегатов в моновидовых биопленках *K. schroeteri* после 24 ч увеличивался в присутствии гормона до 5.5 ± 0.7 клеток (в контроле 3.9 ± 0.4 ; рис. 5б), в то время как в зрелых биопленках возрастом 72 ч он не менялся в присутствии НУП-А (4–4.5 клетки на агрегат). Эти результаты являлись статистически значимыми.

В моновидовых биопленках *S. aureus* после 24 ч доли клеток и клеточных агрегатов были практически равными, а гормон не оказывал влияния на этот баланс (рис. 5г), однако в зрелых биопленках присутствовали по большей части только отдельные клетки как потенциальные КОЕ ($62.4 \pm 6.6\%$). Добавление НУП-А увеличивало эту долю до $76.7 \pm 2.8\%$. Гормон также несколько стимулировал агрегацию в биопленках *S. aureus* после 72 ч инкубации (2.4 ± 0.3 – контроль; 3.0 ± 0.3 – в присутствии НУП-А). Таким образом, изменения в числе КОЕ (рис. 3в) в зрелых биопленках стафилококков не были связаны с несколько большими размерами клеточных агрегатов или большим количеством клеток. Следовательно, несмотря на отсутствие визуально наблюдаемых изменений в подсчете КОЕ, в реальности, судя по всему, имели место глубокие изменения в агрегации клеток в зрелых биопленках *S. aureus*.

В бинарных биопленках *S. aureus* также оказывал большее влияние на микробное сообщество. Наблюдалось преобладание отдельных клеток над агрегатами в течение времени инкубирования (63.4 и 67.5% в контроле), несмотря на тот факт, что доля агрегации в моновидовых биопленках была выше. Таким образом, агрегация клеток двух видов в системе с редуцированной стадией первичной адгезии была слабой. Количество клеток под воздействием НУП-А увеличилось до $77 \pm 6\%$ после 24 ч и не менялось после 72 ч. Размер агрегатов не менялся и был близок к таковому в моновидовых биопленках *S. aureus*.

В модели, где начальная стадия адгезии не редуцирована, НУП-А в суточных бинарных сообществах ведет себя как ингибитор агрегации. В то же время, если начальный этап агрегации отсут-

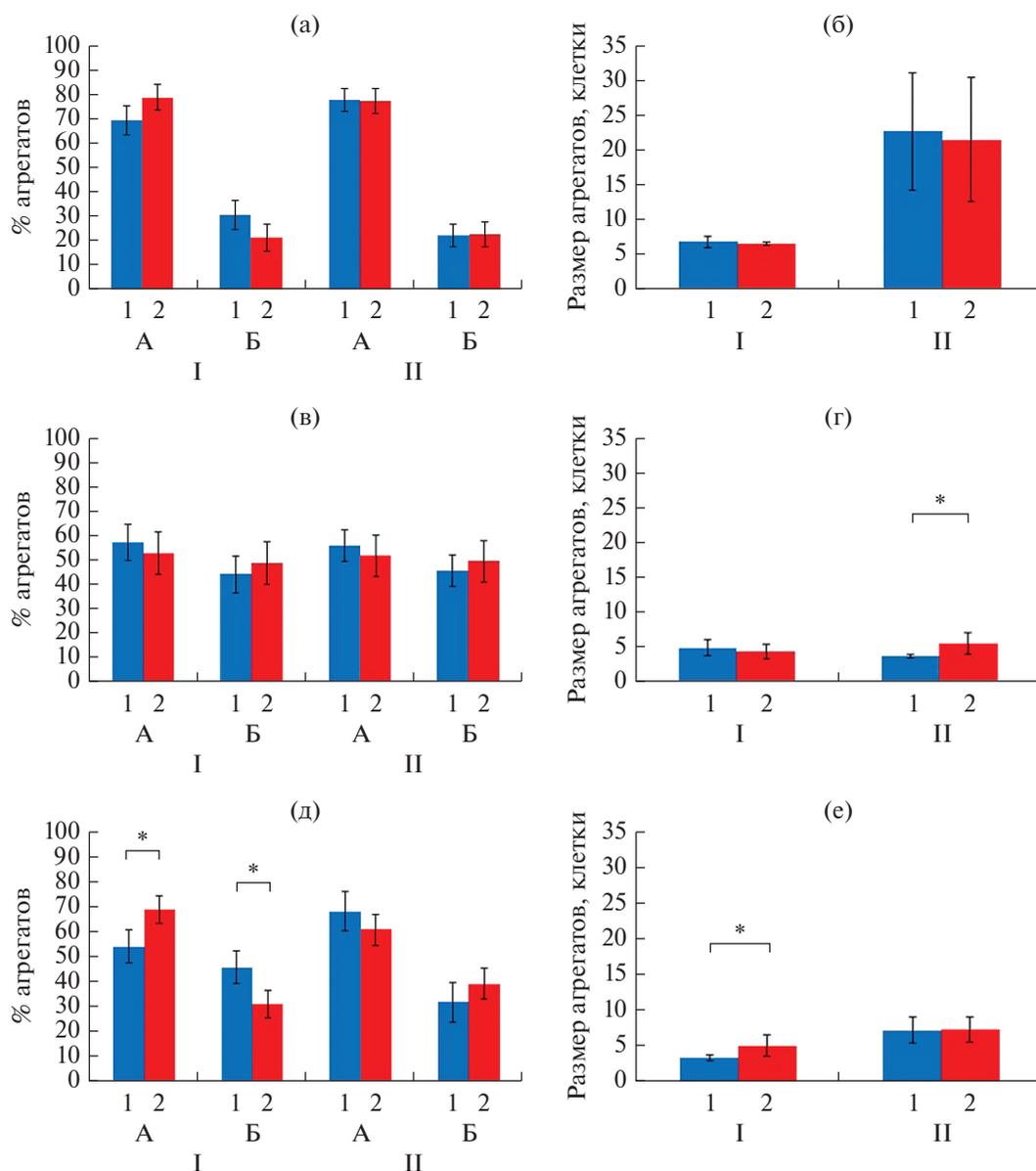


Рис. 4. Анализ агрегации клеток в моновиовых и бинарных биопленках *K. schroeteri* и *S. aureus*, выращенных на плотной среде RCM: а – соотношение клеток и агрегатов в моновиовых биопленках *K. schroeteri*, %; б – размер клеточных агрегатов в моновиовых биопленках *K. schroeteri*; в – соотношение клеток и агрегатов в моновиовых биопленках *S. aureus*, %; г – размер клеточных агрегатов в моновиовых биопленках *S. aureus*; д – соотношение клеток и агрегатов в бинарных биопленках, %; е – размер клеточных агрегатов в бинарных биопленках. I – инкубация 24 ч; II – инкубация 72 ч. А – агрегаты клеток; Б – одиночные клетки. 1 – контроль; 2 – НУП-А 6.5×10^{-10} (100Ф). * $p < 0.05$.

ствуует, в целом агрегация стимулируется. Следовательно, можно утверждать, что основной точкой действия НУП-А является процесс коагрегации клеток и потенциальные изменения свойств поверхности и деления клеток. Также НУП-А действует в качестве ингибитора роста *S. aureus* в моновиовых биопленках в системе с нередуцированной первичной адгезией. Таким образом, полученные данные также говорят о важности адгезии клеток к поверхностям и потенциальном действии на этот процесс НУП-А.

Изучение свойств клеточной поверхности *K. schroeteri* и *S. aureus*. Физико-химические характеристики клеточной поверхности микроорганизмов оказывают значительное влияние на их адгезию к субстратам и поверхностям. Результаты, полученные по методике MATS показали, что в контрольных образцах клетки *K. schroeteri* имеют невысокое сродство к декану и высокое к хлороформу: 28.6 ± 6.9 и $62.7 \pm 7.5\%$ соответственно (рис. 6а). Высокое сродство к хлороформу предполагает, что клеточная поверхность преимущественно элек-

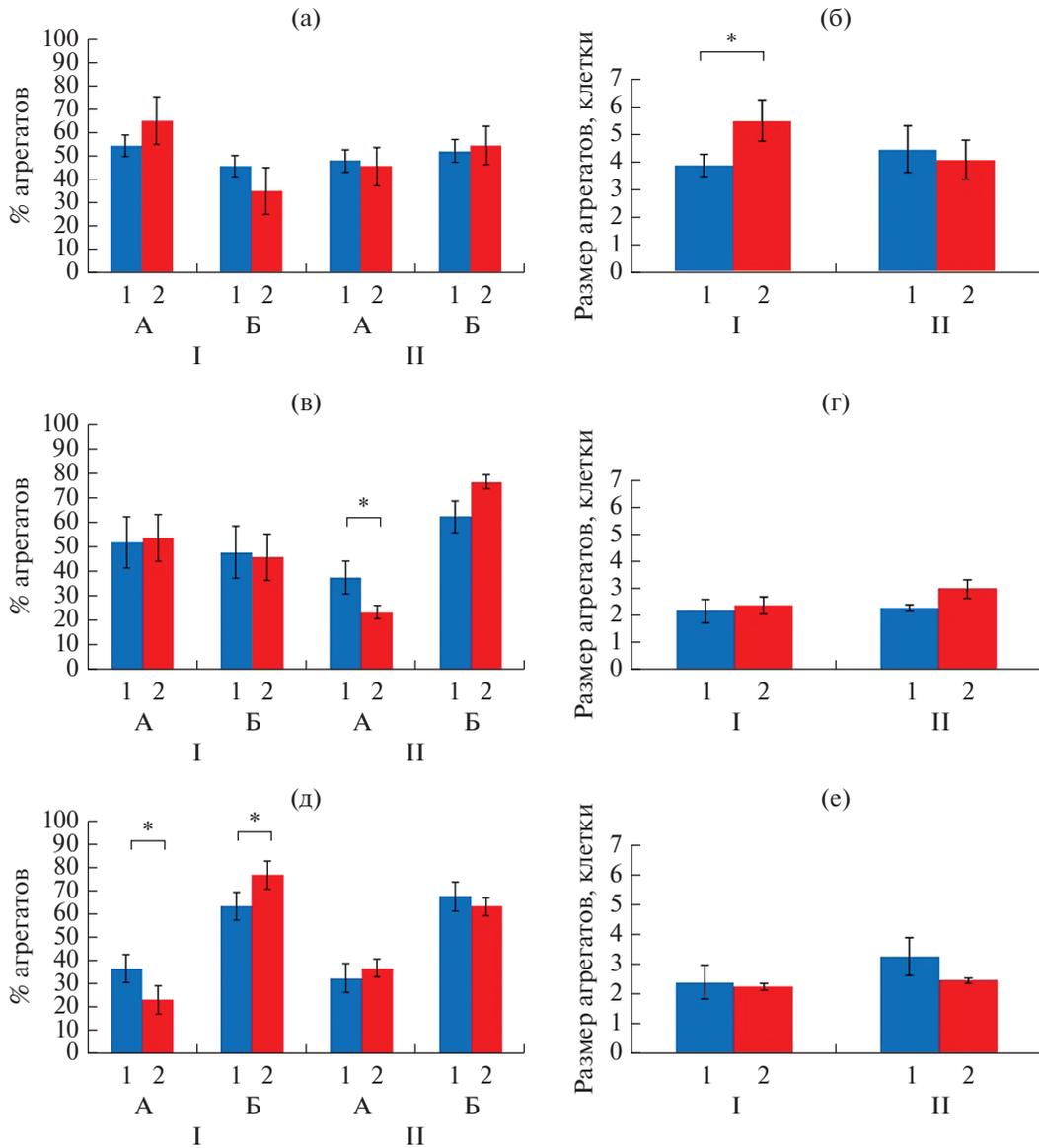


Рис. 5. Анализ агрегации клеток в моновидовых и бинарных биопленках *K. schroeteri* и *S. aureus*, выращенных на жидкой среде: а – соотношение клеток и агрегатов в моновидовых биопленках *K. schroeteri*, %; б – размер клеточных агрегатов в моновидовых биопленках *K. schroeteri*; в – соотношение клеток и агрегатов в моновидовых биопленках *S. aureus*, %; г – размер клеточных агрегатов в моновидовых биопленках *S. aureus*; д – соотношение клеток и агрегатов в бинарных биопленках, %; е – размер клеточных агрегатов в бинарных биопленках. I – инкубация 24 ч; II – инкубация 72 ч. А – агрегаты клеток; Б – одиночные клетки. 1 – контроль; 2 – НУП-А 6.5×10^{-10} (100Ф). * $p < 0.05$.

троотрицательная. Также клетки *K. schroeteri* обладали средними гидрофобными свойствами, что было видно по измерению афинности к гидрофобным растворителям. Средство клеток *K. schroeteri* к гексадекану было наименьшим. Добавление НУП-А не оказывало значимого эффекта на сродство клеток китоккокков ко всем растворителям, кроме гексадекана, в случае которого наблюдали понижение и без того низкого сродства (с 12 ± 2.6 до $7.2 \pm 2.5\%$).

Клетки *S. aureus* также обладали высоким сродством к хлороформу ($69.2 \pm 5.4\%$) и средним –

к декану ($46.5 \pm 1.8\%$) и гексадекану ($47.1 \pm 7.4\%$), что говорит об электроотрицательности клеточной поверхности стафилококка (по классификации кислот и оснований Льюиса) и средней гидрофобности (рис. 6б). Сродство клеток к этилацетату при этом было довольно низким. Добавление НУП-А к среде не оказывало значительного эффекта в случае хлороформа и этилацетата, но понижало сродство к декану и гексадекану до 43.4 ± 4.7 и $28.2 \pm 6.1\%$ соответственно. Это свидетельствует о снижении гидрофобности клеток *S. aureus* в присутствии НУП-А и, как следствие, о потенци-

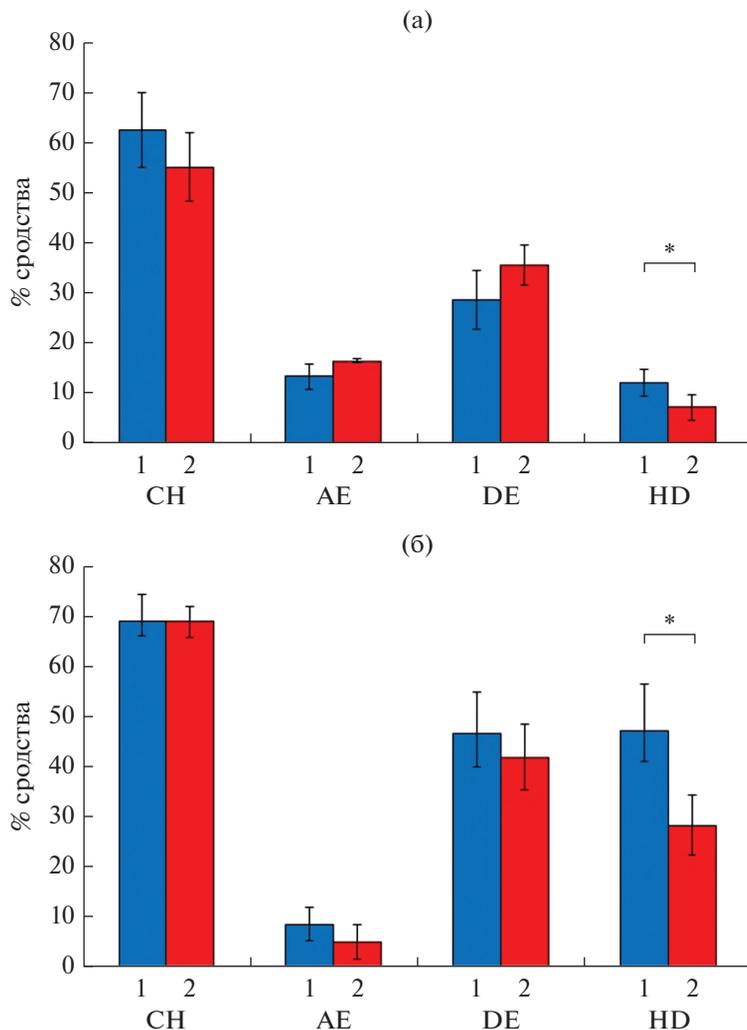


Рис. 6. Изменения сродства к полярным и неполярным растворителям: а – *K. schroeteri*; б – *S. aureus*. 1 – контроль; 2 – НУП-А 6.5×10^{-10} (100Ф). СН – хлороформ; EA – этилацетат; DE – декан; HD – гексадекан. * $p < 0.05$.

ально сниженной способности к адгезии к гидрофобным поверхностям, а также клеток друг к другу. Более того, изменения происходили в паре растворителей хлороформ–гексадекан, что позволяет предположить изменение в структурах, обладающих определенным значением сил Ван-дер-Ваальса. Тем не менее, возникает вопрос о том, почему в присутствии гормона влияния на рост биопленок не отмечено в системе с тефлоновыми кубиками. Вероятное объяснение этого – наличие неких структур, которые дополнительно отвечают за адгезию к носителям вроде тефлона. Эта гипотеза спекулятивна и должна быть проверена в дальнейшем.

Таким образом, поскольку по результатам работы *S. aureus* являлся доминирующим компонентом сообщества, снижение степени сродства к гексадекану в присутствии НУП-А именно у клеток стафилококка могло являться одной из ос-

новных причин изменений в росте бинарных биопленок.

Конфокальная микроскопия бинарных биопленок. Ввиду специфичности использованного в данной работе конфокального микроскопа Olympus и расширения получающихся файлов, было проанализировано общее число пикселей в каждом файле формата OME-TIFF, полученном из образцов. В данной системе биопленки были образованы планктонными клетками на плоской и гладкой стеклянной поверхности 24-луночных культуральных планшетов. В моновидовых биопленках не было обнаружено значимого эффекта НУП-А на их рост ни после 24 ч, ни после 72 ч инкубации. В образцах *S. aureus* была обнаружена незначительная тенденция к стимуляции после 24 ч и к ингибированию после 72 ч, что позволяет предположить ускорение роста биопленки в присутствии НУП-А (рис. 7в), однако этот эффект был статистически незначимым. Визуализация биопленок приведена в приложении (рис. S3 и рис. S4). Несмотря на

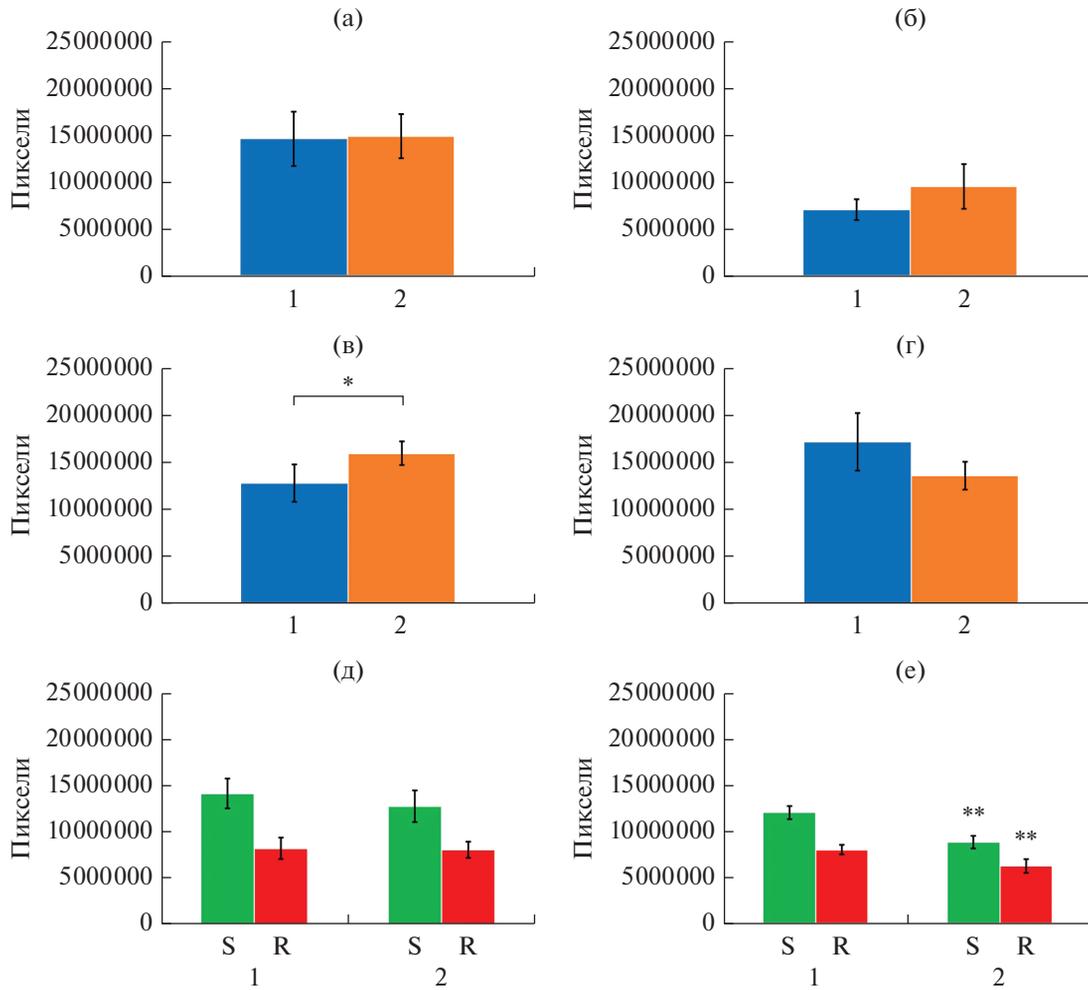


Рис. 7. Пиксельный объем биопленок, измеренный с помощью КЛСМ: а – моновидовые биопленки *K. schroeteri* 24 ч; б – моновидовые биопленки *K. schroeteri* 72 ч; в – моновидовые биопленки *S. aureus* 24 ч; г – моновидовые биопленки *S. aureus* 72 ч; д – бинарные биопленки 24 ч; е – бинарные биопленки 72 ч. 1 – контроль; 2 – НУП-А 6.5×10^{-10} (100Ф). S – окраска бинарных биопленок SYTO9; R – окраска бинарных биопленок R6G. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

отсутствие значимых эффектов НУП-А на моновидовые биопленки, интересные данные для этой модельной системы были получены в бинарном сообществе (рис. 7д, 7е). Из анализа изображений видно, что *S. aureus* действительно являлся доминирующим компонентом сообщества, составляя не менее 60% биомассы. Это выглядит логичным ввиду более высокой скорости роста стафилококка, а также учитывая тот факт, что при проведении FISH зачастую детектируются не все клетки. В то время как в формирующихся биопленках возрастом 24 ч (рис. 7д) эффект гормона отсутствовал, в зрелых биопленках возрастом 72 ч (рис. 7е) под действием НУП-А значительно снижалось число пикселей в обоих каналах (в зеленом – с $12\,148\,054.7 \pm 698\,390.7$ до $8\,906\,087.8 \pm 710\,370.1$; в красном – с $8\,070\,882.8 \pm 522\,088$ до $6\,312\,657.2 \pm 767\,297.9$). Это можно объяснить, во-первых, особенностями модельной системы, а во-вторых, сниженной способностью *S. aureus* к агрегации после 72 ч (рис. 5в). Поскольку *S. aureus*, по-видимому, является доминирующим видом в сообществе,

его способность к агрегации могла быть ключевой для стабильности всего сообщества. Таким образом, результаты КЛСМ, при сопоставлении их с другими данными, позволяют установить, что свойства клеточной поверхности и адгезия могут быть основными точками действия НУП-А на эти виды микроорганизмов.

В настоящее время известно, что натрийуретические пептиды являются аффлекторами микробных сообществ. В предыдущих работах отмечено, что НУП способны выступать в качестве регуляторов различных процессов в клетках микроорганизмов, а также в качестве улучшителей роста для отдельных компонентов микробного сообщества (Rosay et al., 2015; Ганнесен и соавт., 2018; Ovcharova et al., 2021). Было показано, что НУП-А оказывает эффект на *P. aeruginosa*, действуя в качестве разрушающего биопленки агента и усиливая действие антибиотиков (Louis et al., 2022). Установлено, что в исследованных на сегодняшний день бинарных сообществах микроорганизмов НУП-А

ускоряет рост более “безопасных” бактерий в противовес более “вредным”. Это касается улучшения роста *S. acnes* или *S. epidermidis* относительно золотистого стафилококка (Gannesen et al., 2018a, Ганнесен и соавт., 2018б). В случае *S. acnes*, рост данных бактерий в присутствии НУП-А также улучшался в сообществе с *S. epidermidis* (Ovcharova et al., 2021).

Во впервые исследованном сообществе *K. schroeteri* H01 и *S. aureus* 209P не наблюдали столь выраженного эффекта от гормона, какой наблюдался, например, для сообщества *S. epidermidis* и *S. acnes* (Ovcharova et al., 2021). По результатам предыдущих исследований, тем не менее, можно было предположить, что концентрация НУП-А 6.5×10^{-10} М может быть эффективной и в отношении других модельных сообществ микроорганизмов кожи. В данной работе было показано, что НУП-А не оказывает сильного действия на рост биопленок или планктонных культур в определенных модельных системах (например, на тефлоновых кубиках), но способен изменять свойства клеточной поверхности и процессы агрегации биопленок, что можно выявить лишь проведением более глубоких исследований с использованием других моделей. Снижение сродства к гексадекану в присутствии НУП-А привело к частичному снижению гидрофобности клеток обоих микроорганизмов и, как следствие, к потенциальному снижению сродства клеток данных штаммов к носителю и друг к другу в случае *S. aureus*. Это было показано в системах, где биопленки формировались из планктонных культур, и стадия первичной адгезии не была редуцирована. При этом добавление НУП-А стимулировало рост *K. schroeteri*, и способность к коадгезии у китококков не снижалась даже из-за более низкого сродства к гексадекану. Будучи микроорганизмом с изначально более низкой скоростью роста, *K. schroeteri* не мог оказать значимого вклада в общую биомассу биопленок. Тем не менее, присутствие китококков меняло эффект НУП-А на бинарные биопленки. Например, в системах с нередуцированной стадией первичной адгезии *K. schroeteri* снижал ингибирующий эффект НУП-А на *S. aureus* (потенциально из-за свойств его клеточной поверхности). Кроме того, в присутствии *Kytococcus* размер агрегатов в бинарных сообществах был выше, чем в моновидовых биопленках *S. aureus*. Однако в самой биопленке имел место антагонизм между двумя бактериями. НУП-А ингибировал рост стафилококков в присутствии китококков в сообществе, что было показано в модели со стекловолоконными фильтрами, в которой стадия первичной адгезии была редуцирована, а также с помощью конфокальной микроскопии.

Таким образом, в исследованном бинарном сообществе наблюдали амбивалентную роль *K. schroeteri*. С одной стороны, китококки положительно влияют на адгезию *S. aureus*, а с другой стороны, “переключают” действие НУП-А на сообщество со стимулирующего на ингибирующее. Таким образом, *Kytococcus* может рассматриваться в качестве потенциального пробиотика для кожи, усиливающего антибактериальные свойства разных соединений против оппортунистических патогенов, таких как *S. aureus*. Что касается НУП-А, несомнен-

но, изменение свойств клеточной поверхности может быть одним из результатов комплексного молекулярного механизма действия НУП-А на клетки. Если у бактерий имеются рецепторы к НУП-А (что было недавно показано в работе Louis et al., 2022), то его действие на бактерии может быть построено на индуцировании целого каскада внутриклеточных реакций. В случае *P. aeruginosa* НУП-А является стимулятором дисперсии зрелых биопленок. В нашем случае можно предположить наличие такого же воздействия как минимум на *S. aureus*, в случае которого, в определенных ситуациях, меньшее количество биомассы и меньшее число клеточных агрегатов обнаруживалось в биопленках через 72 ч. Однако данные гипотезы требуют подтверждения более глубокими исследованиями в будущем.

Говоря о поверхностных свойствах клеток и их изменениях, вызванных добавлением гормона, необходимо отметить, что эти изменения, возможно, касаются только определенных поверхностных структур, поскольку в опытах с тефлоновыми кубиками изменений в окраске КФ, а, следовательно, в общем объеме биомассы, не наблюдали. Это может быть также объяснено гипотетическим изменением количества матрикса в биопленках, что, однако, требует подтверждения в будущем. Тем не менее, по результатам работы уместно поставить вопрос об эффективности окрашивания кристаллическим фиолетовым в качестве универсального метода скрининга первичных активных соединений.

Резюмируя, необходимо отметить, что в данной работе было впервые продемонстрировано действие НУП-А на сообщества *S. aureus* и *K. schroeteri*. Механизм действия НУП-А, по-видимому, связан преимущественно с изменениями адгезивных свойств клеток. Также необходимо подчеркнуть дуалистическую роль *K. schroeteri*. Можно предположить, что эти бактерии могут использоваться в качестве потенциального кожного пробиотика, усиливающего ингибирующее действие НУП-А на *S. aureus*. Эти свойства делают в будущем НУП-А и *K. schroeteri* перспективными агентами для лечения кожи и поддержания ее гомеостаза. Однако, в связи с относительно большим количеством отмеченных случаев воспалений имплантов, вызванных *K. schroeteri*, необходимо учитывать все свойства китококков для работы с ними в качестве пробиотиков в будущем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств гранта РФ № 19-74-10071. Работа О.В. Калмантаевой, М.А. Макаровой и В.В. Фирстовой выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора. Работа В.К. Плакунова выполнена за счет финансовой поддержки Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ганнесен А.В., Лезуатье О., Нетрусов А.И., Плакунов В.К., Фейоле М.Ж.Ж. Регуляция натрийуретическими пептидами формирования моновидовых и бинарных биопленок бактерий микробиоты кожи *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus* // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 469–482.
- Gannesen A.V., Lesouhaitier O., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilloley M.G.J. Regulation of formation of monospecies and binary biofilms by human skin microbiota components, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, by human natriuretic peptides // Microbiology (Moscow). 2018b. V. 87. P. 597–609.
- Данилова Н.Д., Гераськина О.В., Дювенжи Е.В., Фефанов А.В., Плакунов В.К., Ганнесен А.В. Ингибирующее действие норадrenalина на рост биопленок комменсала кожи человека *Kytococcus schroeteri* H01 // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 618–622.
- Danilova N.D., Geras'kina O.V., Djuvenji E.V., Feofanov A.V., Plakunov V.K., Gannesen A.V. Inhibitory effect of norepinephrine on biofilm growth of the human skin commensal *Kytococcus schroeteri* H01 // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 666–669.
- Данилова Н.Д., Соловьева Т.В., Мартьянов С.В., Журина М.В., Ганнесен А.В. Стимулирующий эффект адреналина на биопленки *Micrococcus luteus* C01 // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 488–492.
- Danilova N.D., Solovyeva T.V., Mart'yanov S.V., Zhurina M.V., Gannesen A.V. Stimulatory effect of epinephrine on biofilms of *Micrococcus luteus* C01 // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 493–497.
- Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 484–489.
- Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. A universal method for quantitative characterization of growth and metabolic activity of microbial biofilms in static models // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 509–513.
- Aepinus C., Adolph E., von Eiff C., Podbielski A., Petzsch M. *Kytococcus schroeteri*: a probably underdiagnosed pathogen involved in prosthetic valve endocarditis // Wien. Klin. Wochenschr. 2008. V. 120. № 1–2. P. 46–49.
- Ariyaratnam S., Rood J.P. Measurement of facial skin temperature // J. Dentistry. 1990. V. 18. P. 250–253.
- Bagelman S., Zvigule-Neidere G. Insight into *Kytococcus schroeteri* infection management: a case report and review // Infect. Dis. Rep. 2021. V. 13. P. 230–238.
- Balasubramanian D., Harper L., Shopsis B., Torres V.J. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments // Pathog. Disease. 2017. V. 75. ftx005.
- Becker K., Schumann P., Wüllenweber J., Schulte M., Weil H.P., Stackebrandt E., Peters G., von Eiff C. *Kytococcus schroeteri* sp. nov., a novel Gram-positive actinobacterium isolated from a human clinical source // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1609–1614.
- Bellon-Fontaine M.N., Rault J., van Oss C.J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 1996. V. 7. P. 47–53.
- Boukerb A.M., Robert M., Teteneva N.A., Danilova N.D., Zhurina M.V., Mart'yanov S.V., Plakunov V.K., Feuilloley M.G.J., Gannesen A.V. Draft genome sequence of *Kytococcus schroeteri* strain h01, isolated from human skin. Microbiol. Res. Ann., V. 8. № 40, e01081-19.
- Blennow O., Westling K., Froding I., Ozenci V. Pneumonia and bacteremia due to *Kytococcus schroeteri* // J. Clin. Microbiol. 2011. V. 50. P. 522–524.
- Gannesen A.V., Lesouhaitier O., Racine P.-J., Barreau M., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilloley M.G.J. Regulation of monospecies and mixed biofilms formation of skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by human natriuretic peptides // Front. Microbiol. 2018a. V. 9. P. 2912.
- Gannesen A.V., Schelkunov M.I., Geras'kina O.V., Makarova N.E., Sukhacheva M.V., Danilova N.D., Ovcharova M.A., Mart'yanov S.V., Pankratov T.A., Muzychenko D.S., Zhurina M.V., Feofanov A.V., Botchkova E.A., Plakunov V.K. Epinephrine affects gene expression levels and has a complex effect on biofilm formation in *Micrococcus luteus* strain C01 isolated from human skin // Biofilm. 2021. V. 3. 100058.
- Grice E.A., Kong H.H., Conlan S., Deming C.B., Davis J., Young A.C. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome // Science. 2009. V. 324. P. 1190–1192.
- Kiseleva A.A., Solovyeva T.V., Ovcharova M.A., Geras'kina O.V., Mart'yanov S.V., Cherdyntseva T.A., Danilova N.D., Zhurina M.V., Botchkova E.A., Feofanov A.V., Plakunov V.K., Gannesen A.V. Effect of β -estradiol on mono- and mixed-species biofilms of human commensal bacteria *Lactobacillus paracasei* AK508 and *Micrococcus luteus* C01 on different model surfaces // Coatings. 2022. V. 12. Art. 436.
- Lawson T.S., Connally R.E., Iredell J.R., Vemulpad S., Piper J.A. Detection of *Staphylococcus aureus* with a fluorescence *in situ* hybridization that does not require lysostaphin // J. Clin. Lab. Anal. 2011. V. 25. P. 142–147.
- Louis M., Clamens T., Tahrioui A., Desriac F., Rodrigues S., Rosay T., Barreau M., Racine P.-J., Bouffartigues E., Cornelis P., Chevalier S., Feuilloley M.G.J., Lesouhaitier O. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion by the human atrial natriuretic peptide // Adv. Sci. 2022. V. 9. e2103262.
- Lyte M. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century // Trend Microbiol. 2004. V. 12. P. 14–20.
- Mart'yanov S.V., Botchkova E.A., Plakunov V.K., Gannesen A.V. The impact of norepinephrine on mono-species and dual-species *Staphylococcal* biofilms // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 820.
- Ovcharova M.A., Geraskina O.V., Danilova N.D., Botchkova E.A., Mart'yanov S.V., Feofanov A.V., Plakunov V.K., Gannesen A.V. Atrial natriuretic peptide affects skin commensal

- Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes* dual-species biofilms // *Microorganisms*. 2021. V. 9. P. 552.
- Parlet C.P., Brown M.M., Horswill A.R. Commensal staphylococci influence *Staphylococcus aureus* skin colonization and disease // *Trends Microbiol.* 2019. V. 27. P. 497–507.
- Potter L.R., Yoder A.R., Flora D.R., Antos L.K., Dickey D.M. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications // *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 191 / Eds. Schmidt H.H.H.W., Hofmann F., Stasch J.P. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. P. 341–366.
- Ramasamy S., Barnard E., Dawson T.L., Jr., Li H. The role of the skin microbiota in acne pathophysiology // *Br. J. Dermatol.* 2019. V. 181. P. 691–699.
- Rosay T., Bazire A., Diaz S., Clamens T., Blier A.S., Mijouin L., Hoffmann B., Sergent J.-A., Bouffartigues E., Booireau W., Vieillard J., Hulen C., Dufour A., Harmer N.J., Feuilleley M.G.J., Lesouhaitier O. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a functional human natriuretic peptide receptor ortholog: involvement in biofilm formation // *MBio*. 2015. V. 6. e01033–15.
- Schaumburg F., Schmalstieg C., Fiedler B., Brentrup A., Omran H., Becker K. A bumpy road to the diagnosis of a *Kytococcus schroeteri* shunt infection // *J. Med. Microbiol.* 2013. V. 62. P. 165–168.
- Stepniakowski K., Januszewicz A., Lapinski M., Feltynowski T., Chodakowska J., Ignatowska-Świtalska H., Wocial B., Januszewicz W. Plasma atrial natriuretic peptide (ANP) concentration in patients with pheochromocytoma // *Blood Press*. 1992. V. 1. P. 157–161.
- Tong S.Y.C., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management // *Clin. Microbiol. Rev.* 2015. V. 28. P. 603–661.
- Veron W., Lesouhaitier O., Pennanec X., Rehel K., Leroux P., Orange N., Feuilleley M.G. Natriuretic peptides affect *Pseudomonas aeruginosa* and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis // *FEBS J.* 2007. V. 274. P. 5852–5864.
- Yoshimura T., Yoshimura M., Yasue H., Ito M., Okamura H., Mukoyama M., Nakao K. Plasma concentration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide during normal human pregnancy and the postpartum period // *J. Endocrinol.* 1994. V. 140. P. 393–397.
- Yousri T., Hawari M., Saad R., Langley S. *Kytococcus schroeteri* prosthetic valve endocarditis // *BMJ Case Rep.* 2010. bcr0620103064. <https://doi.org/10.1136/bcr.06.2010.3064>
- Zhurina M.V., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Shtratnikova V.Y., Plakunov V.K. Niclosamide as a promising antibiofilm agent. *Microbiology (Moscow)*, 2017. V. 86. № 4. P. 455–462.

Binary Biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Kytococcus schroeteri* H01: Dualistic Role of Kytococci and Cell Adhesion Alterations in the Presence of the A-Type Natriuretic Peptide

E. V. Diuvenji¹, E. D. Nevolina¹, S. V. Mart'yanov¹, M. A. Zhurina¹, O. V. Kalmantaeva², M. A. Makarova¹, E. A. Botchkova¹, V. V. Firstova², V. K. Plakunov¹, and A. V. Gannesen¹, *

¹Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology,” Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, 142279 Russia

*e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

Received April 6, 2022; revised April 19, 2022; accepted April 19, 2022

Abstract—Investigation of the interactions between *Staphylococcus aureus* 209P and *Kytococcus schroeteri* H01 in binary biofilms revealed the sensitivity of these bacteria to the atrial natriuretic peptide (ANP) in a concentration of 6.5×10^{-10} M. In the presence of ANP, affinity of both bacteria to hexadecane decreased significantly, as was determined by MATS (microbial adhesion to solvents) experiments. Their ability to aggregate with each other and on the surface also altered in the presence of the hormone, affecting mainly the initial adhesion stage in biofilm formation. Plating of the binary communities revealed that they consisted mostly of staphylococci, while *K. schroeteri* constituted the minor part of the cell biomass. They, however, affected cell aggregation and the ANP effect on the community. *K. schroeteri* played a dualistic role, both facilitating *S. aureus* adhesion and acting as its antagonist in the biofilm. Moreover, in binary communities *K. schroeteri* was responsible for the shift of ANP action on *S. aureus* from neutral/stimulatory to inhibitory.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Kytococcus schroeteri*, binary biofilms, microbial communities, skin microbiota, atrial natriuretic peptide, human hormones, MATS

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИСРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И СТРУКТУРЫ
МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК ЭКОНИШ МЯСОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ
КОМБИНАТОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ИСТОЧНИКАМИ СЫРЬЯ

© 2022 г. Ю. А. Николаев^{a, b, *}, Е. Н. Тихонова^b, Г. И. Эль-Регистан^b, М. В. Журина^b,
В. К. Плакунов^b, Е. В. Демкина^b, Е. В. Зайко^a, Д. С. Батаева^a, Н. А. Насыров^a, Ю. К. Юшина^a

^aФедеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, 109316 Россия

^bИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 25.05.2022 г.

Принята к публикации 26.05.2022 г.

В настоящем исследовании впервые проведен сравнительный анализ локализации и структурной организации микробных биопленок, населяющих созданную человеком своеобразную экологическую нишу, возникшую на мясоперерабатывающих заводах, отличающихся сырьем (птица, свинина, смешанное сырье). Полноценные зрелые биопленки обнаружены как в обычных местах санитарного контроля (оборудование, канализационные трапы, стены), так и необычных (потолки, нижняя сторона мостков, колеса транспортных устройств, стены тоннеля при минусовой температуре), что свидетельствует о высокой адаптационной способности микробных сообществ, а с практической точки зрения делает необходимым пересмотр (дополнение) мест и протоколов санобработки. Использование трансмиссионной электронной микроскопии позволило получить информацию о составе и разнообразии микробных биопленок в этом экотопе, а также о физиологическом состоянии составляющих их микроорганизмов (активные клетки, покоящиеся клетки, клетки в стадии лизиса). Описаны также морфотипы, способствующие выживанию бактерий в этих биопленках (старые клетки, специализированные формы покоя нескольких типов).

Ключевые слова: биопленки, бактерии, мясоперерабатывающие заводы, структура, локализация, трансмиссионная электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0026365622600407

Биопленочные загрязнения на предприятиях пищевой отрасли, включающие условно-патогенные и патогенные бактерии, представляют серьезную опасность. Это обуславливает необходимость исследования особенностей локализации и структуры биопленок (БП) с целью профилактики их формирования и борьбы со зрелыми биопленками.

Способ существования микроорганизмов в виде прикрепленных к биогенным или абиогенным поверхностям клеток, образующих полимерную матрицу и развивающихся в ней в виде моно- или мультивидового сообщества, известен как биопленочный (Satpathy et al., 2016; Плакунов и соавт., 2017; Muhammad et al., 2020). Высокая устойчивость биопленочных микроорганизмов к антибиотикам и дезинфектантам сделали биопленки центром внимания не только в медицине, но и во множестве отраслей пищевых производств, включая переработку мяса и птицы (Srey et al., 2013; Galié et al., 2018), где возникла своеобразная, созданная, благодаря деятельности человека, экологическая ни-

ша со специфическим составом микробных сообществ. Известно, что до трети всех потерь в цепочке поставок пищевых продуктов составляет порча от микробных заражений, что обуславливает приоритет изучения и профилактики биопленкообразования в пищевых отраслях (Gonzales-Rivas et al., 2018; Sharahi et al., 2019; Yuan et al., 2020a). Выявление, ингибирование развития и удаление БП с пищевых продуктов, а также поверхностей оборудования предприятий пищевой промышленности стали огромной проблемой (Gonzales-Rivas et al., 2018; Alvarez-Ordóñez et al., 2019). Основное внимание в изучении БП уделяется выявлению причин их устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам, среди которых рассматриваются поливидовой состав биопленочного населения; горизонтальный перенос генов устойчивости; химическая структура и защитные свойства внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) (Flemming et al., 2016; Yuan et al., 2018). Например, получены прямые доказательства защитной роли матрикса грамотрица-

тельных бактерий при действии антибиотиков на грамположительные бактерии в бинарных биопленках (Журина и соавт., 2019; Плакунов и соавт., 2019). В последние годы сформировалось понимание роли в устойчивости БП не только видового разнообразия биопленочного населения, но и его возрастной гетерогенности (включающей чувствительные к стрессорным воздействиям молодые делящиеся клетки, более устойчивые клетки стационарной фазы и высоко устойчивые покоящиеся формы), а также фенотипической гетерогенности (включающей клетки-персистеры и мелкоколониальные варианты SCV) (Stewart, Franklin, 2008; Wimpenny et al., 2020).

Целью настоящего исследования был сравнительный анализ состава, локализации и структурной организации биопленок, отобранных с различного оборудования и поверхностей внутренних помещений трех мясоперерабатывающих заводов, различающихся сырьем и технологиями его переработки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе исследовали материалы, собранные с поверхностей внутренних помещений и технологического оборудования в различных зонах трех мясоперерабатывающих предприятий: мясоперерабатывающие заводы (МПЗ) № 1, № 2 и птицеперерабатывающий комбинат (ППК) № 3. Образцы отбирали перед процедурой плановой дезинфекции (ежедневная обработка всех технологических поверхностей раствором гипохлорита натрия) путем соскабливания металлическим шпателем с технологического оборудования или поверхностей помещения (табл. 1).

Микроскопические исследования. Структурную организацию образцов БП изучали с применением трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии их ультратонких срезов.

Образцы, взятые перед процедурой плановой дезинфекции, сразу помещали в 2.5% раствор глутарового альдегида в какодилатном буфере (0.05 М раствор какодилата натрия; рН 7.0–7.5) и выдерживали в течение 1 сут при 4°C, затем трижды промывали тем же буферным раствором в течение 5 мин и фиксировали в растворе OsO₄ (1% OsO₄) и в 0.7% растворе рутениевого красного в какодилатном буфере в течение 1.5 ч при 4°C. После фиксации образцы заключали в 2% агар-агар и последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата в 30% этиловом спирте в течение 4 ч, далее в 70% этаноле в течение 12 ч при 4°C. Материал обезвоживали в 96% этиловом спирте (2 раза по 15 мин), затем в абсолютном ацетоне (3 раза по 10 мин). Образцы пропитывали смолой ЭПОН-812 (Ероху Embedding Medium Эпон® 812, “Sigma-Aldrich”, США), далее выдерживали сна-

чала в смеси смола–ацетон в соотношении 1 : 1 (1 ч), а затем в смеси смола–ацетон в соотношении 2 : 1 (1 ч). Полученный материал заливали в капсулы со смолой и проводили полимеризацию при температуре 37°C в течение 24 ч, затем при 60°C в течение 24 ч. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (“LKB”, Швеция) и контрастировали в водном растворе 3% уранилацетата (30 мин), а затем в водном растворе 4% цитрата свинца (30 мин).

Для выявления кислых мукополисахаридов в составе биопленок использовали краситель рутениевый красный (“Sigma”, США) при его внесении в количестве 0.7% вместе с OsO₄. С помощью рутениевого красного показано наличие внеклеточных полисахаридов в матриксе биопленок ряда бактерий (Smirnova et al., 2010).

Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM 100CXII (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и рабочем увеличении 5000–50000. Фотодокументирование материалов проводили с помощью цифровой системы вывода оптических изображений Morada G2.

О наличии покоящихся форм судили по присутствию в образцах клеток, имеющих характерные признаки – утолщенную клеточную стенку, электронно-плотную цитоплазму (Мулюкин и соавт., 2009, 2014; Лойко и соавт., 2011, 2017; Соляникова и соавт., 2017), в некоторых случаях – компактизованный биокристаллизованный нуклеоид (Лойко и соавт., 2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биопленки с завода № 1. Для исследования были отобраны 12 образцов с поверхностей помещений и технологического оборудования на всех этапах обработки мяса (табл. 1).

Образцы № 1 и 2, отобранные со стенок двух разных сливных трапов цеха накопителя туш, были представлены скоплениями органического материала, в толще которого встречаются единичные клетки бактерий, что указывает на начальный этап образования БП (адсорбция органического материала и адгезия клеток бактерий).

В образце № 3, взятом у основания колонны цеха накопителя туш из лужи холодной воды со льдом, клеток микроорганизмов также не было обнаружено.

Образец № 4 – с нижней поверхности (с конденсатом) лифта ящиков с мясом сырьевого цеха, был представлен хорошо сформированной БП (рис. 1). Биопленка характеризовалась большим морфологическим разнообразием клеток и их возрастной гетерогенностью: старые клетки грамотрицательного типа с включением ПГА (I тип); молодые грамположительные “лохма-

Таблица 1. Биопленки, отобранные для исследования

№ образца	Цех, условия	Объект (конкретное место) отбора пробы
Завод № 1		
1	Накопитель туш; температура 1.8°C	Стенка трапа (слива) в полу № 1
2	»	Стенка трапа (слива) в полу № 2
3	»	Основание колонны (крошащийся камень в луже из холодной воды со льдом)
4	Сырьевой цех, участок обвалки; температура 4°C	Конденсат с нижней поверхности отпуска ящиков (над ящиками с мясом)
5	»	Смазка конвейера
6	»	Стенка трапа (слива) в полу
7	»	Поверхность рамы для перевозки ящиков (внутренняя часть)
8	»	Колеса Рохли
9	Накопитель разделанного сырья	Лед с грязью с пола
10	»	Пятно на колонне сверху у швеллера
11	»	Потолок
12	»	“Сталактит” с потолка
Завод № 2		
1	Цех (обвалки и жиловки)	Канализационный люк № 1
2	»	Раковина трубы сливной
3	Цех разделки	Канализационный люк № 2
4	»	Чан для мытья полов
Завод № 3		
1	Цех потрошения	Трап
2	»	Потолок
3	Цех дезинфекции тушек	Жир с поверхности металлического шнека, вращающегося внутри ванны Морриса
4	»	Трап на полу под ванной Морриса
5	»	Нижняя сторона мостков (по которым можно подняться для контроля ванны Морриса)
6	»	Потолок около ванны Морриса (участок охлаждения)
7	Тоннель охлаждения	Стена в тоннеле охлаждения тушек; температура 0°C
8	Цех упаковки	Колеса тележки № 1 (тефлон) – начало цеха
9	»	Колеса тележки № 2 (тефлон) – линия упаковки готовой продукции (конец цеха)

тые” клетки с многочисленными пиями (II тип); палочки с закругленными концами (III тип) (рис. 1); крупные (~2 мкм) грамотрицательные клетки с хорошо выраженным периплазматическим пространством (IV тип) (рис. 1б). Внеклеточный полимерный матрикс (ВПМ) хорошо сформирован, включает частицы органического вещества и множественные мембранные везикулы (МВ). Также хорошо видны покоящиеся формы (ПФ)

двух типов – мелкие и крупные. Подобная гетерогенность ПФ была ранее неоднократно описана для широкого круга бактерий (Мулюкин и соавт., 2009, 2014; Лойко и соавт., 2011; Соляникова и соавт., 2017). МВ в биопленках обнаружены сравнительно недавно (Schooling, Beveridge, 2006; Smirnova et al., 2010; Журина и соавт., 2013), тем не менее, убедительно показано, что они являются обязательным компонентом всех биопленок,

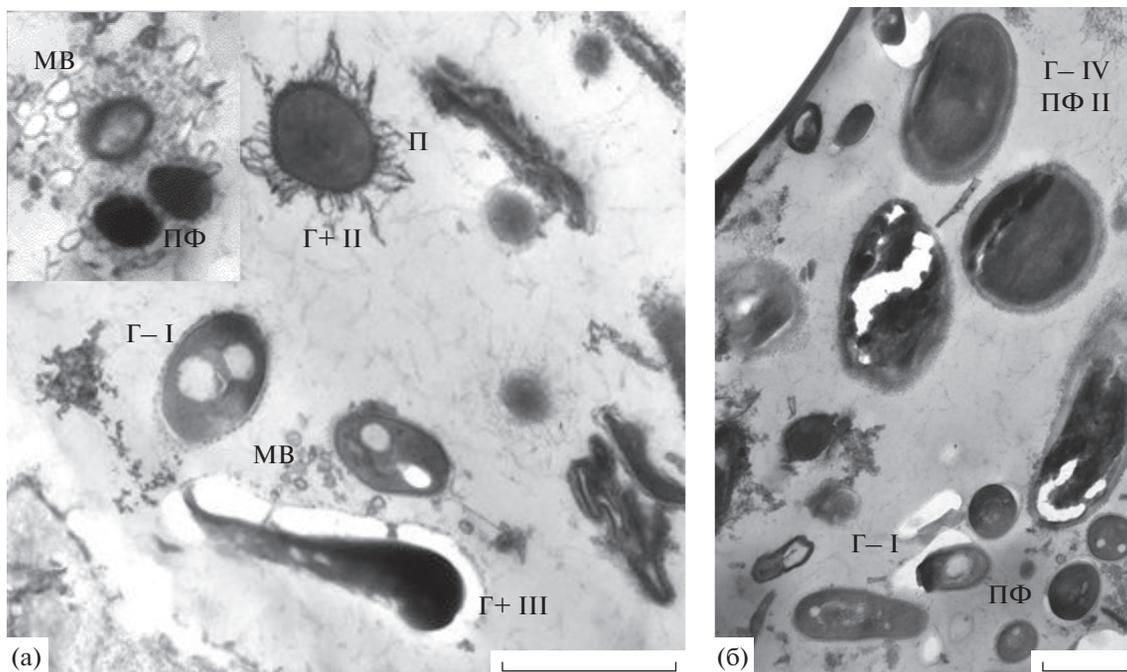


Рис. 1. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого с нижней поверхности лифта для ящиков (над ящиками с мясом) (сырьевой цех, участок обвалки, завод № 1). Сформированная старая БП с клетками разных морфотипов: а – грамтрицательные (Г–) и грамположительные (Г+) клетки I–III морфотипов; б – клетки IV морфотипа. Хорошо видны мембранные везикулы (МВ), пили (П), покоящиеся клетки (ПФ) двух типов. Масштабная линейка – 1 мкм.

исследованных с помощью просвечивающей электронной микроскопии. МВ представляют собой наночастицы, состоящие из липидов разной природы, а также периплазматических и цитоплазматических белков. Они включают ДНК, РНК и низкомолекулярные органические соединения разной природы. К их образованию способны как грамположительные, так и грамтрицательные бактерии. Анализ методами липидомики и протеомики показал, что состав МВ зависит от условий роста микроорганизмов. Они способны осуществлять горизонтальный перенос генов, в том числе детерминант устойчивости к антибиотикам (Nagakubo et al., 2020).

Образец № 5 – смазка конвейера. Образец представлен вязкой темной субстанцией. Биопленки не выявлено, в образце обнаружены частицы органического материала, отдельные клетки, капли жира.

Образец № 6 – со стенки сливного трапа в сырьевом цехе, представлен скоплениями органического материала с включением единичных клеток бактерий. БП нет, как в образцах № 1 и 2, взятых со стенок сливного трапа в цехе накопителя туш.

Образец № 7, взятый с поверхности рамы для перевозки ящиков с птицей, представлен неразложившимися мышечными волокнами, плотно уложенными в разных плоскостях. Бактериальных клеток не обнаружено.

Образец № 8, взятый с колес тележки с домкратом “Рохли” (рис. 2), представлен хорошо сформированной слоистой биопленкой, содержащей преимущественно старые клетки с включением полигидроксиалканоев ПГА (рис. 2), двух морфотипов, различающихся размерами: грамположительных палочек $\sim 0.5 \times 1.5$ мкм и кокковидных грамтрицательных клеток $\sim 0.8 \times 1.3$ мкм, растущих микроколониально. Матрикс грамтрицательных бактерий содержит фибриллы полисахаридов.

Образец № 9, отобранный с пола (лед с грязью) в цехе накопления разделанного сырья, представлял собой фрагментированные мышечные волокна (В) и ядра миоцитов (ЯМ); бактериальных клеток практически не было.

Образец № 10, взятый сверху колонны у швеллера, был представлен рыхлой, сухой крошащейся БП с плохо сформированным полимерным матриксом, включал небольшие микроколонии бактериальных клеток грамтрицательного типа с микрокапсулами, а также покоящиеся клетки.

Образец № 11 был отобран с потолка цеха накопителя разделанного сырья, содержал редкие рыхлые органические частицы; клеток не обнаружено.

Образец № 12, отобранный со “сталактита”, образовавшегося в центральной части потолка в цехе накопителя разделанного сырья (рис. 3), не-

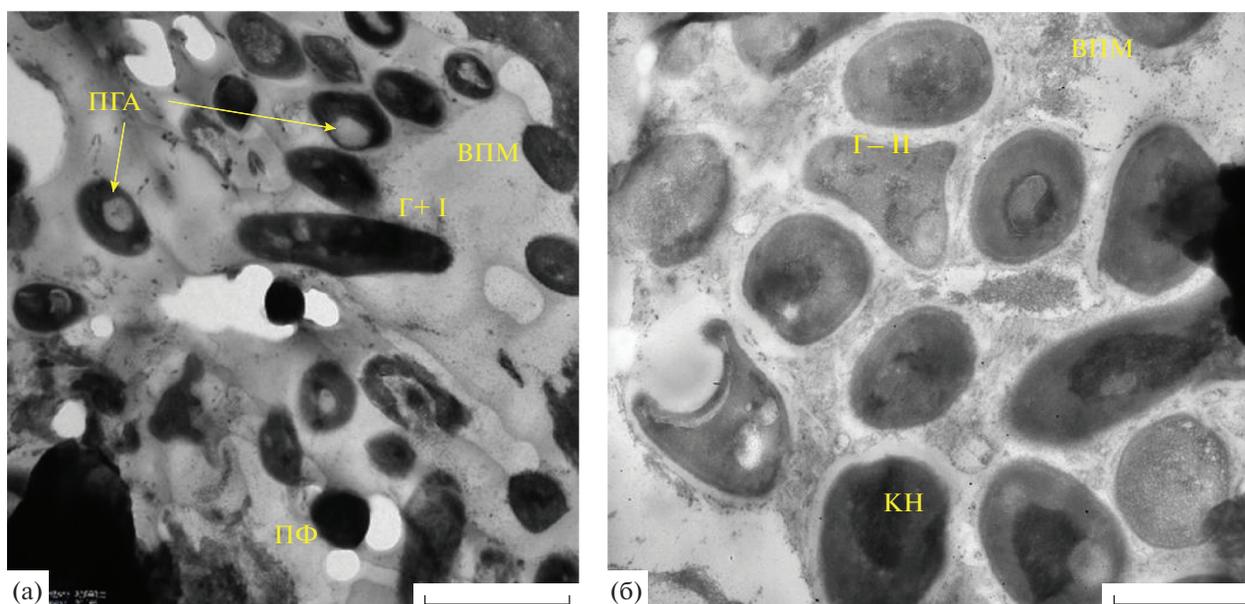


Рис. 2. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого с колес тележки с домкратом “Рохла” (сырьевой цех, участок обвалки, завод № 1): а – старые грамположительные клетки первого типа с ПГА (Г+ I); б – старые грамотрицательные клетки (Г– II) с компактизованным нуклеоидом (КН), полисахаридным матриксом (ВПМ). Масштабная линейка – 1 мкм.

ожиданно был представлен хорошо развитой многослойной пленкой (рис. 3а). Отмечено большое разнообразие морфотипов микробных клеток, развивающихся как смешанной популяцией, так и микробоколониально. I тип – грамотрицательные клетки овоидной формы, вегетативные (рис. 3а) и старые с компактизованным нуклеоидом (КН). II тип – грамположительные мелкие палочки (~0.2 × 0.8 мкм) (рис. 3а), часто растущие цепочкой. III тип (рис. 3б) – крупные грамотрицательные бактерии с выраженным периплазматическим пространством. IV тип – крупные грамположительные бактерии (рис. 3в), растущие микроколониально и окруженные общим непалисаридным матриксом. Биопленочное население было гетерогенно не только морфологически, но и по физиологическому возрасту клеток: часто встречались клетки автолизированные (А) – чехлы, а также покоящиеся формы (ПФ) (нескольких типов – крупные и мелкие, различающиеся по плотности содержимого), имеющие электронно-плотную оболочку; в них часто хорошо виден компактизованный биокристаллический нуклеоид (КН), утолщенная оболочка. Обнаружена бактерия необычной формы (рис. 3г) (~0.4 × 1.2 мкм), старая клетка, переходящая в ПФ, с хорошо выраженными тороидальными структурами нуклеоида, характерными для его биокристаллизации в старых клетках, и окруженная мощной полисахаридной капсулой, превосходящей толщину бактерии.

Биопленки с завода № 2. Всего было отобрано 4 образца (табл. 1).

Образец № 1, взятый из канализационного трапа цеха обвалки и жиловки, представлен многослойной биопленкой (рис. 4). Первый слой, по-видимому, экспонированный наружу, представлен, в основном, участками неразложившегося органического материала (ОМ), в котором находятся активные бактериальные клетки (Кл). Внеклеточный полимерный матрикс отсутствует (рис. 4а). Второй слой представляет собой зрелую БП с хорошо сформированным ВПМ из полисахаридного материала, окрашиваемый рутениевым красным, и множественными нитями фибриллярного материала (рис. 4в). Бактериальные клетки, включенные в матрикс, грамотрицательного типа, тонкостенные, крупные овоиды (0.8–1.2 мкм) и палочки (0.5–1.5 мкм), окружены синтезируемой ими капсулой непалисаридной природы (не окрашивается рутениевым красным); находятся в фазе стационарного роста – избилуют включениями полигидроксиалканоатов ПГА (рис. 4б); образуют внеклеточные мембранные везикулы (МВ) – характерный признак БП (рис. 4в). Из характерных образцов следует отметить поперечно-полосатые мышечные волокна (МВ) и ядра миоцитов, высвобождаемые из мышечной ткани. На рис. 4в хорошо видно, что мышечные волокна разрушаются (что определяется по их просветлению) под влиянием протеолитических ферментов, выделяемых мембранными везикулами (МВ).

Образец № 2, отобранный из трубы под раковиной цеха обвалки и жиловки (рис. 5), представлен молодой поливидовой БП, с остатками неразложив-

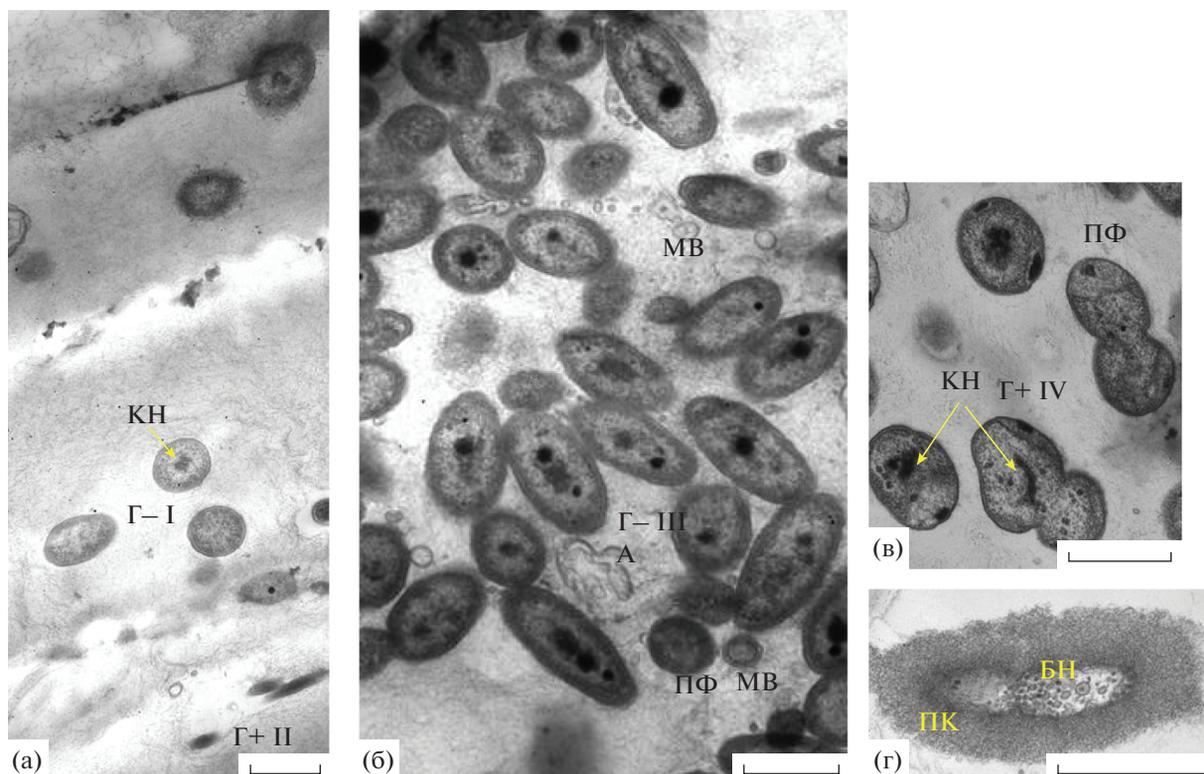


Рис. 3. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого с потолка (“stalactite”) (накопитель разделанного сыря, завод № 1): а – многослойная БП, клетки разных морфотипов (I, II, III); б – микроколония старых грамположительных клеток (Г+ III), мембранные везикулы (МВ), автолизированные клетки (А); в – старые клетки Г+ IV морфотипа с компактизированным нуклеоидом (КН) и ПФ V морфотипа; г – старая клетка с биокристаллизованным нуклеоидом (БН) в полисахаридной капсуле (ПК).

шегося органического материала (ОМ) (рис. 5а). Клетки нескольких типов: грамположительные и грамотрицательные кокки (~0.5–1 мкм) с множеством пилей разной длины (рис. 5а, 5б), окруженной капсульным материалом непалисахаридной природы. Пили служат для прикрепления к субстрату. Матрикс неравномерно окрашивается рутениевым красным, включает участки волокнистого фибриллярного полисахаридного материала (рис. 5б), который синтезируется на специфических образованиях, условно названных “грибовидными выростами” клетки.

Образец № 3, взятый из трапа канализационного люка цеха разделки сыря (рис. 6), представлен хорошо сформированной БП с умеренно окрашиваемым рутениевым красным матриксом (рис. 6а, 6в). Биопленка гетерогенна по морфотипам бактерий: грамположительные мелкие овоиды, размножающиеся делением (0.4 × 0.6 мкм) и крупные кокки (1.5 мкм) (рис. 6а); грамотрицательные крупные овоиды, находящиеся в чехлах непалисахаридной природы и формирующие единую микроколонию (рис. 6б); крупные грамотрицательные (1.0 × 1.5 мкм) клетки, лежащие в многослойных капсулах внешнего из полисахаридного гранулированного материала и внутреннего не-

полисахаридного слоя (рис. 6в). Отмечены формирование множественных мембранных везикул (рис. 6г) и возрастная гетерогенность биопленочного населения – образование покоящихся форм (ПФ) нескольких морфотипов, идентифицируемых по высокой электронной плотности и толстым клеточным оболочкам.

Образец № 4, отобранный из чана для мытья полов цеха разделки сыря (рис. 7), неожиданно был представлен многослойной хорошо развитой БП, формируемой участками со слабо развитым волокнистым полисахаридным матриксом (рис. 7б–7е), участками с микроколониями старых клеток с включениями ПГА (рис. 7г). В БП доминировали длинные грамположительные палочки (0.3 × 1.0–1.5 мкм) (рис. 7а–7в, 7д), образующие многочисленные короткие пили (рис. 7д) и капсулы непалисахаридной природы (рис. 7а–7в, 7д). В молодых участках БП обнаруживаются многочисленные мембранные везикулы (МВ) (рис. 7в).

Обнаружен интересный морфотип старой, по видимому, переходящей в покоящееся состояние клетки с включениями ПГА, окруженной мощным чехлом из волокнистого полисахаридного материа-

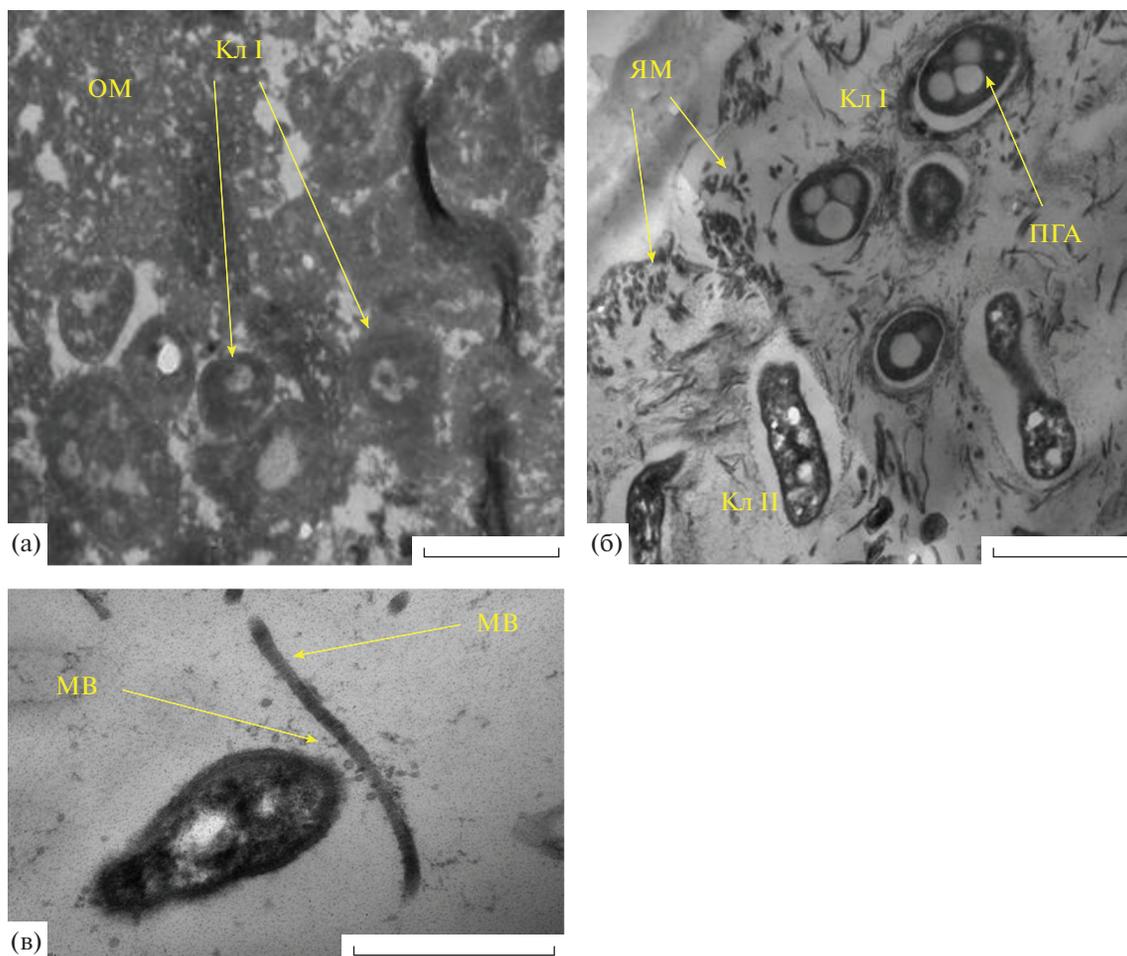


Рис. 4. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца № 1, взятого со стенки трапа цеха обвалки и жиловки завод № 2. Многослойная БП: а – органический материал (ОМ), клетки I морфотипа; б – сформированная БП, клетки I и II морфотипов, с включениями ПГА, остатки мышечных волокон (В), ядра миоцитов (ЯМ); в – клетка с мембранными везикулами (МВ); поперечно-полосатое мышечное волокно (МВ). Масштабная линейка – 1 мкм.

ла. Похожий морфотип был обнаружен в образце № 14 (завод № 1) (рис. 3г).

Формирование обильных моновидовых БП в чане для мытья полов, где постоянно присутствуют дезинфектанты, свидетельствует о селекции высокоустойчивого к ним клона бактерий, скорее всего непатогенных, и необходимости систематической смены дезинфицирующих средств.

Биопленки с завода № 3. На птицеперерабатывающем предприятии отобрано 10 образцов со всех этапов технологического процесса.

Образец № 1, взятый из трапа в цехе потрошения, не является БП и был представлен органическим материалом, гетерогенным по структуре – волокнистым и аморфным.

Образец № 2 – с потолка цеха потрошения (рис. 8) представлен классической зрелой поливидовой БП, условиями образования которой являются, по-видимому, обилие конденсата и редкая санитарная обработка. Визуализируются органические

частицы, достаточно плотные, большое количество мембранных везикул (МВ) (рис. 8а) и ПФ грам-положительных бактерий (электронноплотные толстостенные) (рис. 8а), автолизированные клетки (А), а также прорастающая ПФ с частично разрушенной оболочкой (рис. 8б). Другой морфотип (Г–II) представлен очень мелкими грам-трицательными бактериями, растущими микроколониально (рис. 8а, справа). Также обнаружены необычные грамтрицательные мелкие клетки (0.1–0.5 мкм) III морфотипа, окруженные сформированной полисахаридной капсулой (рис. 8в), растущие микроколониально, где наряду с вегетирующими клетками присутствуют ПФ с утолщенной клеточной оболочкой и тороидальными структурами биокристаллического нуклеоида (рис. 8в).

Образец № 3, взятый с лопасти винта ванны Морриса в цехе дезинфекции туш, представлен скоплениями органического материала, среди которых доминировали жировые капли, отдельные

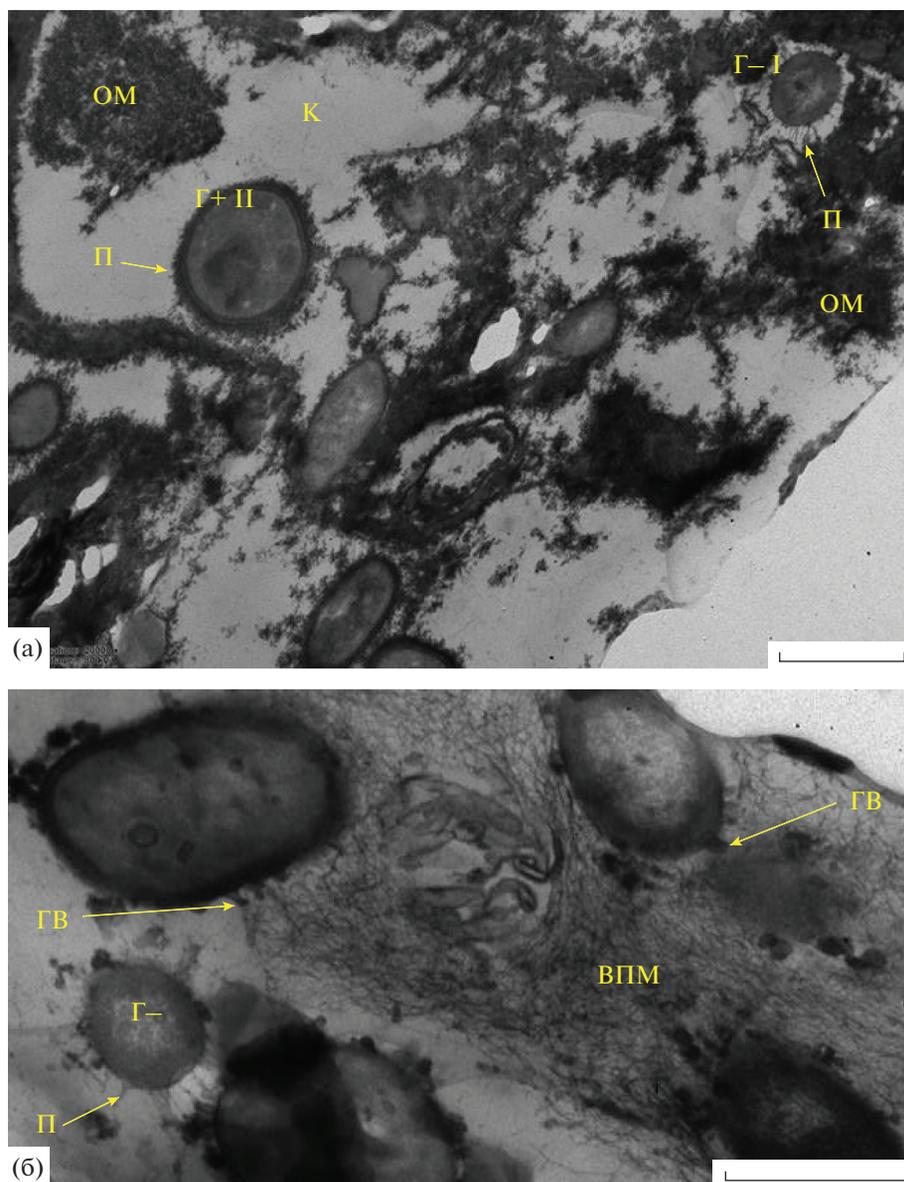


Рис. 5. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца № 2, взятого со стенки трубы раковины цеха обвалки и жиловки завод № 2: а – клетки Γ- типа (Γ- I) с пиями (Π) и Γ+ типа (Γ+ Π) с короткими пиями, органический материал (ОМ); б – сформированный внеклеточный полимерный матрикс (ВПМ) и клетки с пиями (Π) и грибовидными выростами (ГВ).

бактериальные клетки встречались крайне редко и выглядели нежизнеспособными. Биопленки как таковой нет.

Образец № 4 отобран из трапа на полу под ванной Морриса. Биопленка не развита, визуализируются органические остатки, капли жира, редко встречаются старые бактериальные клетки нескольких морфотипов, по-видимому, занесенные (рис. 9а, 9в). Обнаружены L-формы, окруженные только цитоплазматической мембраной (рис. 9в).

Образец № 5 отобран с нижней стороны мостков у ванны Морриса – еще одной нетривиальной точки отбора. Образец представлен старой БП, со-

держашей старые вегетативные клетки с включениями ПГА (рис. 10а, 10б) нескольких морфотипов: овоидные крупные клетки грамположительного типа (рис. 10а), растущие часто в общих капсулах (рис. 10в), и длинные палочки (рис. 10а). Присутствует много автолизированных клеток и покоящихся форм нескольких морфотипов, различающихся структурной организацией оболочек (рис. 10б).

Образец № 6 отобран с потолка над ванной Морриса, и это третья точка нетрадиционного места отбора. В нем обнаружена старая, вероятно, функционально неактивная БП. Образец вклю-

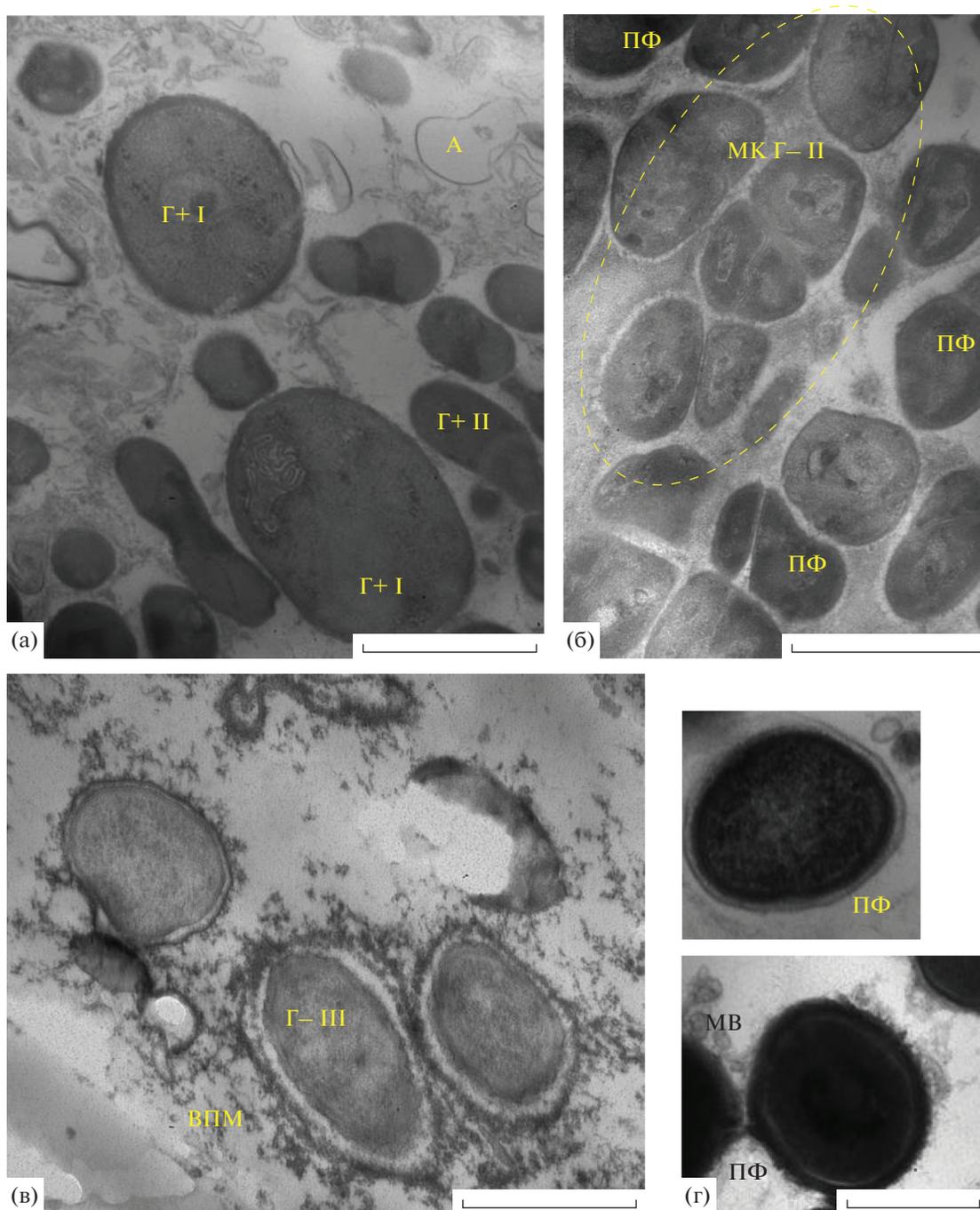


Рис. 6. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого со стенки канализационного люка цеха разделки завод № 2: а – клетки $\Gamma+I$ и $\Gamma+II$ морфотипов; б – микроколония (МК) клеток $\Gamma+II$ (обведено пунктиром); в – $\Gamma-$ клетки III морфотипа, матрикс (ВПМ); г – ПФ двух морфотипов. МВ – мембранные везикулы.

чает области с гетерогенным по окрашиванию рутениевым красным матриксом, редкими клетками и участки с кальцинированной структурой, без признаков БП. Обнаружены толстостенные ПФ, с компактизованным нуклеоидом, сгруппированные в цепочку в едином чехле.

Образец № 7 отобран со стены в туннеле охлаждения (рис. 11) при минусовой температуре и представлял собой замороженную массу. К удивлению, в нем обнаружена слоистая БП, включающая области типичной биопленки с матриксом, характеризующиеся обилием грамтрицательных

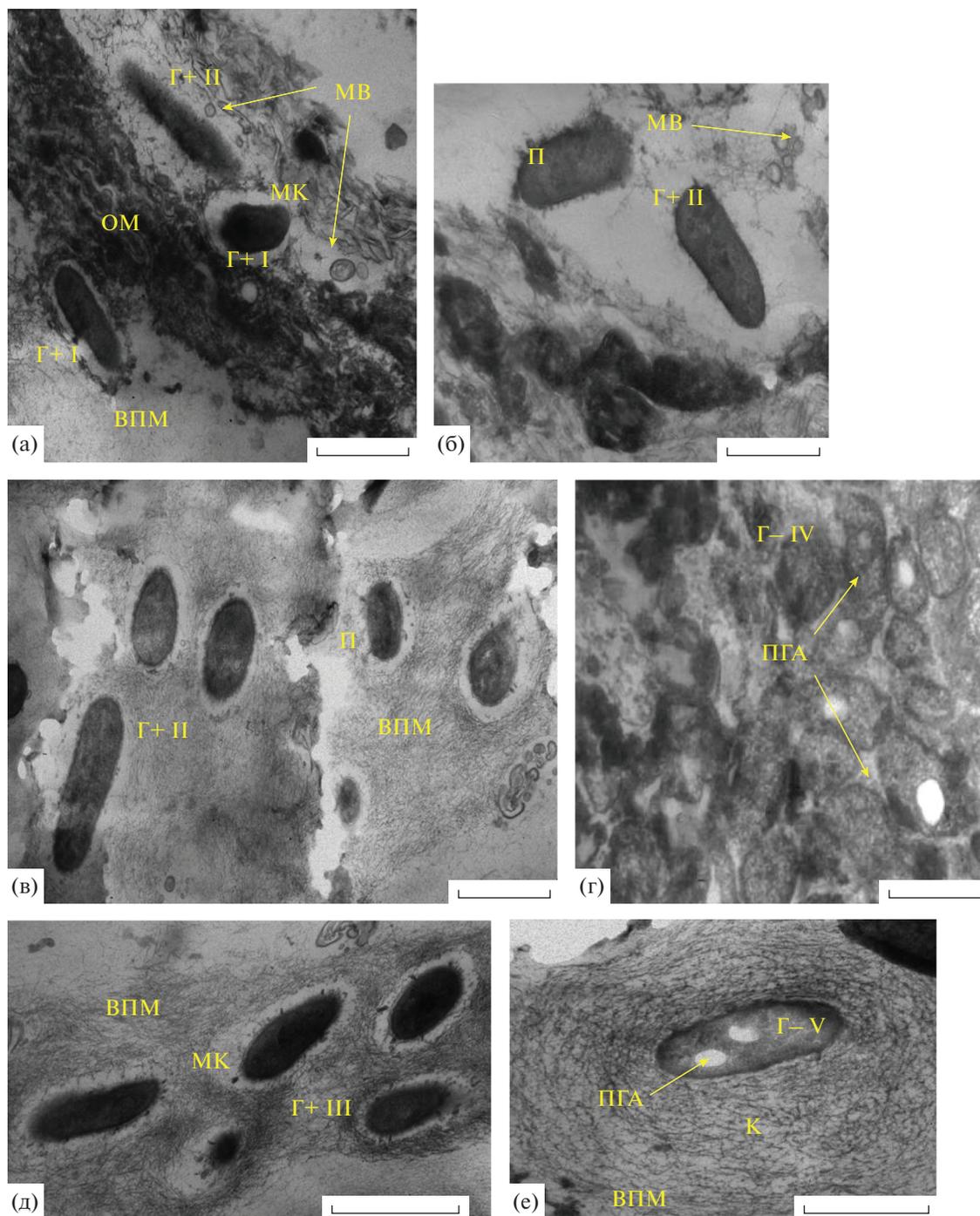


Рис. 7. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого со стенки чана для мытья полов цеха разделки завод № 2: а – двуслойная БП, органический материал (ОМ), клетки Г+ I и II морфотипов, мембранные везикулы (МВ); б – микроколония Г+ клеток II морфотипа; в – слоистая БП, клетки II морфотипа с пиллями (П) в непалисахаридных микрокапсулах, матрикс (ВПМ); г – микроколония старых грамтрицательных клеток IV морфотипа с ПГА; д – микроколония клеток грамположительного типа III морфотипа с микрокапсулами (МК) непалисахаридной природы, в полисахаридном волокнистом матриксе (ВПМ); е – старая клетка грамтрицательного типа V с ПГА с волокнистой капсулой (К) полисахаридной природы. Масштабная линейка – 1 мкм.

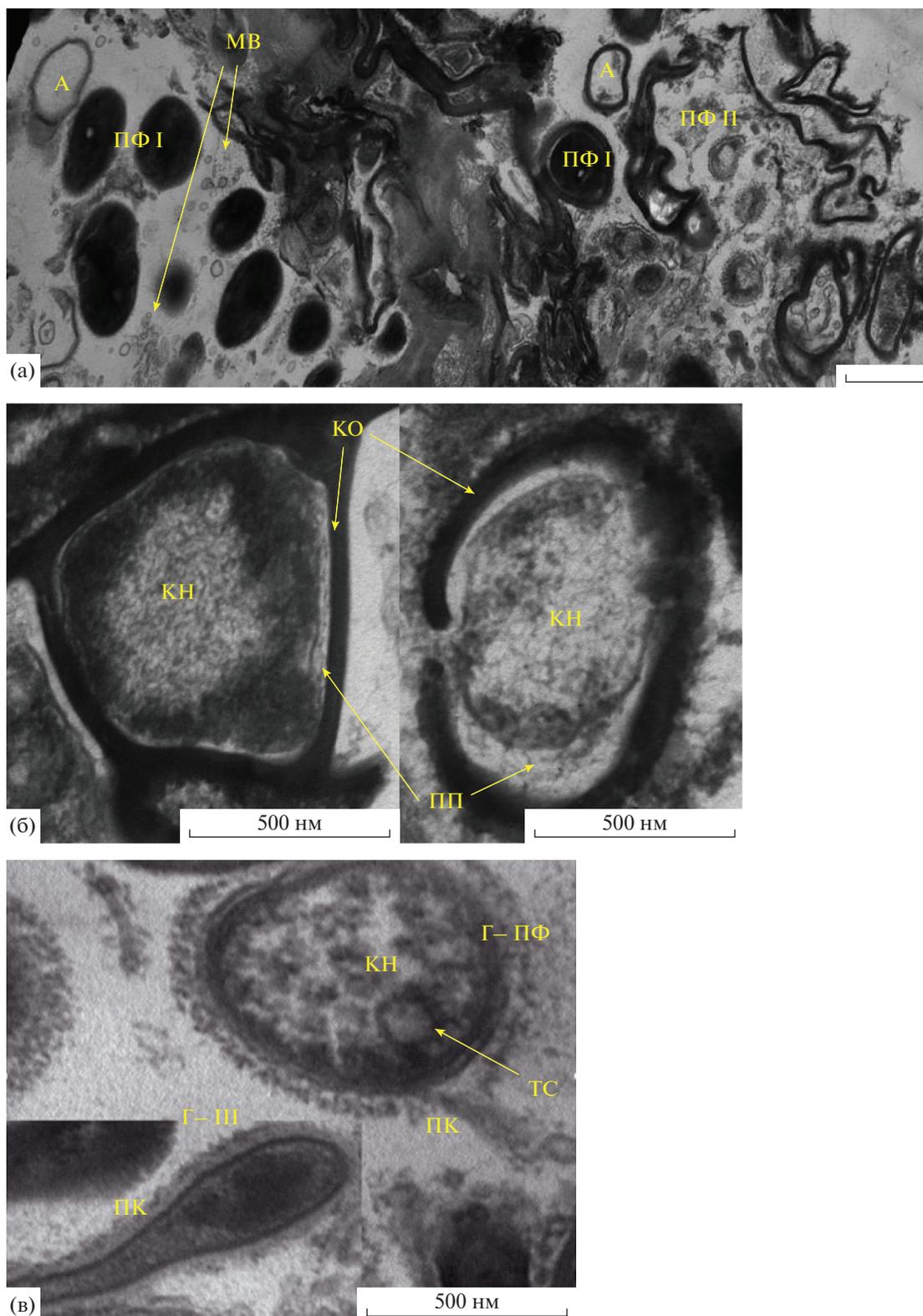


Рис. 8. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого с потолка цеха потрошения завод № 3: а – старая БП, микроколонии клеток I и II морфотипов, представленные покоящимися формами (ПФ); б – покоящиеся формы с кристаллизованным нуклеоидом (КН), слева – интактная, справа – прорастающая ПФ, хорошо видна периплазма (ПП); в – ПФ клеток грамотрицательного типа (Г–ПФ) с биокристаллизованным нуклеоидом (БН) с тороидальными структурами (ТС), окруженные структурированной полисахаридной капсулой (ПК), грамотрицательные мелкие клетки Ш морфотипа (Г–Ш), окруженные сформированной полисахаридной капсулой (ПК). Масштабная линейка – 1 мкм (а) или 500 нм (б и в).

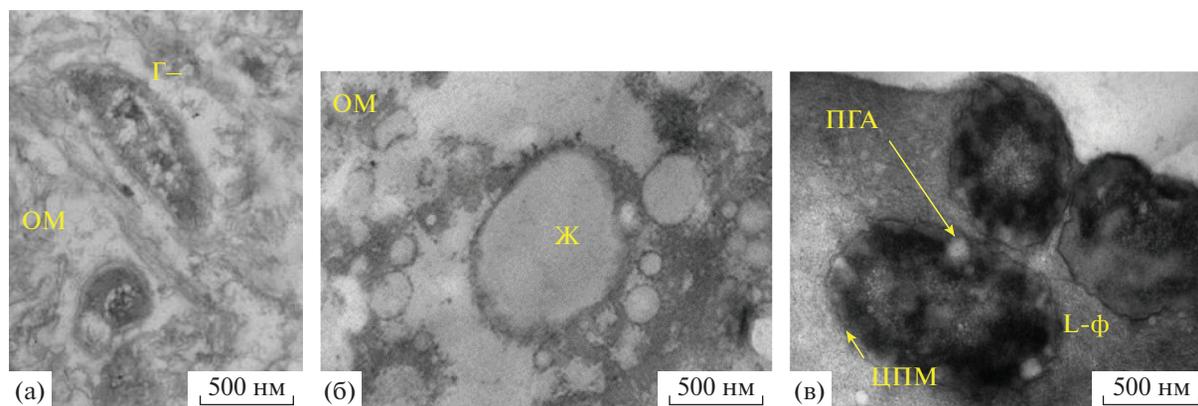


Рис. 9. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого со стенки трапа под ванной Морриса цеха дезинфекции тушек завод № 3: а – единичная клетка грамотрицательного типа (Г–) в остатках органического материала (ОМ); б – капли жира (Ж); в – старые L-формы (L-ф) с включениями ПГА, окруженные цитоплазматической мембраной (ЦПМ). Масштабная линейка – 500 нм.

клеток одного морфотипа, очень старых с компактизованным нуклеоидом, комковатой текстурой цитоплазмы (рис. 11а, 11б), и области из рыхлого органического материала, неравномерно окрашиваемого рутениевым красным. Очевидно, что БП сформирована психрофильным микроорганизмом.

Образец № 8, отобранный с колес тележек в начале цеха готовой продукции (рис. 12), был представлен БП с развитым, неоднородно окрашиваемым рутением рыхлым органическим материалом. Бактериальная компонента была представлена клетками различного строения клеточной стенки морфотипов и с пиллями. Клетки, как правило, были окружены капсульным материалом непалисахаридной природы.

Образец № 9, отобранный также с колес тележек в цехе готовой продукции, но в зоне упаковки продукции, был представлен зрелой БП, с хорошо развитым гранулярным матриксом (рис. 13а), включающим клетки с короткими пиллями. Покоящиеся формы разной степени созревания с утолщенной клеточной оболочкой и биокристаллизованным нуклеоидом (рис. 13б) окружены капсулой непалисахаридной природы, отграниченной от ВПМ слоем, образованным гранулярными полисахаридными частицами. Биопленка, по-видимому, старая и мало функциональная. В целом, биопленки на колесах тележек были похожими.

ОБСУЖДЕНИЕ

Биопленочная микробная контаминация созданной человеком экониши, а именно, помещений, оборудования и продукции пищевых производств, представляет серьезную опасность как причина порчи продуктов (Yuan et al., 2020a), а также как резервуар для сохранения и распро-

странения патогенных бактерий (Alvarez-Ordóñez et al., 2019). Основной причиной постоянной биопленочной контаминации является высокая устойчивость БП к дезинфицирующим средствам (Yuan et al., 2018, 2020b). БП в этой нише обладают многими отличительными свойствами, и одним из них является способность к формированию и росту в присутствии высоких концентраций бактерицидных дезинфектантов (что обусловлено выработкой принципиально новых механизмов резистентности, требующих специальных подходов для их детального изучения). Полное избавление от таких БП практически недостижимо, но можно снизить их количество путем оптимизации эффективности санобработки. Для этого нужна как можно более объективная информация о микробиологическом состоянии на пищевых производствах: уровне распространения БП, биоразнообразии биопленочных микроорганизмов, физиологической активности БП, – с одной стороны, как причины биологической порчи продукции, а с другой – как резервуара для микробной контаминации помещений и пищевых продуктов. Эти результаты расширяют и углубляют представления об адаптационной способности МБ и возможностях их распространения в новых местах обитания, связанных, в частности, с производственной деятельностью человека. С этих позиций и была проведена сравнительная оценка биопленочной микробиологической контаминации помещений и оборудования на трех мясоперерабатывающих предприятиях, отличающихся перерабатываемым сырьем.

Отличительными чертами сравнительного исследования были: а) расширение спектра точек отбора образцов БП, включая нетривиальные и не подверженные ежедневной санитарной обработке места: потолки, туннель охлаждения с температурой $\approx 0^\circ\text{C}$, чан для мытья полов, где всегда растворяют дезинфектанты, нижняя сторона

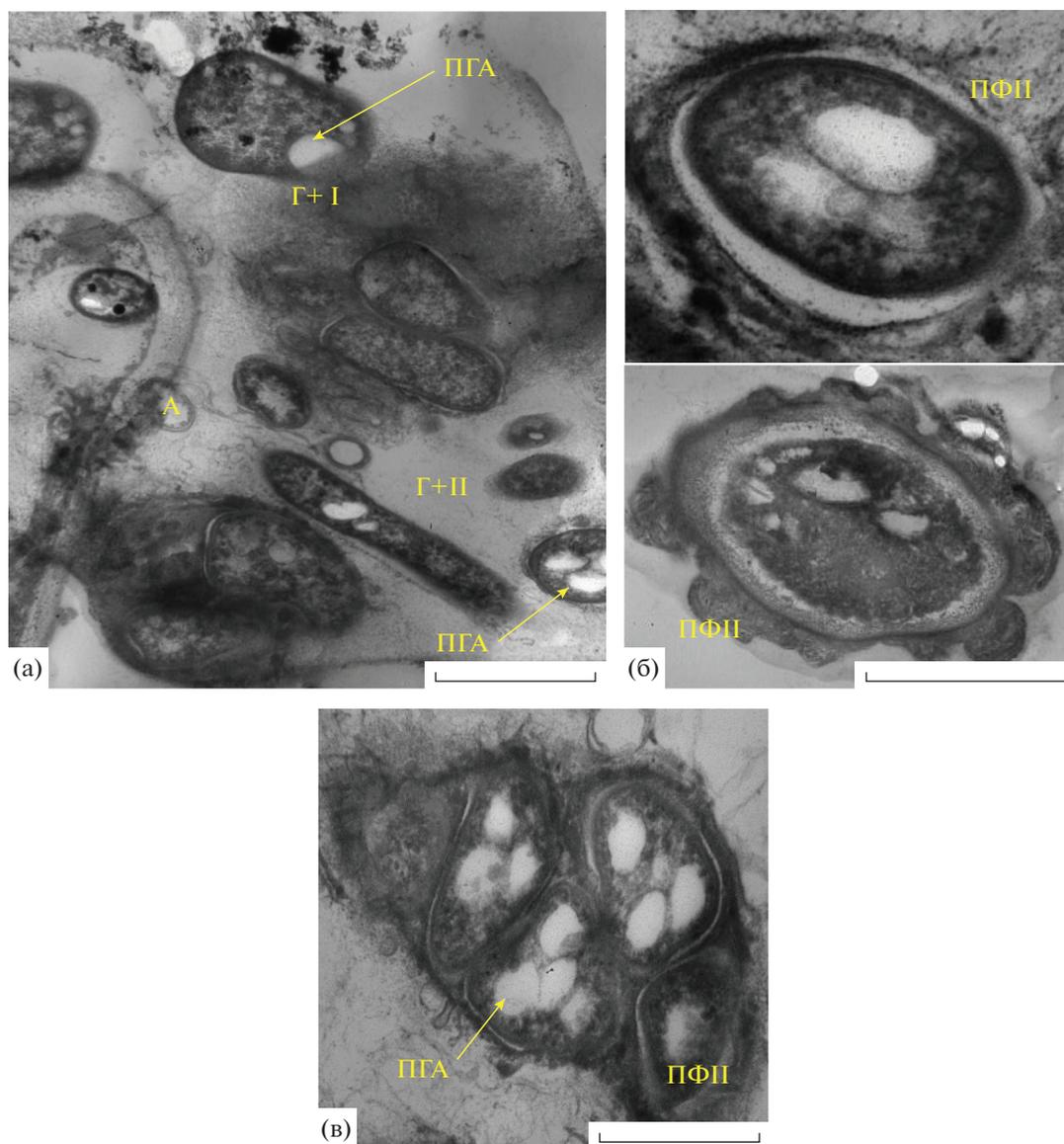


Рис. 10. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого с нижней стороны мостков, ведущих к ванне Морриса цеха дезинфекции тушек завод № 3: а – старые клетки грамположительного типа двух морфотипов (Г+ I и II); б – ПФ разных типов, различающиеся структурой клеточных оболочек; в – старые клетки с ПГА в общей полисахаридной капсуле и покоящаяся клетка II типа. А – автолизированные клетки. Масштабная линейка – 1 мкм.

мостков, колеса тележек, ролики транспортеров; б) микроскопическая оценка (трансмиссионная электронная микроскопия) БП, позволяющая оценить степень их зрелости и функциональной активности по таким показателям, как развитость и природа матрикса, разнообразие морфотипов бактерий, их возрастная гетерогенность.

Во всех отобранных образцах БП с завода № 2 (перерабатывающего смешанное сырье – свинина, говядина) были обнаружены молодые или зрелые БП с развивающимся или хорошо развитым матриксом, разнообразием морфотипов бактерий (рис. 4–7), среди которых часто встречались клетки с пиями разной длины (рис. 5а, 5б), служащими,

как правило, для прикрепления к поверхностям и другим клеткам. Образование структур с контактной функцией характерно для биопленочных бактерий и было описано ранее (Smirnova et al., 2010; Charman, 2015). Неожиданным было обнаружение в чане для мытья полов, где постоянно присутствуют антисептики, зрелой БП (рис. 7), сформированной клетками одного морфотипа, который, по-видимому, селекционировался в условиях постоянного давления дезинфектанта. Это первое сообщение о селекции фенотипа пищевого контаминанта, способного к размножению и биопленкообразованию. Важно понять, какого характера эта устойчивость – фенотипи-

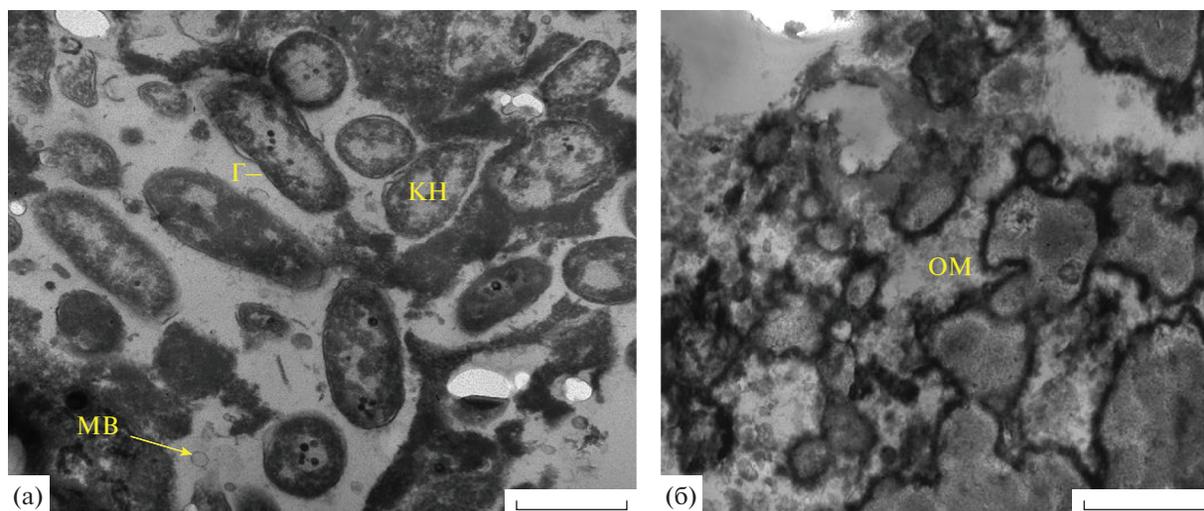


Рис. 11. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого со стенки туннеля охлаждения завод № 3 ($\sim 0^\circ\text{C}$): а – моновицевая пленка грамтрицательных бактерий, старых с компактизованным нуклеоидом (КН) и мембранными везикулами (МВ); б – зона рыхлого органического материал (ОМ). Масштабная линейка – 1 мкм.

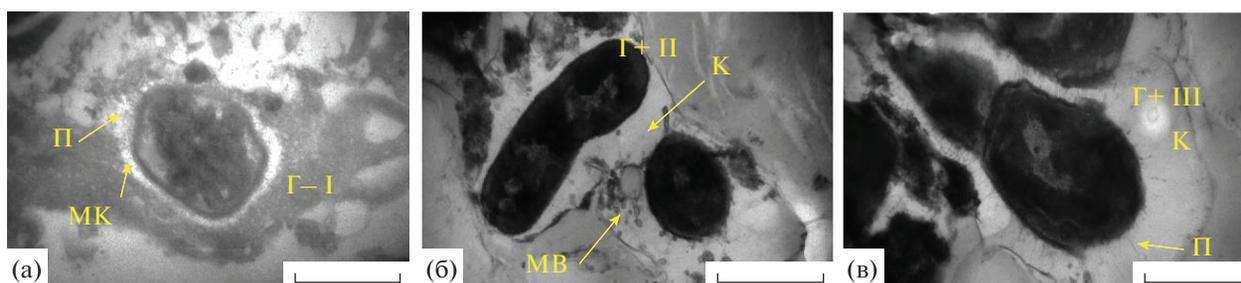


Рис. 12. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого с колес тележки № 1 (начало цеха упаковки готовой продукции завод № 3). Отдельные клетки трех морфотипов (Г– I, Г+ II, Г– III): а – клетки Г– I с короткими пилиями (П) в непалисахаридной микрокапсуле (МК); б – клетки Г+ II в непалисахаридной капсуле (К) с мембранными везикулами; в – клетки Г+ III с длинными пилиями. Масштабная линейка – 1 мкм.

ческого или генотипического (van den Bergh et al., 2016; Levin-Reisman et al., 2017), так как в последнем случае возможен горизонтальный перенос детерминант устойчивости к другим видам пищевых контаминантов, и это будет влиять на эффективность применяемых дезинфектантов.

Микроскопический анализ бактериальной контаминации на заводе № 3 позволил заключить, что в таких тривиальных местах отбора, как сливные трапы или сливы под раковинами, биопленки не были обнаружены; отобранные образцы представлены органическим материалом с очень редким заносом клеток. Отсутствие БП в трапах канализационной системы свидетельствует о хорошем санитарном состоянии предприятия. В образцах, взятых из нетрадиционных мест отбора (нижняя часть мостков у ванны Морриса (рис. 10) или потолок в цехе потрошения (рис. 8), где имеют место обилие конденсата и затруднена

дезинфекция), были обнаружены старые БП, бактериальное население которых представлено старыми клетками с включениями ПГА или толстостенными покоящимися клетками разных морфотипов. Это предполагает низкую физиологическую активность таких БП, но не снимает вопрос о них как резервуарах биопленочной контаминирующей микрофлоры. Также важным было обнаружение моновицевой (по морфотипу клеток) БП в образце, взятом со стены тоннеля охлаждения с температурой $\sim 0^\circ\text{C}$ (рис. 11). Это ставит вопрос о биопленочном развитии психрофильной пищевой микробиоты, среди которой встречаются патогены, и необходимости усиления санитарной обработки на этих участках и их включении в перечень мест систематического микробиологического анализа.

Еще одним нетрадиционным местом отбора образцов были потолки, достаточно редко подвер-

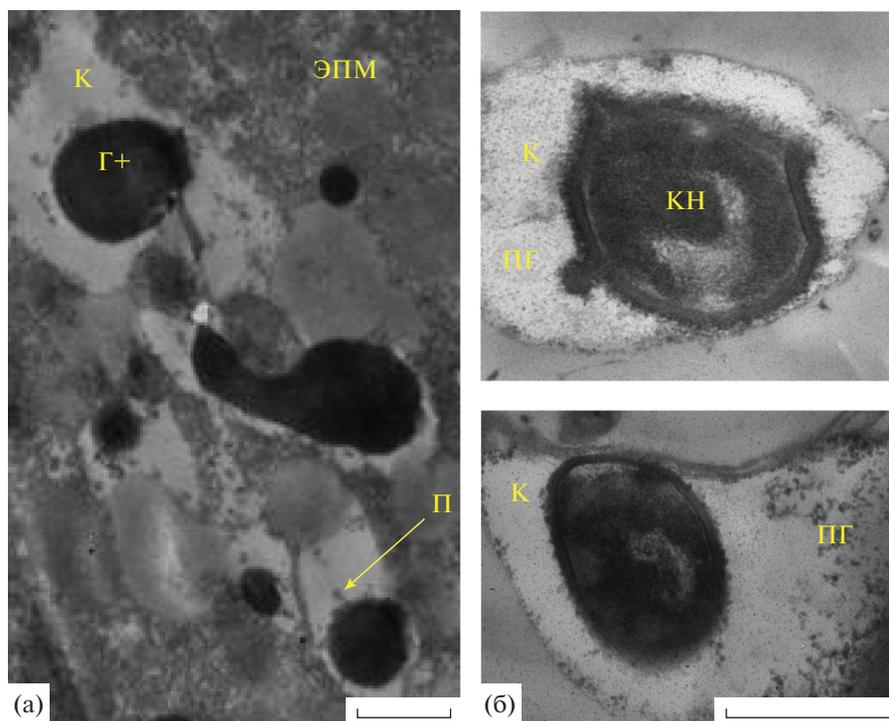


Рис. 13. Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца, взятого с колес тележки № 2 (линия упаковки цеха упаковки завод № 3): а – старая БП, с плотным матриксом (ЭПМ) полисахаринной природы, грамположительные клетки (Г+) с короткими пилоями (П), некоторые окружены капсулой неполисахаридной природы (К); б – ПФ разных морфотипов, различающихся толщиной клеточной оболочки, с компактизованным нуклеоидом (КН), окруженные двухкомпонентной капсулой из неполисахаридного материала (К) и полисахаридных гранул (ПГ). Масштабная линейка – 1 мкм.

гаемые дезинфекции (рис. 8). В них были визуализированы старые БП, включающие, в основном, покоящиеся формы разных морфотипов. Отметим, что ПФ были представлены только цистоподобными клетками, споры нигде не обнаруживались по причине или отсутствия в БП спорообразующих бактерий, или репрессии процессов спорообразования.

Таким образом, напрашивается вывод о необходимости пересмотра практики санитарного контроля (отбора проб для микробиологического анализа), практики дезинфекции – анализа эффективности и периодической смене дезинфектантов.

В половине образцов, отобранных на заводе № 1 (перерабатывающем свинину), сформировавшихся БП не было выявлено, что свидетельствует о хорошем санитарном состоянии предприятия. Зрелая поливидовая БП была обнаружена в образце с нижней поверхности спуска ящиков с мясом (рис. 1). Функциональная активность этой БП подтверждается обилием МВ. В этой БП обнаружены бактерии со множественными пилоями. Еще одна БП выявлена в образце, взятом с колес тележки Рохли в сырьевом цехе (рис. 2). БП сформирована клетками двух морфотипов, основной

из которых представлен палочками с включениями ПГА, то есть старыми клетками с низкой физиологической активностью, ПФ и автолизированными клетками. В нескольких образцах, взятых с потолка, БП не были обнаружены. Однако в центре потолка в цехе – накопителе разделанного сырья в месте возможной протечки (“сталактит”) была обнаружена хорошо сформированная поливидовая БП (рис. 3) с микробным населением различного возраста, вегетативными и автолизированными клетками и ПФ. Эта БП может быть источником контаминации, в связи с труднодоступностью для санобработки этого нетривиального места отбора, а также может вызывать биокоррозию материала в области развития БП.

Поливидовый состав биопленок на пищевых предприятиях (Burmølle et al., 2014; Yuan et al., 2019) и их фенотипическая гетерогенность описаны ранее (Sadiq et al., 2017). Полученные нами результаты и расширяют представление о гетерогенности биопленок также и по физиологическому состоянию, и по их структуре.

Общий сравнительный микроскопический анализ образцов биопленочных обрастаний поверхностей внутренних помещений, сливных труб и оборудования, взятых с общепринятых мест от-

бора и с нетривиальных точек отбора, позволил сделать следующие выводы:

а) отсутствие БП в местах традиционного отбора образцов (столы, трапы, сливные трубы) может свидетельствовать об эффективности санобработки, а наличие БП – напротив, о недостатках санитарных мероприятий по выбору мест обработки, по временному алгоритму санитарной обработки, возможно, по выбору дезинфектантов;

б) полноценные БП обнаружены в таких нетривиальных местах, как чан для мытья полов, стены тоннеля охлаждения, потолок, нижняя сторона мостков, колеса тележек, что указывает на необходимость расширения точек отбора образцов для контроля и санобработки и этих мест пищевых предприятий;

в) обнаружение сформированных БП в чане для мытья полов и на стене тоннеля охлаждения свидетельствует о 1) селекции бактериального фенотипа, устойчивого к данному дезинфектанту, и необходимости периодической замены последнего, и 2) о развитии психрофильных бактерий, биопленки которых могут служить резервуаром для контаминации пищевых продуктов, в том числе патогенами-психрофилами, что представляет определенную опасность;

г) микроскопический анализ пищевых БП позволил получить новую информацию о морфотипах выживания бактерий в БП. В различных образцах, таких как чан для мытья полов (завод № 2; рис. 7), потолок (завод № 3; рис. 8), потолок (завод № 1; рис. 3), взятых из нетривиальных точек отбора на всех трех МПЗ, были обнаружены старые клетки, созревающие в ПФ, окруженные мощными полисахаридными капсулами различного строения (рис. 3ж; 7е и 8д). Так как таких “капсулированных” старых клеток, созревающих в ПФ, ранее не наблюдали, можно предположить, что это своеобразный морфотип покоя у некоторых биопленочных бактерий, наряду с биопленочными ПФ с известной структурной организацией;

д) только анализ с применением трансмиссионной электронной микроскопии может предоставить информацию о физиологическом состоянии БП и дифференцировать молодые растущие БП от старых и “законсервированных” БП. Эти характеристики “физиологической активности” или “законсервированности” могут быть определены достаточно условно, но они дают информацию об адаптационных способностях МБ, а также об эффективности санитарных мер на пищевом предприятии или необходимости их усиления.

Таким образом, примененный электронно-микроскопический анализ дает важную информацию о наличии и состоянии биопленок в новой антропогенной нише (пищевых производствах), свидетельствует о разнообразии их состава и архитектуры и может быть рекомендован для сани-

тарно-эпидемиологического мониторинга пищевых предприятий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (грант № 075-15-2020-775, по приоритетным направлениям научно-технологического развития) и, частично, за счет средств Минобрнауки РФ для ФИЦ Биотехнологии РАН (работа Е.Н. Тихоновой, Г.И. Эль-Регистан, М.В. Журиной, В.К. Плакунова, Е.В. Дёмкиной).

БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования “Коллекция микроорганизмов UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Журина М.В., Кострикина Н.А., Паршина Е.А., Стрелкова Е.А., Юсипович А.И., Максимов Г.В., Плакунов В.К. Визуализация внеклеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 502–509.
- Zhurina M.V., Kostrikina N.A., Parshina E.Yu., Strelkova E.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Plakunov V.K. Visualization of the extracellular polymeric matrix of *Chromobacterium violaceum* biofilms by microscopic methods // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 517–524.
- Журина М.В., Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Роль внеклеточного полимерного матрикса в защитном эффекте при действии антибиотика азитромицина на *Chromobacterium violaceum* // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 497–500.
- Zhurina M.V., Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Role of the extracellular polymer matrix in azithromycin protection of *Chromobacterium violaceum* biofilms // Microbiology. 2019. V. 88. P. 505–508.
- Лойко Н.Г., Кряжевских Н.А., Сузина Н.Е., Демкина Е.В., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Покоящиеся формы *Sinorhizobium meliloti* // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 465–476.
- Loiko N.G., Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Kozlova A.N., Galchenko V.F., El'-Registan G.I., Suzina N.E., Muratova A.Y., Turkovskaya O.V. Resting forms of *Sinorhizobium meliloti* // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 472–482.

- Лойко Н.Г., Сузина Н.Е., Соина В.С., Смирнова Т.А., Орлова М.В., Азизбеян Р.Р., Синец Д.О., Терешкина К.Б., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Биокристаллические структуры в стационарных и покоящихся клетках прокариот // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 703–719.
- Loiko N.G., Nikolaev Y.A., El'-Registan G.I., Suzina N.E., Soina V.S., Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Azizbekyan R.R., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Krupyanskiy Y.F. Biocrystalline structures in the nucleoids of the stationary and dormant prokaryotic cells // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 714–727.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Погорелова А.Ю., Антонюк Л.П., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 42–52.
- Mulyukin A.L., Pogorelova A.Yu., El-Registan G.I., Suzina N.E., Duda V.I., Antonyuk L.P. Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 33–41.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 15–27.
- Mulyukin A.L., Suzina N.E., Mel'nikov V.G., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 149–159.
- Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты (обзор) // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 402–420.
- Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. Controlling of microbial biofilms formation: anti- and probiofilm agents // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 423–438.
- Плакунов В.К., Николаев Ю.А., Ганнесен А.В., Чемаева Д.С., Журина М.В. Новый подход к выявлению защитной роли *Escherichia coli* в отношении грамположительных бактерий при действии антибиотиков на бинарные биопленки // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 288–296.
- Plakunov V.K., Nikolaev Yu.A., Gannesen A.V., Chemaeva D.S., Zhurina M.V. A new approach to detection of the protective effect of *Escherichia coli* on gram-positive bacteria in binary biofilms in the presence of antibiotics // Microbiology. 2019. V. 88. P. 275–281.
- Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Егозарьян Н.С., Поливцева В.Н., Мулюкин А.Л., Егорова Д.О., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Особенности структурно-функциональных перестроек клеток актинобактерий *Microbacterium foliorum* BN52 при переходе от вегетативного роста в состояние покоя и при прорастании покоящихся форм // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 463–475.
- Solyanikova I.P., Suzina N.E., Egozarjan N.S., Polivtseva V.N., Mulyukin A.L., Egorova D.O., El-Registan G.I., Golovleva L.A. Structural and functional rearrangements in the cells of actinobacteria *Microbacterium foliorum* BN52 during transition from vegetative growth to a dormant state and during germination of dormant forms // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 476–486.
- Alvarez-Ordóñez A.L.M., Coughlan R.B., Cotter P.D. Biofilms in food processing environments: Challenges and opportunities // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2019. V. 10. P. 173–195.
- Bergh van den B., Michiels J.E., Wenseleers T., Windels E.M., Boer P.V., Kestemont D., De Meester L., Verstrepen K.J., Verstraeten N., Fauvart M., Michiels J. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence // Nat. Microbiol. 2016. V. 1. P. 16020.
- Burmölle M., Ren D., Bjarnsholt T., Sørensen S.J. Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? // Trends Microbiol. 2014. V. 22. P. 84–91.
- Chapman J. Microstructures of biofilm // Biofilm and materials science / Eds. Kanematsu H., Barry D.M. Springer Int. Publ., 2015. P. 35–43.
- Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life // Nature Revs. Microbiol. 2016. V. 14. P. 563–575.
- Galié S., García-Gutiérrez C., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 898.
- González-Rivas F., Ripolles-Avila C., Fontecha-Umaña F., Ríos-Castillo A.G., Rodríguez-Jerez J.J. Biofilms in the spotlight: detection, quantification and removal methods // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2018. V. 217. P. 1261–1276.
- Levin-Reisman I., Ronin I., Gefen O., Braniss I., Shoshani N., Balaban N.Q. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance // Science. 2017. V. 355. P. 826–830.
- Muhammad M.H., Idris A.L., Fan X., Guo Y., Yu Y., Jin X., Qiu J., Guan X., Huang T. Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 928.
- Nagakubo T., Nomura N., Toyofuku M. Cracking open bacterial membrane vesicles // Front. Microbiol. 2020. V. 10. P. 3026.
- Sadiq F.A., Flint S., Li Y.J., Ou K., Yuan L., He G.Q. Phenotypic and genetic heterogeneity within biofilms with particular emphasis on persistence and antimicrobial tolerance // Future Microbiol. V. 12. P. 1087–1107.
- Satpathy S., Sen S.K., Pattanaik S., Raut S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination // Biocat. Agric. Biotechnol. 2016. V. 7. P. 56–66.
- Sharahi J.Y., Azimi T., Shariati A., Safari H., Tehrani M.K., Hashemi A. Advanced strategies for combating bacterial biofilms // J. Cell Physiol. 2019. <https://doi.org/10.1002/jcp.28225>
- Schooling S.R., Beveridge T.J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms // J. Bacteriol. 2006. V. 88. P. 5945–5957.
- Smirnova T.A., Didenko L.V., Tiganova I.G., Andreevskaya S.G., Alekseeva N.V., Stepanova T.V., Romanova Yu.M. Study of the structures of biofilms formed by *Salmonella typhimurium*

um bacteria on abiotic surfaces by the methods of light and transmission electron microscopy // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 706–711.

Srey S., Jahid I.K., Ha S.D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern // *Food Control.* 2013. V. 31. P. 572–585.

Stewart P., Franklin M. Physiological heterogeneity in biofilms // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 199–210.

Wimpenny J., Manz W., Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms // *FEMS Microbiol. Rev.* 2000. V. 24. P. 661–671.

Yuan L., Sadiq F.A., Wang N., Yang Z., He G. Recent advances in understanding the control of disinfectant-resis-

tant biofilms by hurdle technology in the food industry // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2021. V. 61. P. 3876–3891.

Yuan L., Hansen M.F., Røder H.L., Wang N., Burmølle M., He G. Mixed-species biofilms in the food industry: current knowledge and novel control strategies // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2020. V. 60. P. 2277–2293.

Yuan L., Burmølle M., Sadiq F.A., Wang N., He G. Interspecies variation in biofilm-forming capacity of psychrotrophic bacterial isolates from Chinese raw milk // *Food Control.* 2018. V. 91. P. 47–57.

Yuan L., Wang N., Sadiq F.A., He G. Interspecies interactions in dual-species biofilms formed by psychrotrophic bacteria and the tolerance of sessile communities to disinfectants // *J. Food Protect.* 2020b. V. 83. P. 951–958.

Comparative Investigation of the Composition and Structure of Microbial Biofilms Retrieved at Meat-Processing Facilities Using Different Basic Materials

Yu. A. Nikolaev^{1, 2, *}, E. N. Tikhonova², G. I. El'-Registan², M. V. Zhurina², V. K. Plakunov², E. V. Demkina², E. V. Zaiko¹, D. S. Bataeva¹, N. A. Nasyrov¹, and Yu. K. Yushina¹

¹*Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109316 Russia*

²*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

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

Received May 12, 2022; revised May 25, 2022; accepted May 26.05.2022 г.

Abstract—Localization and structural organization of microbial biofilms developing in anthropogenic ecological niches of meat-processing plants using different basic materials (poultry, pork, or mixed materials) was investigated. Mature biofilms were revealed both at the sites subject to routine sanitary control (equipment, sewage traps, and walls) and at other locations (ceilings, reverse (lower) side of bridges, vehicle wheels, and tunnel walls at subzero temperatures), indicating high adaptability of microbial communities. This finding indicates the urgency of modification (extension of the list of cleansing sites and of the relevant protocols). The information on the composition and diversity of microbial biofilms in this ecotope, as well as on the physiological state of component microorganisms (active, dormant, and lysing cells, etc.) was obtained using transmission electron microscopy. The morphotypes facilitating bacterial survival in these biofilms are described (old cells and several types of specialized dormant forms).

Keywords: biofilms, bacteria, meat-processing facilities, biofilm structure, biofilm localization, transmission electron microscopy

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯМИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО, АККУМУЛИРУЮЩЕЕ ФОСФАТ
В ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ С ДОМИНИРОВАНИЕМ
“*CANDIDATUS ACCUMULIBACTER*”

© 2022 г. А. В. Пелевина^а*, Ю. Ю. Берестовская^а, В. А. Грачёв^а, А. Г. Дорофеев^а,
О. В. Слатинская^б, Г. В. Максимов^б, А. Ю. Каллистова^а, Ю. А. Николаев^а, Е. В. Груздев^с,
Н. В. Равин^с, Н. В. Пименов^а, А. В. Марданов^с

^аФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, 119071 Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119892 Россия

^сФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Москва, 119071 Россия

*e-mail: annie.pelevina@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 18.04.2022 г.

Принята к публикации 19.04.2022 г.

В лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия через 150 сут культивирования было получено микробное сообщество, обогащенное фосфат-аккумулирующими организмами (ФАО). Анализ динамики фосфатов в среде и результаты спектроскопии комбинационного рассеяния света микробных клеток свидетельствовали о типичном для ФАО цикле потребления и высвобождения фосфатов в аэробный и анаэробный периоды культивирования соответственно. Максимальное содержание внутриклеточного фосфора составило $16.5 \pm 0.15\%$ от сухой массы беззольного вещества. Молекулярно-генетическим анализом и методом FISH выявлено таксономическое разнообразие микробного сообщества, в котором основными представителями ФАО были бактерии группы “*Ca. Accumulibacter*”.

Ключевые слова: биологическое удаление фосфора, фосфат-аккумулирующие бактерии (ФАО), очистка воды, “*Candidatus Accumulibacter*”

DOI: 10.31857/S0026365622100275

Наиболее перспективные современные технологии очистки сточных вод от фосфора основаны на биологической очистке с использованием активного ила, формирующегося в биореакторах непрерывного или последовательно-периодического действия (sequencing batch reactor, SBR). Способность к удалению фосфора обусловлена функционированием фосфат-аккумулирующих организмов (ФАО) – физиологической группой микроорганизмов, способных к циклическому поглощению–высвобождению фосфатов и накоплению фосфора в виде полифосфатов при чередовании анаэробной и аэробной фаз культивирования. Динамика формирования фосфат-аккумулирующего микробного сообщества, его состав и пространственная организация во многом определяются режимами работы реакторов (Weissbrodt et al., 2013; Gómez-Basurto et al., 2019; Zhou et al., 2019). Исследованию ФАО, разработке и оптимизации режимов работы биореакторов, обеспечивающих эффективную очистку сточных вод от фосфора, посвящено большое количество работ (Izadi et al., 2020; Roy et al., 2021; Rajesh Vanu et al., 2021). В

России такие исследования были начаты недавно (Пелевина и соавт., 2021).

В задачу наших исследований входило получение обогащенного ФАО микробного сообщества с высокой плотностью биомассы, исследование динамики клеточных фосфатов с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопия), определение таксономического состава сообщества и доминирующих представителей ФАО.

Культивирование микробного сообщества проводили в лабораторном реакторе (SBR) с рабочим объемом 2 л. Основные характеристики биореактора описаны ранее (Пелевина и соавт., 2021). В настоящей работе режим SBR включал фазу отстаивания, что обеспечило получение высокой плотности биомассы. Каждый SBR-цикл включал пять последовательных фаз: 1) подача среды в анаэробных условиях – 30 мин; 2) анаэробная фаза потребления субстрата – 2 ч 25 мин; 3) аэробная фаза роста биомассы – 2 ч 30 мин; 4) фаза отстаивания – 30 мин; 5) слив надосадоч-

ной жидкости – 5 мин. В каждом SBR-цикле проводили замену 0.8 л среды, обеспечивая гидравлическое время пребывания 15 ч. Для удаления избыточной (приросшей) биомассы, в каждом 28-ом SBR-цикле исключали фазу отстаивания, и отводили часть биомассы вместе со сливной жидкостью, поддерживая среднее время удержания биомассы 17.5 сут. Выращивание проводили при оптимальных для развития ФАО условиях: температура 18°C, pH 7.5–8.2, источник углерода и энергии – ацетат, соотношение фосфора к ацетату в среде – 0.09 моль/моль (Lopez-Vazquez et al., 2010; McMahon et al., 2010).

В работе использовали синтетическую среду следующего состава (г/л): $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.670; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.139; KH_2PO_4 – 0.109; дрожжевой экстракт – 0.009; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.150; раствор микроэлементов – 1 мл/л. Состав раствора микроэлементов (г/л): ЭДТА натрия – 10; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1.5; H_3BO_3 – 0.15; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.12; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.06; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.12; KI – 0.18; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.15. Для предотвращения образования нитратов и развития денитрифицирующих бактерий, конкурирующих с ФАО за субстрат, в среду добавляли тиомочевину до конечной концентрации 2.5 мг/л; pH поддерживали автоматическим титрованием 0.5 М раствором HCl.

Посевным материалом служил флокулированный активный ил очистных сооружений г. Москвы.

Концентрацию растворенного кислорода, ацетата, фосфат-ионов (P-PO_4^{3-}) и вес сухой биомассы (СБ) проводили, как было описано ранее (Пелевина и соавт., 2021). Зольность и концентрацию фосфора в биомассе определяли в соответствии с (Rice et al., 2017).

Морфологию клеток исследовали на микроскопе Olympus CX41 с фазовым контрастом (“Olympus”, Япония).

Фосфат-аккумулирующих представителей в составе микробного сообщества биореактора определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием меченых цианином 3 (Cy3) 16S рРНК олигонуклеотидных зондов: PAO651, специфичных к “*Ca. Accumulibacter*” (Crocetti et al., 2000). Процедуру гибридизации проводили по методике, описанной ранее (Каллистова и соавт., 2014). Клетки с зондами визуализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager M2 (“Carl Zeiss Microscopy GmbH”, Германия), оснащенного цифровой камерой 503топо и светофильтром Zeiss 43 (возбуждение 545/25 нм, эмиссия 605/70 нм). Фотографии обрабатывали с использованием программного обеспечения ZEN 2 (“Carl Zeiss Microscopy GmbH”, Германия).

Содержание и конформационное состояние молекул внутри клеток исследовали с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (Рамановская спектроскопия, КР) (Carey, 1999). Регистрацию сигнала КР осуществляли на конфокальном микроскоп-спектрометре NTEGRA-SPECTRA (“NT-MDT”, Россия) в диапазоне частотного сдвига 200–3000 cm^{-1} с шагом измерения 1 cm^{-1} , охлаждение CCD камеры –60°C, объектив 5× с апертурой 0.15, решетка 600, мощность лазера на образце 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм. Для регистрации сигнала КР 5 мкл раствора наносили на предметное стекло и накрывали вторым предметным стеклом, после чего помещали на предметный столик прибора. Через 5 мин после нанесения образца проводили регистрацию спектров с выбранных областей. Время регистрации одного спектра – 30 с. Количество повторов – не менее 10. После получения сигнала, спектр КР обрабатывали в программе Origin2017 (“Origin Lab Corporation”, США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектра.

Выделение ДНК, амплификацию и секвенирование фрагментов генов 16S рРНК проводили по методике, описанной ранее (Пелевина и соавт., 2021).

В течение всего периода культивирования органический субстрат (ацетат) полностью потреблялся микробным сообществом в анаэробную фазу каждого цикла работы SBR. Достоверного поглощения и выброса фосфора в среду в SBR-циклах за первые 10 сут не наблюдалось (рис. 1а). Дальнейшее культивирование приводило к увеличению количества выбрасываемого фосфора в анаэробной фазе каждого цикла SBR и падению его содержания в среде при переходе в аэробную фазу, что свидетельствовало о развитии в реакторе фосфат-аккумулирующего микробного сообщества. К 150 сут культивирования максимальная концентрация фосфатов в среде в анаэробную фазу составила 100–110 мг $\text{P-PO}_4/\text{л}$ (рис. 1б). К этому моменту отношение количества выброшенного фосфора к потребленному ацетату в анаэробную фазу цикла достигло значения 0.72 ± 0.05 (P-моль/С-моль), что свидетельствовало о том, что весь потребленный ацетат использовался фосфат-аккумулирующими микроорганизмами. Концентрация биомассы в реакторе и ее зольность составили 3.5 ± 0.3 г СБ/л и $36.0 \pm 1.0\%$ соответственно. Содержание фосфора увеличилось до $16.5 \pm 0.15\%$ от веса сухого беззольного вещества биомассы, что многократно превышало содержание фосфора в биомассе большинства микроорганизмов (1–2.5%) (Henze et al., 2002).

Микроскопическое исследование микробного сообщества SBR выявило большое разнообразие морфологических форм. Среди них четко выде-

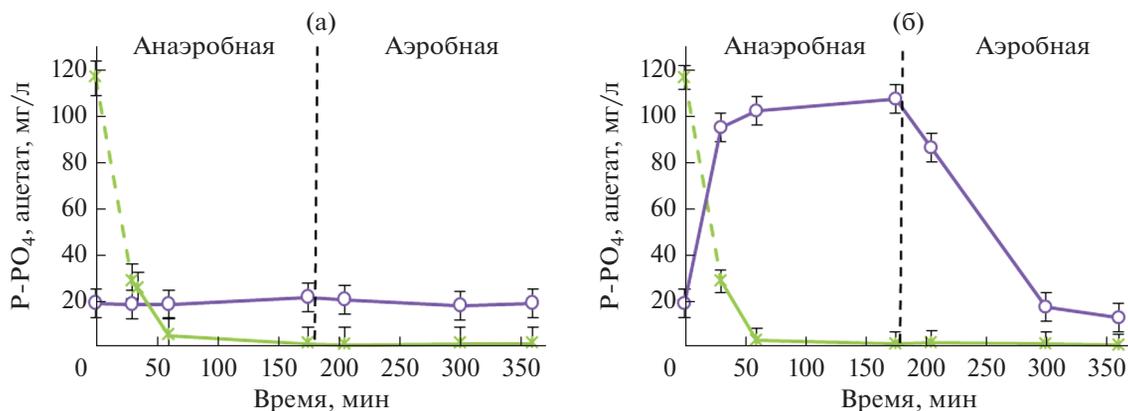


Рис. 1. Динамика концентрации фосфатов и ацетата в среде в течение одного SBR-цикла: а – 10 сут работы реактора; б – 150 сут работы реактора. Концентрации ацетата и фосфатов показаны зеленой и фиолетовой линиями соответственно.

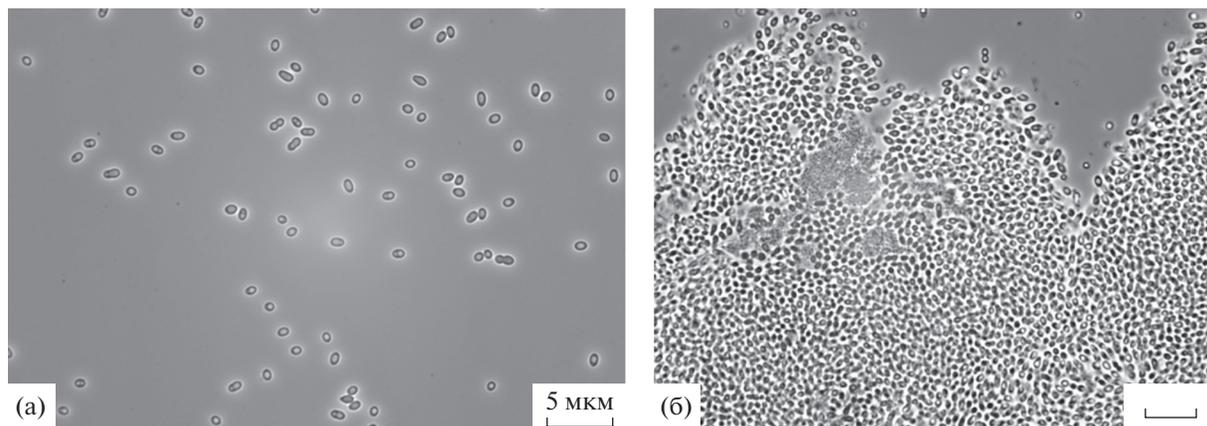


Рис. 2. Клетки с включениями в составе фосфат-аккумулирующего микробного сообщества ферментера: а – отдельные клетки; б – агрегаты клеток. Масштабная линейка – 5 мкм.

лялись овальные клетки с крупными включениями (рис. 2а), большинство из которых формировали агрегаты (рис. 2б).

Исследование этих клеток с помощью метода КР-спектроскопии позволило обнаружить полосы, характерные для колебания различных связей органических соединений и фосфора (рис. 3а, 3б; табл. 1). Были выявлены полосы колебаний, характерные для белков и жирных кислот, а также для связей O–P–O, фосфатных групп PO, PO₄, C–N деформации PO₄³⁻, антисимметричные растяжения PO₂ и полоса колебаний растяжения связи P–OH.

Наличие полос КР-спектра, характерных для C–H-, C–C-связей органических соединений и связей PO₄ (полоса 1128 см⁻¹ – C–H деформации, PO₄³⁻ ν₃ колебание, 1152 см⁻¹ – колебания C–C связи, антисимметричные растяжения PO₂), указывает на существование центров связывания

фосфатов с молекулами в клетке. На рис. 3в представлены КР-спектры образцов клеток, отобранных в разных фазах SBR-цикла. Сравнение интенсивности полос 478, 748 и 1152 см⁻¹, полученных для клеток, находящихся в различных фазах SBR-цикла, показало, что содержание фосфатов в клетках в конце аэробной фазы (спектр 2) существенно выше, чем в конце анаэробной фазы SBR-цикла (спектр 1) (рис. 3в). Эти результаты полностью соответствуют данным по динамике концентрации фосфатов в среде ферментера. Несмотря на то, что интенсивность полос спектра меняется, никакого их смещения не происходит, что свидетельствует об отсутствии конформационных изменений внутриклеточных фосфатов при их потреблении клетками или высвобождении в среду. Отметим, что при минимальном содержании в клетках фосфора в спектрах КР выявлена полоса 1440 см⁻¹, характеризующая N=N растяжения в молекулах (рис. 3в, табл. 1), кото-

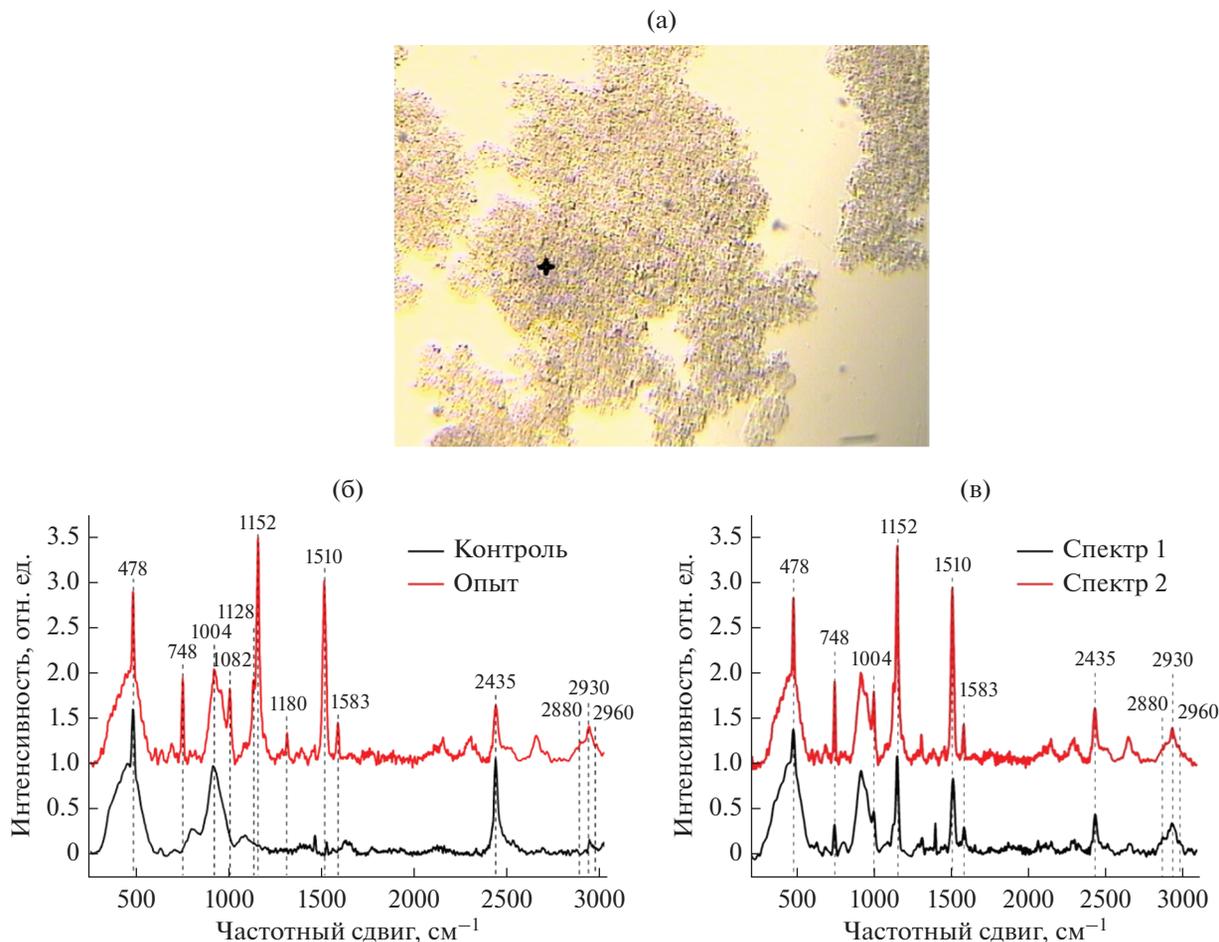


Рис. 3. КР-спектроскопия клеток с включениями: а – микрофотография с обозначением места проведения анализа; б – КР-спектр исследуемых клеток на 150 сут культивирования; в – КР-спектр исследуемых клеток в конце анаэробной фазы (спектр 1) и в конце аэробной фазы SBR-цикла (спектр 2). Представленные графики нормированы на максимум интенсивности полосы стекла – 916 см^{-1} .

рой не наблюдается в клетках при максимальном содержании фосфора. Этот сопряженный с динамикой фосфора процесс требует дальнейшего исследования.

Анализ микробных агрегатов методом FISH выявил высокое содержание в нем “*Ca. Accumulibacter*” – типичного представителя фосфат-аккумулирующих бактерий (рис. 4).

Таксономический анализ исследуемых образцов показал, что в исходном активном иле доминировали представители домена *Bacteria*, относящиеся к четырем основным филумам: *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota* и *Patescibacteria*, тогда как археи составляли 5.9% от общего числа представителей микроорганизмов. В процессе работы биореактора доля архей снизилась до нуля, и стали преобладать представители филума *Proteobacteria*. Их доля к 150 сут возросла более чем в 5 раз, достигнув 68%. *Proteobacteria* в основном были представлены родами “*Ca. Accumulibacter*”, “*Ca. Competi-*

bacter”, *Thiothrix*, *Propionivibrio*, *Dechloromonas*, *Thauera*, *Zoogloea*, которые характерны для биореакторов по удалению фосфатов (McIlroy et al., 2014, 2015; Albertsen et al., 2016; Terashima et al., 2016). Несмотря на то, что некоторые из этих родов включают в фосфат-аккумулирующие микроорганизмы (“*Ca. Accumulibacter*”, *Thiothrix*, *Dechloromonas*, *Thauera*), доминирующим представителем этой физиологической группы бактерий был “*Ca. Accumulibacter*”, численность которого существенно возросла по сравнению с исходным микробным сообществом активного ила с 0.9 до 13% от всех последовательностей генов 16S рНК.

Таким образом, в ходе работы биореактора произошла смена таксономического состава активного ила. К 150 сут культивирования в SBR было получено стабильно функционирующее фосфат-аккумулирующее микробное сообщество с высоким накоплением фосфора в биомассе (16.5% от веса сухого беззольного вещества биомассы) и типичным для ФАО-фенотипа накопле-

Таблица 1. Характеристика полос КР-спектра (Condrate, 1998; Zhang, Silva, 2010; Frost et al., 2014; Jillavenkatesa, Penkov, 2021)

Положение пика, см ⁻¹	Характеристика
478	Колебания О–Р–О
748	Колебания фосфатных групп PO
1004	Карбонат ион CO ₃ (2 ⁻) или CH ₃ -колебания
1082	Колебания PO ₄ , полоса F2
1128	С–Н деформации, PO ₄ ³⁻ v ₃ колебание
1152	Колебания С–С связи, антисимметричные растяжения PO ₂
1180	С–Н деформации
1440	N=N растяжения
1510	Колебания С=C связи
1583	Колебания амида I
2435	Колебания растяжения связи Р–ОН
2880, 2930, 2960	Белки и липиды, С–Н группы жирных кислот и белков или воды

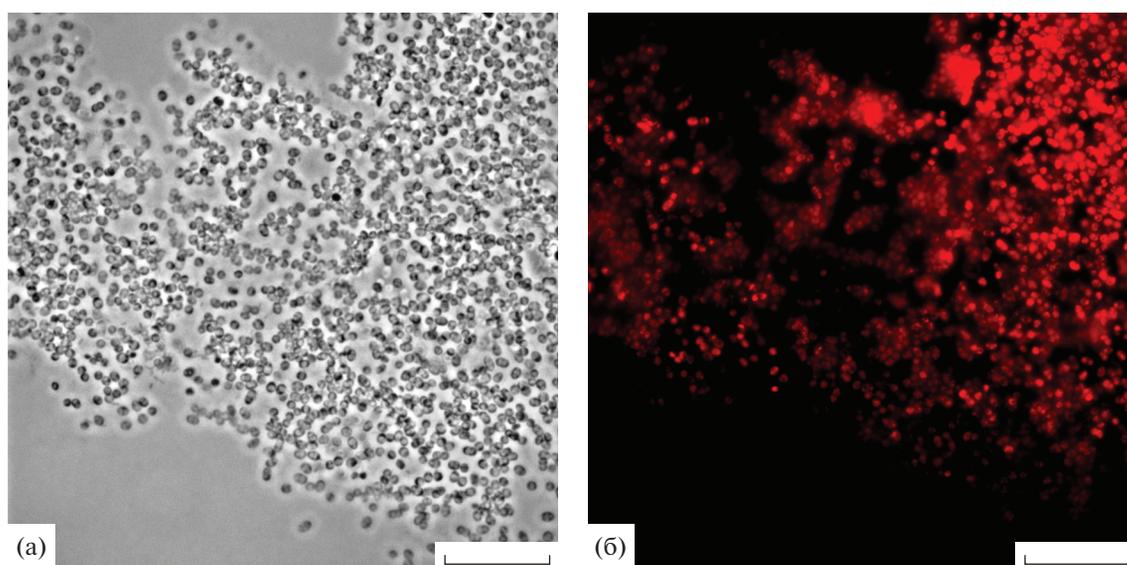


Рис. 4. “*Ca. Accumulibacter*” в составе микробного сообщества агрегатов: а – фазовый контраст; б – клетки, гибридные с зондом PAO651 (светофильтр Zeiss 43). Масштабная линейка – 20 мкм.

нием и высвобождением фосфатов в аэробную и анаэробную фазу SBR-цикла. Основным представителем ФАО в сообществе был “*Ca. Accumulibacter*”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00019) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каллистова А.Ю., Пименов Н.В., Козлов М.Н., Николаев Ю.А., Дорофеев А.Г., Асеева В.Г., Грачев В.А., Менько Е.В., Берестовская Ю.Ю., Ножевникова А.Н., Кевбрина М.В.* Изучение микробного состава активных илов московских очистных сооружений // *Микробиология*. 2014. Т. 83. С. 615–625.
- Kallistova A.Y., Pimenov N.V., Kozlov M.N., Nikolaev Y.A., Dorofeev A.G., Aseeva V.G., Grachev V.A., Men'ko E.V., Berestovskaya Y.Y., Nozhevnikova A.N., Kevbrina M.V.* Microbial composition of the activated sludge of Moscow wastewater treatment plants // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 699–708.
- Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В.* Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфатов в циклическом аэробно-анаэробном культивировании // *Микробиология*. 2021. Т. 90. С. 76–89.
- Pelevina A.V., Berestovskaya Y.Y., Grachev V.A., Dorofeeva I.K., Sorokin V.V., Dorofeev A.G., Kallistova A.Y., Nikolaev Y.A., Pimenov N.V., Kotlyarov R.Y., Beletskii A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V., Mardanov A.V.* A microbial consortium removing phosphates under conditions of cyclic aerobic-anaerobic cultivation // *Microbiology (Moscow)*. 2021. V. 90. P. 66–77.
- Albertsen M., McIlroy S.J., Stokholm-Bjerregaard M., Karst S.M., Nielsen P.H.* “*Candidatus Propionivibrio aalborgensis*”: a novel glycogen accumulating organism abundant in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1033.
- Carey P.R.* Raman spectroscopy, the sleeping giant in structural biology, awakes // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 26625–26628.
- Crocetti G.R., Hugenholtz P., Bond P.L., Schuler A., Keller J., Jenkins D., Blackall L.L.* Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 1175–1182.
- Crocetti G.R., Banfield J.F., Keller J., Bond P.L., Blackall L.L.* Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes // *Microbiology (SGM)*. 2002. V. 148. P. 3353–3364.
- Frost R.L., Scholz R., López A., Xi Y.* A vibrational spectroscopic study of the phosphate mineral whiteite $\text{CaMn}^{++}\text{Mg}_2\text{Al}_2(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$ // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2014. V. 124. P. 243–248.
- Gómez-Basurto F., Vital-Jácome M., Gómez-Acata E.S., Thalasso F., Luna-Guido M., Dendooven L.* Microbial community dynamics during aerobic granulation in a sequencing batch reactor (SBR) // *PeerJ*. 2019. V. 7. P. e7152.
- Henze M., Harremoës P., La Cour Jansen J., Arvin E.* Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes. 3rd ed. Berlin: Springer. 2002. P. 383.
- Izadi P., Izadi P., Eldyasti A.* Design, operation and technology configurations for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process: a review // *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2020. V. 19. P. 561–593.
- Jillavenkatesa A., Condrate Sr R.A.* The infrared and Raman spectra of β - and α -tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) // *Spectr. Lett.* 1998. V. 31. P. 1619–1634.
- Lopez-Vazquez C.M., Oehmen A., Hooijmans C.M., Brdjanovic D., Gijzen H.J., Yuan Z., van Loosdrecht M.C.M.* Modeling the PAO GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature // *Water Res.* 2009. V. 43. P. 450–462.
- McMahon K.D., He S., Oehmen A.* The microbiology of phosphorus removal // *Microbial Ecology of Activated Sludge* / Eds. Seviour R., Nielsen P.H. London: IWA, 2010. P. 668.
- McIlroy S.J., Albertsen M., Andresen E.K., Saunders A.M., Kristiansen R., Stokholm-Bjerregaard M., Nielsen P.H.* “*Candidatus Competibacter*”-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity // *ISME J.* 2014. V. 8. P. 613–624.
- McIlroy S.J., Saunders A.M., Albertsen M., Nierychlo M., McIlroy B., Hansen A.A., Nielsen P.H.* MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge // *Database*. 2015. V. 2015. P. 1–8.
- Penkov N.V.* Relationships between molecular structure of carbohydrates and their dynamic hydration shells revealed by terahertz time-domain spectroscopy // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 11969.
- Rajesh Banu J., Merrylin J., Kavitha S., Yukesh Kannah R., Selvakumar P., Gopikumar S., Kumar G.* Trends in biological nutrient removal for the treatment of low strength organic wastewaters // *Curr. Pollut. Rep.* 2021. V. 7. P. 1–30.
- Roy S., Guanglei Q., Zuniga-Montanez R., Williams R.B., Wuertz S.* Recent advances in understanding the ecophysiology of enhanced biological phosphorus removal // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2021. V. 67. P. 166–174.
- Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation / Eds. Rice E.W., Baird R.B., Eaton A.D. 23rd edn. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2017. P. 1504.

Terashima M., Yama A., Sato M., Yumoto I., Kamagata Y., Kato S. Culture-dependent and -independent identification of polyphosphate-accumulating *Dechloromonas* spp. predominating in a full-scale oxidation ditch wastewater treatment plant // *Microb. Environ.* 2016. V. 31. P. 449–455.

Weissbrodt D.G., Neu T.R., Kuhlicke U., Rappaz Y., Holliger C. Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. P. 175.

Zhang W., Silva S.R.P. Raman and FT-IR studies on dye-assisted dispersion and flocculation of single walled carbon nanotubes // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 2010. V. 77. P. 175–178.

Zhou J.H., Zhou Y.C., Yu H.C., Zhao Y.Q., Ye K.Q., Fang J.Y., Wang H.Y. Determining the effects of aeration intensity and reactor height to diameter (H/D) ratio on granule stability based on bubble behavior analysis // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019. V. 26. P. 784–796.

A Phosphate-Accumulating Microbial Community in the Laboratory Bioreactor Predominated by “*Candidatus Accumulibacter*”

A. V. Pelevina¹ *, Yu. Yu. Berestovskaya¹, V. A. Grachev¹, A. G. Dorofeev¹,
O. V. Slatinskaya², G. V. Maksimov², A. Yu. Kallistova¹, Yu. A. Nikolaev¹, E. V. Grouzdev³,
N. V. Ravin³, N. V. Pimenov¹, and A. V. Mardanov³

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119892 Russia

³Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: annie.pelevina@yandex.ru

Received April 11, 2022; revised April 18, 2022; accepted April 19, 2022

Abstract—A microbial community enriched with phosphate-accumulating organisms (PAO) was obtained in a laboratory sequencing batch reactor after 150 days of cultivation. Analysis of phosphate dynamics in the medium and the results of Raman scattering spectroscopy indicated the cycle of phosphate consumption and release during cultivation under oxic and anoxic conditions, respectively, which was typical of PAO. The highest content of intracellular phosphorus was $16.5 \pm 0.15\%$ of the dry ash-free biomass. Molecular genetic analysis and FISH revealed the taxonomic diversity of the microbial community, in which members of the “*Ca. Accumulibacter*” group were the major PAO.

Keywords: biological phosphorus removal, phosphate-accumulating bacteria (PAO), water treatment, “*Candidatus Accumulibacter*”

ВЛИЯНИЕ ЛАНТАНА НА СОСТАВ МЕТАНОТРОФНОГО СООБЩЕСТВА
ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ© 2022 г. И. К. Кравченко^а*, Л. Р. Сизов^б, Е. Н. Тихонова^а, Л. В. Лысак^с^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия^бИнститут проблем химической физики РАН, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, 119192 Россия

*e-mail: irinakravchenko@inbox.ru

Поступила в редакцию 04.04.2022 г.

После доработки 27.04.2022 г.

Принята к публикации 20.05.2022 г.

Лантан регулирует метаболизм микроорганизмов, использующих одноуглеродные соединения, однако сведения о его воздействии на почвенные сообщества практически отсутствуют. Впервые методом высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК в экспериментах с почвенными микробиоценозами изучен ответ метанотрофных сообществ на внесение лантана. Установлено, что внесение солей лантана через один и два месяца увеличивает долю *Methylobacter* в общем пуле последовательностей до 9 и 15% соответственно. Одновременно наблюдается возрастание содержания метилотрофа *Methylothermobacter* до 10 и 19%. Таким образом, лантан стимулирует формирование комплексов *Methylobacter*–*Methylothermobacter* в условиях повышенного содержания метана в почве, что может влиять на вклад сельскохозяйственных почв в регуляцию содержания метана в атмосфере.

Ключевые слова: агропочвы, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование 16S рРНК, *Methylobacter*, *Methylothermobacter*

DOI: 10.31857/S0026365622100238

Метан является важным парниковым газом, и, несмотря на содержание в атмосфере менее 0.02%, его вклад в современное глобальное потепление оценивается в 15% (Saunio et al., 2020). Единственным известным биологическим способом поглощения метана из атмосферы Земли является его окисление микробными сообществами аэробных почв, поэтому любые изменения интенсивности этого процесса могут иметь глобальные последствия. Согласно современным расчетам, интенсивность поглощения метана почвенными микроорганизмами составляет 22.4 Тг год⁻¹, из которых половина приходится на почвы умеренной зоны (Dutaur, Verchot, 2007).

Почвы агроценозов находятся под постоянным воздействием различных соединений, поступающих с атмосферными осадками, удобрениями, выбросами предприятий и автотранспорта (Smith et al., 2016). Микробные сообщества почв отвечают за осуществление важнейших экосистемных процессов, что вызывает постоянный растущий интерес к изучению их устойчивости и восстановлению после стрессовых воздействий (Griffiths, Philippot, 2013). Сведения об изменении состава метанотрофных сообществ при внесении удобрений весьма огра-

ничены, и наиболее часто рассматриваются азотные соединения. О влиянии на микробные сообщества почв других элементов, например лантаноидов, известно очень мало.

Лантаноиды входят в группу редкоземельных элементов (РЗЭ), которые широко используются в современных технологиях (Водяницкий, Рогова, 2016). Основная часть лантаноидов, которые поступают в почву при разложении литогенных минералов, содержится в металлоорганических комплексах и недоступна для растений и микроорганизмов (Котельникова и соавт., 2021). В то же время лантаноиды, попадающие в почву в результате антропогенной активности (минеральные и органические удобрения, микроудобрения), находятся в биологически доступной форме и могут нарушить цикл РЗЭ в окружающей среде (Ramos et al., 2016). В последнее десятилетие большое внимание лантаноидам, особенно легким, уделяется в связи с их стимулирующим воздействием на рост растений (Котельникова и соавт., 2021), в то время как сведения о влиянии на почвенные микроорганизмы весьма ограничены. Так в течение ряда лет проводились систематические исследования влияния лантаноидов на нитрифицирующие и

аммонифицирующие микроорганизмы почв Бурятии (Чимитдоржиева, Абашеева, 2014).

Открытие лантаноид-зависимой метанолдегидрогеназы (XoxF-MDH) (Chistoserdova, 2016) продемонстрировало важную роль редкоземельных элементов в метаболизме метилотрофов. Легкие лантаноиды, особенно лантан (La), могут эффективно заменять кальций в метанолдегидрогеназе. Как результат, наличие лантаноидов даже в наномолярных количествах регулирует экспрессию генов синтеза альтернативной метанолдегидрогеназы и влияет на образование метанотрофами внеклеточного метанола, что может привести к изменениям в составе микроорганизмов-спутников (Krause et al., 2017). Это открывает перспективы для разработки новых подходов к регулированию состава и активности метанотрофов почвы и связанной с ними микробиоты. В то же время авторам не известны работы по оценке влияния лантана или других лантаноидов на метанотрофные сообщества почв.

Целью настоящего исследования было оценить влияние солей лантана на состав метанотрофных сообществ в экспериментах с почвенными микроорганизмами.

В ноябре 2020 г. была заложена серия экспериментов с дерново-подзолистой среднесуглинистой почвой поверхностного горизонта А (0–20 см) залежного разнотравно-злакового луга. Объект находится вблизи Пошехонской птицефабрики, Ярославская область (58°30'36" с.ш. и 39°08'32" в.д.), более 20 лет использовался в севообороте с внесением высоких доз органического удобрения. Почва умеренно кислая (рН 5.4), с высоким содержанием органического вещества ($C_{\text{орг}}$ по Тюрину 21.7 г кг⁻¹), высоким содержанием нитратов (261 мг кг⁻¹) и низким содержанием аммонийного азота (<5 мг кг⁻¹).

Исходная почва (вариант К) была использована для создания микрокосмов, каждый из которых представлял собой 10 г почвы естественной влажности, помещенной в стеклянный флакон объемом 100 мл. Флаконы содержали в эксикаторе с газовой смесью, состоящей из 10% метана и 90% воздуха для инкубации в течение 2 мес. при 25°C. Один раз в неделю проводили замену газовой фазы и контролировали влажность почвы гравиметрически. Были исследованы следующие варианты: М – без добавок; МL1 – внесение раствора хлорида лантана (5 мкг La³⁺), инкубация в течение 1 мес.; МL2 – внесение раствора хлорида лантана (5 мкг La³⁺), инкубация 2 мес. Для выделения ДНК и молекулярного анализа было использовано по два отдельных образца на вариант, итого 8 образцов.

Тотальную ДНК выделяли из 0.25 г почвы с использованием набора Power Soil DNA Isolation Kit ("Qiagen, Carlsbad", CA, США). Оценку состава

прокариотных сообществ почв с помощью высокопроизводительного секвенирования переменного региона V3–V4 гена 16S рРНК на секвенаторе MiSeq ("Illumina", США) и первичную программную обработку полученных последовательностей проводили в ООО "Биоспарк". Для каждого образца ДНК было создано две библиотеки. Анализ библиотек проводили методом парно-концевого чтения генерацией не менее 10000 парных прочтений на каждый образец с использованием следующих реактивов: MiSeq Reagent Kit v2 nano и MiSeq v2 Reagent Kit. Полученные данные секвенирования обрабатывали в программе, написанной с использованием алгоритма QIIME 1.9.1, включающего объединение прямых и обратных прочтений, удаление технических последовательностей, фильтрации последовательностей с низкими показателями достоверности прочтения отдельных нуклеотидов (качество менее Q30), фильтрации химерных последовательностей, выравнивание прочтений на референсную последовательность 16S рРНК. При расчете индексов разнообразия проводилась нормализация данных по образцу с минимальным количеством чтений. Распределение последовательностей по ОТЕ с использованием базы данных Silva версии 132 и расчет индексов разнообразия проводили в программе QIIME 2 (Caporaso et al., 2010). Использован алгоритм классификации ОТЕ с открытым референсом, порог классификации 97%.

Проведенный анализ показал, что доля последовательностей гена 16S рРНК метанотрофов в исходной дерново-подзолистой почве составляла менее 0.1% от всех идентифицированных последовательностей. Были детектированы бактерии родов *Methylosinus* (0.05 ± 0.01%), *Methylocystis* (0.01 ± 0.006%), *Methylomonas* (0.004 ± 0.002%).

Инкубация микрокосмов с метаном, а также метаном и солями лантана снижала показатели разнообразия микробного сообщества (табл. 1), однако увеличивала долю метанотрофов и изменяла структуру метанотрофного сообщества. Через 30 сут инкубации с метаном количество *Methylosinus* возросло до 0.38 ± 0.08%. В составе сообщества были также обнаружены *Methylobacter* (2 ОТЕ, 0.43 ± 0.11%) и единичные последовательности *Methylocella* (0.03 ± 0.01%) (рис. 1), количество которых в исходной почве было ниже уровня детекции. Таким образом, количество метанотрофов через 1 мес. инкубации возросло на порядок и составило около 1% от общего числа последовательностей.

Внесение лантана принципиально изменяло количество и состав метанотрофов. Через 1 мес. доля последовательностей гена 16S рРНК метанотрофов достигала 9.2%, из них *Methylobacter* составил 8.97 ± 0.9% (3 ОТЕ), а *Methylosinus* 0.10 ± 0.08% (рис. 1). Эффект влияния лантана был пролонги-

Таблица 1. Характеристики разнообразия микробных сообществ дерново-подзолистой почвы и почв инкубационного эксперимента

Образец	Характеристики библиотек фрагментов 16S рРНК		Количество ОТЕ	Количество родов (филумов)	Индексы разнообразия				
	количество последовательностей	количество нуклеотидов в последовательностях			Chao 1	Шеннон	Симпсон	Пилелу	Фейта PD
К	10715 ± 740	412 ± 12	1546	421 (21)	1794	9.09	0.99	0.90	5.9
М	10666 ± 486	417 ± 10	904	290 (16)	1183	8.08	0.99	0.89	5.6
ML1	5230 ± 620	409 ± 12	1046	203 (16)	1213	7.81	0.98	0.86	3.8
ML2	5966 ± 322	421 ± 8	906	218 (16)	1226	7.66	0.98	0.91	3.4

рованным, и через 2 мес. доля последовательностей *Methylobacter* возросла до $15.28 \pm 3.2\%$ (6 ОТЕ), а *Methylosinus* до $0.19 \pm 0.1\%$ (рис. 1). Все ОТЕ *Methylobacter* относились к *M. tundripaludum* (98.12–99.06% сходства гена 16S рРНК с типовым штаммом), а ОТЕ *Methylosinus* – *M. sporium* (99.24% сходства) (табл. 2).

Основную по численности группу в почве с внесением лантана составляли метилотрофы рода *Methylothenera*, относящиеся к классу *Methylophilaceae* (рис. 1), которые образуют консорциумы с метанотрофными бактериями в мелководных ме-

тановых сипах (Данилова и соавт., 2021) и осадках озер (van Grinsven et al., 2021). Через 2 мес. доля последовательностей гена 16S рРНК *Methylothenera* превышала $19 \pm 1.30\%$ (рис. 1). Все они относились к *M. versatilis* (табл. 2), проявляя 98.12–98.46% сходства 16S рРНК с изолятом из донных осадков озера Вашингтон, США (Lapidus et al., 2011). В вариантах без внесения лантана были обнаружены также метилотрофные бактерии *Hyphomicrobium facile* (2 ОТЕ, $0.4 \pm 0.2\%$).

Таким образом, впервые установлено, что в почве умеренной климатической зоны внесение лантана на фоне повышения содержания метана, что характерно для агропочв с внесением органических и минеральных удобрений, приводит к абсолютному доминированию метанотрофов рода *Methylobacter* и облигатных метилотрофов рода *Methylothenera*. Скоординированная реакция *Methylobacter* и *Methylothenera* на внесение соли лантана позволяет предположить их совместную деятельность в регуляции обмена метана между почвой и атмосферой, что требует дальнейшего исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-24-00418.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов, полученных с использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

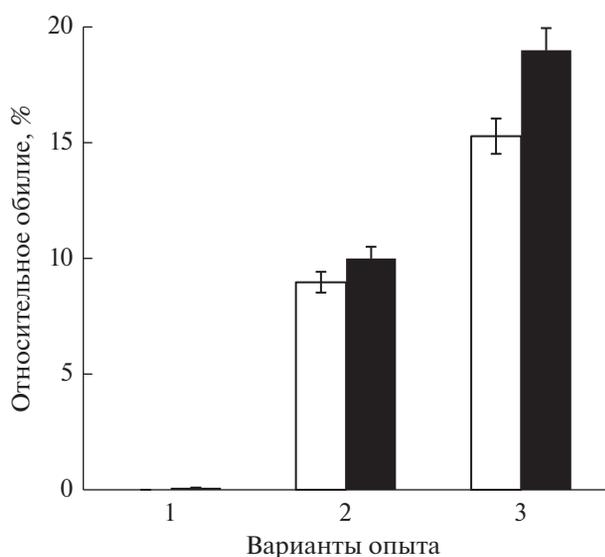


Рис. 1. Показатели относительного обилия доминирующих метанотрофных бактерий *Methylobacter* (белые столбики) и метилотрофных бактерий *Methylothenera* (черные столбики) в образцах почв эксперимента с микрокосмами. Обозначения вариантов опыта: 1 – М, 2 – ML1, 3 – ML2.

Таблица 2. Характеристики основных ОТЕ метанотрофных и метилотрофных бактерий, полученные в результате молекулярного анализа микробных сообществ почв инкубационного эксперимента

ОТЕ	Номер депонирования в NCBI	Представленность в сообществе, %	Ближайший родственник (NCBI номер)	Степень покрытия 16S рРНК, %	Сходство 16S рРНК, %
M–инкубация с метаном, 1 мес.					
S21-25	ON109140	0.23	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341, AJ414655) <i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100.0 100.0	100.0 99.05
S21-21	ON109141	0.20	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341, AJ414655) <i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100.0 100.0	99.05 98.12
S21-41	ON109142	0.38	Uncultured bacterium clone (JF135670) <i>Methylosinus sporium</i> (MT229167)	100 100	100 99.24
S21-979	ON109143	0.03	Uncultured <i>Methylocella</i> sp. clone OTU16 (MW143589) <i>Methylocella tundrae</i> isolate MTUNDRAET4	100 100	98.48 97.49
ML1–инкубация с метаном и лантаном, 1 мес.					
S21-278	ON109144	5.31	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341) <i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100 100	100 99.06
S21-185	ON109145	3.54	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341) <i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100 100	99.76 98.82
S21-299	ON109146	5.71	Uncultured <i>Methylotenera</i> sp. clone 11 (KX365915)	100	99.77
S21-173	ON109147	3.31	Uncultured <i>Methylophilaceae</i> bacterium clone 320 (MF042682)	100	99.76
S21-14	ON109148	0.27	<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain TWH1 (MK124972)	100	100
S21-131	ON109149	0.13	Uncultured <i>Hyphomicrobiaceae</i> bacterium clone C (JX505000) <i>Hyphomicrobium facile</i> (Y14312)	100 100	100 99.25
ML2–инкубация с метаном и лантаном, 2 мес.					
S21-507	ON109150	8.55	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341) <i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100 100	100 99.06
S21-359	ON109151	6.05	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. clone (JX505341) <i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96 ^T (NR_042107)	100 100	99.76 98.82
S21-472	ON109152	12.86	Uncultured <i>Methylotenera</i> sp. clone 11 (KX365915) <i>Methylotenera versatilis</i> isolate (MW010428)	100 100	99.77 98.12
S21-121	ON109153	2.04	<i>Methylotenera versatilis</i> isolate (MW010428)	100	98.46

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Данилова О.В., Иванова А.А., Терентьева И.Е., Глаголев М.В., Сабреков А.Ф. Разнообразие микробных сообществ, приуроченных к мелководным сипам в пойме реки Большая речка, Западная Сибирь // *Микробиология*. 2021. Т. 90. С. 601–612.
- Danilova O.V., Ivanova A.A., Terent'eva I.E., Glagolev M.V., Sabrekov A.F. Microbial community composition of floodplains shallow-water seeps in the Bolshaya Rechka floodplain, Western Siberia // *Microbiology (Moscow)*. 2021. V. 90. P. 632–642.
- Водяницкий Ю.Н., Рогова О.Б. Биогеохимия лантанидов в почвах // *Бюллетень Почвенного института им. Докучаева*. 2016. Вып. 84. С. 101–118.
- Котельникова А.Д., Рогова О.Б., Столбова В.В. Лантаноиды в почве: поступление, содержание, влияние на растения, генотоксичность (обзор) // *Почвоведение*. 2021. № 2. С. 216–223.
- Kotelnikova A.D., Rogova O.B., Stolbova V.V. Lanthanides in the soil: routes of entry, content, effect on plants, and genotoxicity (a review) // *Euras. Soil Sci.* 2021. V. 54. С. 117–134.
- Чимитдоржиева И.Б., Абашеева Н.Е. Влияние лантана на микробиологическую активность и динамику азотного фонда почв. Монография. Улан-Удэ: Изд-во БГСХА им. В.Р. Филиппова, 2014. 98 с.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data // *Nature Meth.* 2010. V. 7. P. 335–336.
- Chistoserdova L. Lanthanides: New life metals? // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 32. Art. 138. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2088-2>
- Dutaur L., Verchot L.V. A global inventory of the soil CH₄ sink // *Glob. Biogeochem. Cycles*. 2007. V. 21. P. 1–9.
- Griffiths B.S., Philippot L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community // *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. V. 37. P. 112–129.
- Krause S.M.B., Johnson T., Karunaratne Y.S., Fu Y., Beck D.A.C., Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Lanthanide-dependent cross-feeding of methane-derived carbon is linked by microbial community interactions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 358–363.
- Lapidus A., Clum A., LaButti K., Kaluzhnaya M.G., Lim S., Beck D.A.C., Glavina del Rio T., Nolan M., Mavromatis K., Huntemann M., Lucas S., Lidstrom M.E., Ivanova N., Chistoserdov L. Genomes of three methylotrophs from a single niche reveal the genetic and metabolic divergence of the *Methylophilaceae* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 3757–3764.
- Ramos S.J., Dinali G.S., Oliveira C., Martins G.C., Moreira C.G., Siqueira J.O., Guilherme L.R. Rare earth elements in the soil environment // *Curr. Pollut. Rep.* 2016. V. 2. P. 28–50.
- Saunois M., Bousquet P., Poulter B., Pregon A., Ciais P., Canadell J.G., Dlugokencky E.J., Etiope G., Bastviken D., Houweling S., Janssens-Maenhout G., Tubiello F.N., Castaldi S., Jackson R.B., Alexe M., Arora V.K., Beerling D.J., Bergamaschi P., Blake D.R., Brailsford G., Brovkin V., Bruhwiler L., Crevoisier C., Crill P., Covey K., Curry C., Frankenberg C., Gedney N., Höglund-Isaksson L., Ishizawa M., Ito A., Joos F., Kim H.-S., Kleinen T., Krummel P., Lamarque J.-F., Langenfelds R., Locatelli R., Machida T., Maksyutov S., McDonald K.C., Marshall J., Melton J.R., Morino I., Naik V., O'Doherty S., Parmentier F.-J.W., Patra P.K., Peng C., Peng S., Peters G.P., Pison I., Prigent C., Prinn R., Ramonet M., Riley W.J., Saito M., Santini M., Schroeder R., Simpson I.J., Spahni R., Steele P., Takizawa A., Thornton B.F., Tian H., Tohjima Y., Viovy N., Voulgarakis A., van Weele M., van der Werf G.R., Weiss R., Wiedinmyer C., Wilton D.J., Wiltshire A., Worthy D., Wunch D., Xu X., Yoshida Y., Zhang B., Zhang Z., Zhu Q. The global methane budget 2000–2012 // *Earth Syst. Sci. Data*. 2016. V. 8. P. 697–751.
- Smith P., House J.I., Bustamante M., Sobocká J., Harper R., Pan G., West P.C., Clark J.M., Adhya T., Rumpel C., Paus-tian K., Kuikman P.M., Cotrufo F., Elliott J.A., McDowell R., Griffiths R.I., Asakawa S., Bondeau A., Jain A.K., Thomas M.J., Pugh A.M. Global change pressures on soils from land use and management // *Global Change Biol.* 2016. V. 22. P. 1008–1028.
- van Grinsven S., Damsté J.S.S., Harrison J., Polerecky L., Villanueva L. Nitrate promotes the transfer of methane-derived carbon from the methanotroph *Methylobacter* sp. to the methylotroph *Methylothera* sp. in eutrophic lake water // *Limnol. Oceanogr.* 2021. V. 66. P. 878–891.

The Effect of Lanthanum on the Composition of Methanotrophic Community of Sod-Podzolic Soil

I. K. Kravchenko^{1, *}, L. R. Sizov², E. N. Tikhonova¹, and L. V. Lysak³

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia

³Faculty of Soil Science, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

*e-mail: irinakravchenko@inbox.ru

Received April 4, 2022; Revised April 27, 2022; Accepted May 20, 2022

Abstract—Lanthanum regulates the metabolism of microorganisms using single-carbon compounds, but there is no information about its effect on soil communities. The response of methanotrophic communities to the introduction of lanthanum was studied for the first time by high-performance sequencing of 16S rRNA in experiments with soil microcosms. It was found that after one and two months after the introduction of

lanthanum salts the proportion of *Methylobacter* in the total pool of sequences has increased by an order of magnitude up to 4 and 6%, respectively. At the same time, the content of methylotroph *Methylothenera* has raised up to 9 and 15%, respectively. Thus, lanthanum stimulates the formation of *Methylobacter–Methylothenera* associations under increased methane content in the soil, which may affect the contribution of agro-soils to the regulation of methane content in the atmosphere.

Keywords: agrosols, microbial diversity, high-throughput sequencing of 16S rRNA, *Methylobacter*, *Methylothenera*

ПОПРАВКА

DOI: 10.31857/S002636562270001X

В статье: “*DEFERRIVIBRIO ESSENTUKIENSIS* SP. NOV., GEN. NOV. – ПРЕДСТАВИТЕЛЬ НОВОГО СЕМЕЙСТВА *DEFERRIVIBRIONACEAE* FAM. NOV., ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ПОДЗЕМНОГО ВОДОНОСНОГО ГОРИЗОНТА КАВКАЗСКИХ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД”

Авторов: Заварзина Д.Г., Прокофьева М.И., Пихтерева В.А., Клюкина А.А., Маслов А.А., Меркель А.Ю., Гаврилов С.Н. (Микробиология. 2022. Т. 91. № 2. С. 171–190).

Вместо: “*DEFERRIVIBRIO ESSENTUKIENSIS* SP. NOV., GEN. NOV. – ПРЕДСТАВИТЕЛЬ НОВОГО СЕМЕЙСТВА *DEFERRIVIBRIONACEAE* FAM. NOV., ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ПОДЗЕМНОГО ВОДОНОСНОГО ГОРИЗОНТА КАВКАЗСКИХ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД” (название статьи) **должно быть:** “*DEFERRIVIBRIO ESSENTUKIENSIS* GEN. NOV., SP. NOV. – ПРЕДСТАВИТЕЛЬ НОВОГО СЕМЕЙСТВА *DEFERRIVIBRIONACEAE* FAM. NOV., ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ПОДЗЕМНОГО ВОДОНОСНОГО ГОРИЗОНТА КАВКАЗСКИХ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД”