

СОДЕРЖАНИЕ

Том 91, номер 4, 2022

ОБЗОРЫ

Микробиом и метабиотические свойства кефирных зерен и кефиров на их основе

Дин Фань, Л. Г. Стоянова, А. И. Нетрусов

391

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Внесение экзогенного активного ила как способ повышения эффективности удаления азота в процессе анаммокс

*Н. В. Пименов, Ю. А. Николаев, А. Г. Дорофеев, В. А. Грачев, А. Ю. Каллистова,
Т. А. Канапацкий, Ю. В. Литти, Е. В. Груздев, Ш. А. Бегматов,
Н. В. Равин, А. В. Марданов*

410

Высокоэффективная биодеструкция экотоксичной дегидроабиединовой кислоты нерастущими клетками *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107

К. М. Иванова, В. В. Гришко, И. Б. Ившина

419

Синтез биогенных аминов молочнокислыми бактериями на средах растительного и животного происхождения

*Е. Ф. Шаненко, Ю. А. Николаев, В. И. Ганина, И. Н. Серых, А. В. Олескин,
Т. Г. Мухамеджанова, Н. В. Григорьева, Г. И. Эль-Регистан*

433

Молекулярно-генетический и функциональный анализ системы конъюгации плазмиды рBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis*

А. С. Гуринович, М. А. Титок

451

Каротиноиды в комплексах LH2 из *Allochrochromatium vinosum* способны при освещении генерировать синглетный кислород, который окисляет БХл850

З. К. Махнева, А. А. Москаленко

466

Филогения и реклассификация *Rhodotorula pinalis* как *Fellozyma pinalis* comb. nov.

А. В. Качалкин

475

Внутривидовой полиморфизм дрожжей *Kluyveromyces lactis*: генетические популяции

Л. В. Лютова, Г. И. Наумов, А. В. Шнырева, Е. С. Наумова

480

Микробное сообщество морского меромиктического желоба (Бухта Биофильтров), расположенного в Кандалакшском заливе Белого моря

*А. С. Саввичев, А. А. Кулакова, Е. Д. Краснова, Д. А. Воронов, В. В. Кадников,
А. В. Белецкий, В. В. Козяева, И. И. Русанов, М. А. Летарова, Е. Ф. Веслополова,
В. В. Беленкова, Н. А. Демиденко, В. М. Горленко*

492

Влияние немодифицированных многостенных углеродных нанотрубок на формирование и разрушение бактериальных биопленок

Ю. Г. Максимова, Я. Е. Быкова, А. С. Зорина, С. М. Никулин, А. Ю. Максимов

507

Contents

Vol. 91, No. 4, 2022

Reviews

Microbiome and Metabiotic Properties of Kefir Grains and Kefirs Based on Them

Ding Fan, L. G. Stoyanova, and A. I. Netrusov

391

Experimental Articles

Introduction of Exogenous Activated Sludge as a Way to Enhance the Efficiency of Nitrogen Removal in the Anammox Process

N. V. Pimenov, Yu. A. Nikolaev, A. G. Dorofeev, V. A. Grachev, A. Yu. Kallistova, T. A. Kanapatskii, Yu. V. Litt, E. V. Gruzdev, Sh. A. Begmatov, N. V. Ravin, and A. V. Mardanov

410

Highly Efficient Biodegradation of Ecotoxic Dehydroabiatic Acid by Resting Cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 107

K. M. Ivanova, V. V. Grishko, and I. B. Ivshina

419

Synthesis of Biogenic Amines by Lactic Acid Bacteria on Media of Plant and Animal Origin

E. F. Shanenko, Yu. A. Nikolaev, V. I. Ganina, I. N. Serykh, A. V. Oleskin, T. G. Mukhamedzhanova, N. V. Grigorieva, and G. I. El'-Registan

433

Molecular Genetic and Functional Analysis of the Conjugation System of the pBS72 Plasmid from *Bacillus subtilis* Environmental Isolates

A. S. Gurinovich and M. A. Titok

451

Carotenoids in LH2 Complexes from *Allochrochromatium vinosum* under Illumination Are Able to Generate Singlet Oxygen which Oxidizes BChl850

Z. K. Makhneva and A. A. Moskalenko

466

Phylogeny of *Rhodotorula pinalis* and Its Reclassification as *Fellozyma pinalis* comb. nov.

A. V. Kachalkin

475

Intraspecific Polymorphism of the Yeast *Kluyveromyces lactis*: Genetic Populations

L. V. Lyutova, G. I. Naumov, A. V. Shnyreva and E. S. Naumova

480

Microbial Community of a Marine Meromictic Trough (Biofilter Bay) in the Kandalaksha Bay, White Sea

A. S. Savvichev, A. A. Kulakova, E. D. Krasnova, D. A. Voronov, V. V. Kadnikov, A. V. Beletskii, V. V. Kozyaeva, I. I. Rusanov, M. A. Letarova, E. F. Veslopolova, V. V. Belenkova, N. A. Demidenko, and V. M. Gorlenko

492

Effect of Pristine Multi-Walled Carbon Nanotubes on Formation and Degradation of Bacterial Biofilms

Yu. G. Maksimova, Ya. E. Bykova, A. S. Zorina, S. M. Nikulin, and A. Yu. Maksimov

507

МИКРОБИОМ И МЕТАБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЕФИРНЫХ ЗЕРЕН И КЕФИРОВ НА ИХ ОСНОВЕ

© 2022 г. Дин Фань^{a, b}, Л. Г. Стоянова^{a, *}, А. И. Нетрусов^{a, c}

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^bУниверситет МГУ-ППИ в Шэньчжэне (Shenzhen MSU-BIT University), Шэньчжэнь, КНР

^cВысшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, 101000 Россия

*e-mail: stoyanova@mail.ru

Поступила в редакцию 20.03.2022 г.

После доработки 24.03.2022 г.

Принята к публикации 24.03.2022 г.

Кефир – полезный продукт смешанного молочнокислого и спиртового брожения, производимый с использованием эволюционно сложившихся ассоциативных культур, собранных в агрегированное состояние, называемое кефирными зёрнами. В обзоре дана общая характеристика кефирных зёрен из территориальных зон разных континентов (России, Европы, Азии и Америки), методы дифференциации и идентификации отдельных видов, а также взаимодействие в сообществе. Показано разнообразие их микробного состава в зависимости от местных условий культивирования, процессов хранения. Микробы, присутствующие в кефире, обладают рядом свойств, определяющих их метаболизм, взаимодействие в сообществе, благотворное воздействие на здоровье человека, его иммунную систему, что имеет важное значение для профилактики и борьбы с бактериальными и вирусными инфекциями, особенно в период пандемии COVID-19.

Ключевые слова: кефир, кефирные зёрна, микробиота, дифференциация, идентификация, взаимодействие в сообществе, метабиотические свойства

DOI: 10.31857/S0026365622100214

В условиях пандемии организм человека подвергается воздействию вирусной атаки и целого комплекса неблагоприятных факторов, влияющих на нормальное функционирование основных систем жизнедеятельности, что вызывает нарушение баланса кишечного микробиома и снижение иммунитета. Противостоят изменениям микробного состава организма под воздействием

экологических, лекарственных и других стрессовых агентов можно, обогатив микробиоту желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) полезными микробами, вносимыми извне (Шендеров, 2014). Это открытие дало импульс развитию целого направления в микробиологии – учению о пробиотиках – живых микроорганизмах, которые, попадая в организм при приеме пищи в определенных количествах, оказывают благотворный эффект на здоровье человека и животных (Meier, Steuerwald, 2005; Олескин и соавт., 2020). Последние десятилетия прошлого века и начало нынешнего характеризуются интенсивным развитием нутрициологии как науки о питании здорового человека, создании продуктов функционального питания с пробиотической микробиотой, заданными целебными свойствами. Нутрицевтики включают биологически активные вещества, которые оказывают благотворное влияние на организм человека, а также существенно влияют на профилактику некоторых заболеваний (Shenderov, 2014; Олескин и соавт., 2020). В 1998 г. создан центр функционального питания (FFC), который является ведущей мировой организацией по обучению науке о функциональном питании, и проведено 29 меж-

Список сокращений: АТФ – аденозиндифосфорная кислота; БГКП – бактерии группы кишечной палочки; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ман-ФТС – фосфотрансферная система маннозы; МКБ – молочнокислые бактерии; ПДГ – пируватдегидрогеназа; ПФЛ – пируват-формиацетилаза; РНК – рибонуклеиновая кислота; ФТС – фосфотрансферная система; ФГК – фосфоглицериновая кислота; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; ЭПС – экзополисахариды; α -АЛС – α -ацетиллактатсинтаза; CD4 – сигнализирует о процессе инфекционного или аллергического свойства; CD8 – говорит о рисках развития онкологического процесса; CD4/CD8 – иммунорегуляторный индекс; ИЛ-1 – интерлейкин-1, цитокин, медиатор воспаления и иммунитета; ИЛ-6 – интерлейкин-6, индуцирует рост и дифференцировку Т-клеток; IgA – иммуноглобулин класса А – гликопротеин, является показателем гуморального иммунитета; IgG – иммуноглобулин, белковые соединения плазмы крови, антитела как ответ на инфицирование.

дународных конференций по функциональным продуктам питания и биологически активным добавкам к пище. Публикации периодически выходят в четырех журналах с открытым доступом: FFHDJ более 11 лет, BCHD более 4 лет, FFS более 6 мес. и DSN – новый журнал. Издано 38 книг, в том числе 9 учебников по функциональному питанию, более 150 печатных изданий, 30 полугодовых изданий. Создание Академического общества функциональных пищевых продуктов и биоактивных соединений (ASFFBC) насчитывает более 7000 членов. Науки о питании больного (диетология) и здорового человека (нутрициология) известны с давних времен. В старинных рукописях имеются указания на то, что еще до нашей эры египтяне, греки, евреи, римляне, арабские народности применяли различные пищевые продукты для лечения и предупреждения болезней (Farnworth, 2005). Кефир – полезный и питательный продукт с уникальными органолептическими свойствами, положительно влияющий на здоровье человека. Этот продукт отличается от других кисломолочных продуктов тем, что не является результатом метаболической активности одного или родственных видов микроорганизмов, а производится с использованием сложного, естественно сложившегося микробного сообщества, называемым кефирными зернами. Микробный состав кефирных зерен не стабилен, что влияет на качество и оздоравливающий эффект кефира (Stadie et al., 2013). Однако экспериментальные данные по структуре микробного сообщества кефира и трофических взаимоотношений компонентов сложившегося консорциума противоречивы и не позволяют разработать концептуальную модель, что могло бы расширить общие представления о структуре микробиома кефира.

Цель настоящего обзора состояла в сборе научной информации о составе кефирных зерен, взаимоотношений в сложном микробном сообществе, необходимой для разработки способов управления стабильностью состава кефирных зерен и создания на их основе продуктов функционального питания и фармацевтических препаратов, полезных для здоровья человека.

Характеристика кефира

Изготовление кефира берет свое начало на Кавказе, в тибетских или монгольских горах, где до 2000 г. до нашей эры кефирное зерно традиционно передавалось из поколения в поколение среди племен, считаясь источником семейного богатства. Название “кефир” происходит от турецкого “Kefir”, что означает “благополучие” или “жить хорошо” из-за общего чувства здоровья и благополучия, возникающего у тех, кто его потребляет (Farnworth et al., 2008). Это кисломолочный продукт, полученный в результате комбинированного молочнокислого и спиртового сбра-

живания лактозы в молоке. Кефир получают путем посева “кефирных зерен”, имеющих относительно стабильный и специфический баланс бактерий и дрожжей, в молоко, которое также представляет собой источник биологически активных соединений. Однако отмечено, что усвояемость молока в организме человека составляет 32%, а кисломолочные напитки, например, кефир, усваиваются полностью. Характеристика кефира как продукта включает основные показатели: кислотность продукта (рН 4.6), содержание спирта (0.5–2%), органолептические показатели – кислый вкус и дрожжевой аромат. Рекомендуемые стандарты качества кефира: содержание белка – не менее 2.8%, жира – менее 10% и не менее 0.6% молочной кислоты (ГОСТ 31454-2012). Также в составе кефира обнаруживаются и второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, влияющие на вкусовую композицию (Градова и соавт., 2014). Химический состав кефира отражает его пищевую ценность. Многочисленные виды бактерий, содержащиеся в кефире, обладают высоким пробиотическим потенциалом, включая ингибирующее действие на патогенные и гнилостные микробы, устойчивость к стрессовым условиям ЖКТ (низкому рН и солям желчи), адгезивные свойства, что является следствием синтеза экзополисахаридов, по своей структуре аналогичных экзополисахариду кефирану (Еникеев, 2011; Градова и соавт., 2014). Сильнейший антисептик, содержащийся в этом напитке, – это молочная кислота. Несмотря на пробиотическую природу самого кефира, его можно дополнять культурами микроорганизмов, чтобы обеспечить достаточное ежедневное потребление пробиотиков по целевому назначению (Farag et al., 2020). Для производства кефира используют закваски, представляющие собой естественно сложившиеся микробные сообщества, называемые кефирными зернами. В соответствии с современными требованиями нормативно-технической документации (ГОСТ 31454-2012), продукт может называться кефиром, если он произведен с использованием закваски, приготовленной на кефирных зернах без добавления чистых культур молочнокислых микроорганизмов и дрожжей, при этом содержание молочнокислых микроорганизмов в готовом продукте в конце срока годности составляет не менее 10^7 КОЕ в 1 г продукта, а дрожжей – не менее 10^4 КОЕ в 1 г продукта.

Кефирные зерна: структура и функции

Кефирные зерна представляют собой дискретные структуры, состоящие из белка (4–5%), полисахарида (9–10%), называемого кефираном, в которых содержится сложная микробиота (Leite et al., 2013; Градова и соавт., 2014). Их можно описать как студенистые белые или слегка желтова-

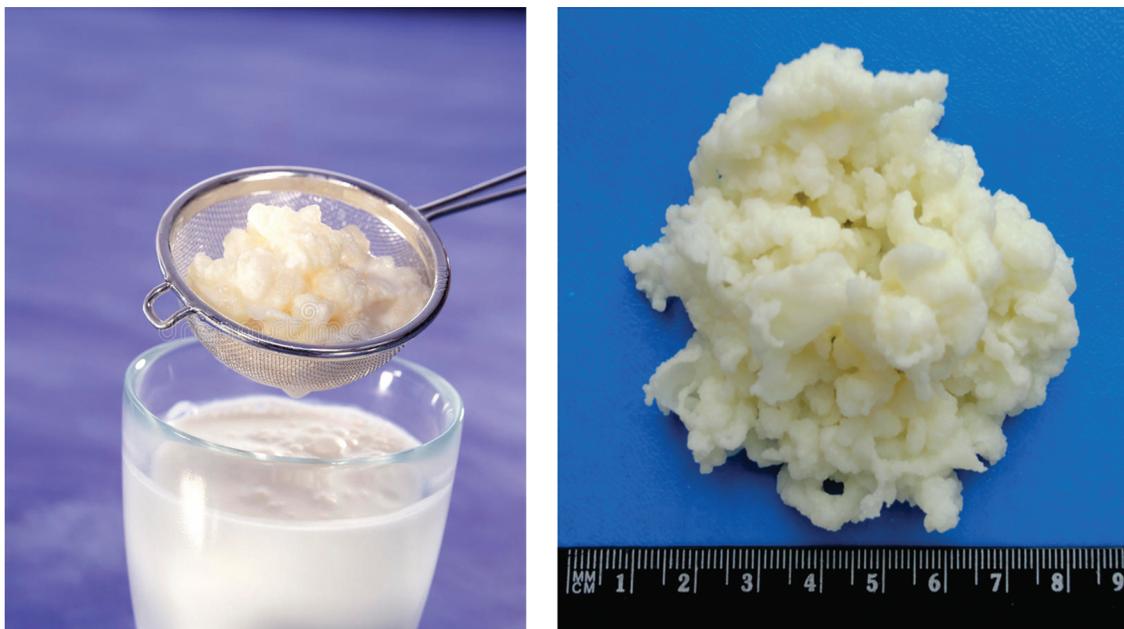


Рис. 1. Кефир и кефирное зерно (по Leitte et al., 2013).

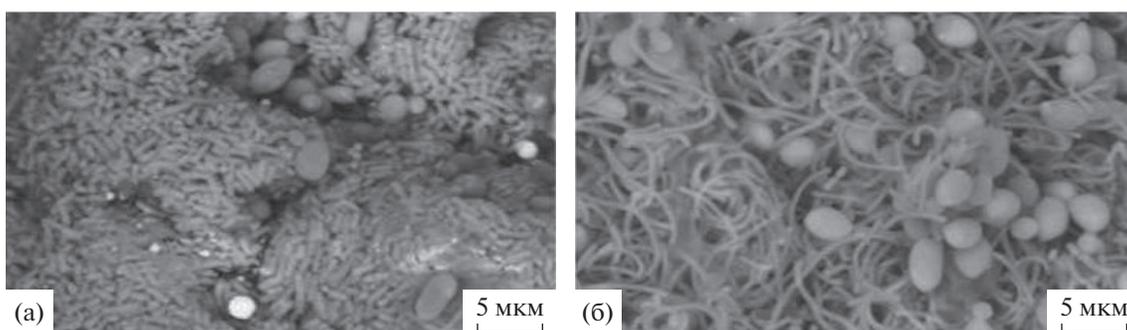


Рис. 2. Микроструктура кефирных зерен в электронном сканирующем микроскопе (JSM-7600F, Япония): наружный слой кефирного зерна (а); внутренний слой (б) (по Wang et al., 2012).

тые нерегулярные массы с эластичной консистенцией и размером от 0.3 до 3.5 см в диаметре (рис. 1, 2). Изучение кефирных зерен в микроскопе показало, что поверхности зерен кефира были гладкими, бугристыми и имели желатиновое матричное вещество, которое покрывало скопления клеток сверху в виде тонкой полисахаридной пленки.

Микробиота кефирных зерен представлена кокками и короткими и длинными палочками, которые находятся в тесном соседстве с дрожжевыми клетками вытянутой формы. Короткие палочки, предположительно *Lactobacillus kefir*, расположены ближе к поверхности стромы, а длинные и изогнутые тонкие палочки, такие как *Lactobacillus kefiranofaciens* – по всему объему матрикса, и концентрация их увеличивается к центру. Кокки, преимущественно, располагаются на поверхно-

сти дрожжевых клеток, в то время как палочки находятся в пространстве между дрожжевыми клетками. Дрожжи наиболее прочно связаны со стромой кефирных зерен, они концентрируются как в центре зерна, так и на поверхности. Плотность расположения микробных клеток во внутренней части кефирных зерен ниже, чем на поверхности (Wang et al., 2012). Количество микроорганизмов на поверхности и внутри зерен зависит от их отношения к кислороду, а также связано с различиями значений pH. Внутри зерен очень низкое значение pH, что ингибирует рост лактококков. В связи со слабой адгезирующей способностью лактококков *L. lactis*, многие исследователи при использовании электронной микроскопии не обнаруживали их присутствие в составе кефирных зерен, несмотря на то, что *L. lactis* определяли как один из доминирующих видов в тех же зернах при использова-

нии других методов выделения (Cheirsilp et al., 2003; Jianzhong et al., 2009).

Точный микробный состав кефирных зерен до сих пор остается спорным. В кефирах на основе зерна было обнаружено до 50 различных видов бактерий и дрожжей, выделенных из кефиров разных мест производства (Pogačić et al., 2013). Наиболее распространенными бактериальными родами в зернах кефира из молока являются МКБ, на долю которых приходится около 37–90% микробной популяции (Yüksekdağ et al., 2004; Miguel et al., 2010; Zanirati et al., 2015), но имеются и уксуснокислые бактерии, дрожжи и грибки (Witthuhn et al., 2005; Yang et al., 2007; Mayo et al., 2012; Gao et al., 2012, 2013). Различные сообщения (Prado et al., 2001; Kotova et al., 2016) свидетельствуют о том, что микробный состав кефирного зерна в значительной степени зависит от происхождения зерна, местных условий культивирования (табл. 1).

Из молочнокислых бактерий преобладающими видами являются лактобациллы, такие как *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. plantarum* и *L. kefirifaciens*, составляющие лишь 20% от общего количества МКБ (Gao et al., 2007; Wang et al., 2012; Zanirati et al., 2015), но встречаются мезофильные гомоферментативные лактококки *Lactococcus* spp. (Magalhaes et al., 2011; Garofalo et al., 2015), термофилы *Streptococcus thermophilus* (Simova et al., 2002; Kok-Tas et al., 2012; Guzel-Seydium, 2015), виды гетероферментативных лактобацилл и лейконостоков *Leuconostoc* spp. — стрептококков, продуцирующих молочную и уксусную кислоты, углекислый газ, этиловый спирт, декстран и ароматические вещества ацетоин и диацетил (Diosma et al., 2014; Walsh et al., 2016). В Китае выделены уксуснокислые бактерии, например, *Acetobacter fabarum* (Yang et al., 2007; Jianzhong et al., 2009; Gao et al., 2012), а *Acetobacter pasteurianus* — из кефиров, выработанных в странах Европы (Франция, Бельгия, Италия, Швейцария (Kok-Tas et al., 2012; Garofalo et al., 2015; Korsak et al., 2015). Уксуснокислые бактерии, выделенные из молочных продуктов, относятся к роду *Acetobacter*, являются подвижными грамотрицательными палочками, которые располагаются поодиночке, попарно, цепочками. У некоторых штаммов могут присутствовать инволюционные формы: сферические, изогнутые, нитевидные и т.д. Спор и капсул не образуют. Окисляют спирт до уксусной кислоты в аэробных условиях (так называемое уксуснокислое брожение), некоторые могут окислять ацетат и лактат до CO₂ и H₂O, лактозу не гидролизуют (Montaghi et al., 1997).

В составе микробиоты кефиров производства китайских и турецких фирм обнаружены энтерококки *E. durans* (Yang et al., 2007; Kesmen, Kasmaz,

2011). Многочисленная группа молочнокислых бактерий рода *Enterococcus*, включающая *E. durans*, ранее относилась к стрептококкам серологической группы D и E; они колонизируют кишечник человека в первые недели его жизни и являются незаменимой культурой, участвующей в процессах переработки пищи (Сычева, Карташова, 2015).

Кефир отличается от других кисломолочных продуктов тем, что он не является результатом метаболической активности одного или нескольких видов микроорганизмов.

В состав кефирного зерна входят различные виды сбраживающих и не сбраживающих лактозу, спорообразующих и неспорообразующих дрожжей (по разным данным от 4 до 30 разных видов), среди которых наиболее часто упоминаются *Kluveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torulospora delbrueckii*, *Pichia fermentans* и синонимы названий этих видов (табл. 2). Однако преобладающими видами являются *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefir* и *Kluveromyces marxianus* ssp. *marxianus* (Fleet, 1990; Assadi, 2000; Loretan et al., 2003; Witthuhn et al., 2004, 2005; Kok-Tas et al., 2012; Diosma et al., 2014). Особенность, которая отличает кефир от других кисломолочных продуктов, заключается в том, что в зернах кефира содержится много дрожжей (Tamang et al., 2016). Дрожжи признаны играющими ключевую роль в приготовлении ферментированных молочных продуктов, где они обеспечивают необходимые питательные вещества для роста, такие как аминокислоты и витамины, изменяют pH, выделяют этанол и производят CO₂. Дрожжи в кефире изучены менее, чем бактерии, хотя дрожжи в зернах явно обеспечивают среду, благоприятную для роста бактерий кефира, производя метаболиты, которые способствуют аромату и органолептическим свойствам (Farnworth, 2005). Более 23 различных видов дрожжей были выделены из зерен кефира и из ферментированных напитков различного происхождения.

Дифференциация и идентификация микробиома кефирных зерен

Первоначальная дифференциация микроорганизмов сообщества включает комплекс фенотипических признаков, основанных на изучении морфологических и физиолого-биохимических свойств. Наиболее распространенными бактериями в зернах кефира и кефире являются МКБ, на долю которых приходится от 37 до 90% микробной популяции. Эти виды микроорганизмов подразделяются на четыре группы: гомоферментативные и гетероферментативные молочнокислые бактерии и дрожжи, ассимилирующие и не ассимилирующие лактозу (Gao et al., 2012). Анаэробное культивирование при выделении чистых культур

Таблица 1. Бактериальный состав кефирных зерен, выделенный из кефиров разных производителей

Бактериальный компонент	Источник – страна	Ссылка
<i>Lactobacillus</i> : <i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. parakefir</i> ; <i>Lactococcus</i> : <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	Аргентина	Garrote et al., 2001 Londero et al., 2012 Hamet et al., 2013 Diosma et al., 2014
<i>Lactobacillus</i> : <i>L. brevis</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplanatarum</i> ; <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Болгария	Simova et al., 2002
<i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. plantarum</i> ; <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp.	Южная Африка	Witthuhn et al., 2004 Witthuhn et al., 2005
<i>Lactococcus</i> : <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus durans</i> <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus</i> : <i>L. lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus</i> : <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Турция	Yüksekdağ et al., 2004 Guzel-Seydim et al., 2005 Kesmen, Kacmaz, 2011 Kok-Tas et al., 2012 Nalbantoglu et al., 2014
<i>Lactobacillus</i> : <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. parakefir</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.	Россия	Mainville et al., 2006 Kotova et al., 2016
<i>Enterococcus durans</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. kefir</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. helveticus</i> <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Lactococcus</i> sp., <i>L. lactis</i> , <i>Acetobacter fabarum</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Китай	Yang et al., 2007 Jianzhong et al., 2009 Gao et al., 2012 Gao et al., 2013
<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. paracasei</i> и <i>L. helveticus</i> , <i>Gluconobacter japonicus</i> , <i>Lactobacillus</i> : <i>L. uvarum</i> , <i>L. satsumensis</i> , <i>L. amylovorus</i> <i>L. buchneri</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. parakefir</i> ; <i>L. kefiranofaciens</i> ssp. <i>kefiranofaciens</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> ssp. <i>kefirgranum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>L. casei</i> ; <i>Leuconostoc</i> sp.	Бразилия	Miguel et al., 2010 Leite et al., 2012 Zanirati et al., 2015 Magalhães et al., 2011
<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> ; <i>Lactococcus lactis</i>	Италия	Garofalo et al., 2015
<i>Lactobacillus</i> : <i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> и <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Бельгия	Korsak et al., 2015
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> и <i>L. kefir</i>	Малайзия	Zamberi et al., 2016
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Acetobacter pasteurianus</i>	Франция, Ирландия и Англия	Walsh et al., 2016

Таблица 2. Дрожжевые компоненты, выделенные из кефиров разных стран

Дрожжевой компонент	Источник – страна	Ссылка
<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Issatchenkia occidentalis</i>	Аргентина	Garrote et al., 1997 Garrote et al., 1998 Garrote et al., 2001 Diosma et al., 2014
<i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida maris</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Болгария	Simova et al., 2002
<i>Candida kefyр</i> , <i>Saccharomyces fragilis</i> , <i>Saccharomyces lactis</i>	Иран	Motaghi et al., 1997
<i>Kazachstania aerobia</i> , <i>Lachancea meyersii</i>	Бразилия	Magalhaes et al., 2011a
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Torulaspора delbrus</i> , <i>Torulaspора delbrueckii</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida holmii</i> , <i>Candida kefyр</i> , <i>Candida lambica</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Cryptococcus humicolus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Южная Африка	Loretan et al., 2003 Witthuhn et al., 2004 Witthuhn et al., 2005
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Турция	Kok-Tas et al., 2012
<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida holmii</i> , <i>Candida kefyр</i> <i>Candida lambica</i> , <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida tenuis</i> , <i>Candida valida</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Issatchenkia occidentalis</i> <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces delbrueckii</i> <i>Saccharomyces exiguous</i> <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Швейцария	Fröhlich-Wyder, 2003 Fleet, 1990

Таблица 2. Окончание

Дрожжевой компонент	Источник – страна	Ссылка
<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida friedrichii</i> , <i>Candida holmii</i> <i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida kefyр</i> <i>Candida lambica</i> , <i>Candida maris</i> <i>Candida tenuis</i> , <i>Candida valida</i> <i>Candida tannotelerans</i> <i>Issatchenkia occidentalis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces dairensis</i> <i>Saccharomyces delbrueckii</i> <i>Saccharomyces exiguous</i> <i>Saccharomyces turicensis</i>	Канада	Farnworth, 2005
<i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Candida famata</i> , <i>Candida firmetaria</i> <i>Candida friedrichii</i> , <i>Candida humilis</i> <i>Candida inconspicua</i> , <i>Candida kefyр</i> <i>Candida krusei</i> , <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida maris</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Cryptococcus humicolus</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Dekkera anomala</i> <i>Galactomyces geotrichum</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Kluyveromyces lodderae</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces exiguous</i> <i>Saccharomyces humaticus</i> <i>Saccharomyces pastorianus</i> <i>Saccharomyces turicensis</i> <i>Saccharomyces unispora</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Испания	Lopitz-Otsoa, 2006 Latorre-García et al., 2007
<i>Candida holmii</i> <i>Candida kefyр</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces fragilis</i> <i>Saccharomyces lactis</i>	Индия	Assadi, 2000
<i>Kazakhstania aerobia</i> <i>Kazakhstania salicola</i> <i>Kazakhstania serovazzii</i> <i>Kazakhstania turicensis</i> <i>Kazakhstania unispora</i>	Италия	Garofalo et al., 2015
<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Kazakhstania unispora</i> <i>Kazakhstania exigua</i>	Китай	Jianzhong et al., 2009 Gao et al., 2012 Gao et al., 2013

бактерий проводили анаэробно при комнатной температуре (21°C) на агаризованной среде МРС в чашках Петри (90 мм). В таких условиях культуры вырастают за 3–5 сут. Чистые анаэробные культуры получали методом истощающего штриха. После посева чашки помещали в анаэростат, куда вносили газ-пакет. При применении стандартных микробиологических методов посева на агаризованную среду трудно обеспечить необходимую полноту выделения компонентов кефирных зерен. Морфологические характеристики колоний некоторых микроорганизмов могут быть настолько близки, что их легко принять за идентичные культуры, в то время как колонии, мало различающиеся морфологически, могут быть образованы одним и тем же микроорганизмом (Сычева, Карташова, 2015). Так, например, в неоптимальных или неблагоприятных для роста условиях при длительном воздействии физических, химических, биологических стрессов на микроорганизмы наблюдалось выщепление минорных фенотипов (субпопуляций) молочнокислых бактерий, образование жизнеспособных некультивируемых форм (Pachomov et al., 2018).

МКБ – филогенетически неродственные микроорганизмы, гетерогенные по морфологии: палочковидные и шаровидные (кокки сферической или эллипсоидной формы), которые характеризуют как грамположительные, не образующие капсул, спор (за исключением сем. *Sporolactobacillaceae*), не образуют пигмент, кроме *Leuconostoc citreum*, образующего капсулы и желтый пигмент, не восстанавливают нитраты в нитриты. Каталазо- и оксидазо-отрицательные, лишённые цитохромов, аэро- и кислототолерантные, неподвижные, образующие в качестве конечного метаболита молочную кислоту в различном процентном содержании (Ленглер и соавт., 2005).

Исторически известны бактерии, относящиеся к родам *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium*, но *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* формируют ядро этой группы, а в последнее время к ним были добавлены такие рода как *Oenococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus* (Ленглер и соавт., 2005; Lahtinen et al., 2012; Стоянова, 2017). Род *Lactobacillus* по морфологии характеризуется большим разнообразием – от коротких коккообразных до длинных нитевидных палочек от 0.7–1.1 до 3.0–8.0 мкм, расположенных единично или собранные в цепочки. Часто длина определяется средой выращивания. Использование биохимического метода идентификации при работе со смешанной популяцией микроорганизмов ограничено еще и тем, что после посева пробы жидкой культуры на плотную питательную среду, для установления соотношения бактерий двух разных видов необходимо вы-

делить чистую культуру и исследовать все колонии, выросшие на поверхности среды, что существенно увеличивает экономические и трудовые затраты. Актуальным вопросом является поиск более эффективного метода для решения поставленной задачи. Молекулярно-генетические методы идентификации зарекомендовали себя как надежные и независимые от внешних факторов.

Для идентификации лактобацилл классические микробиологические методы (по культуральным признакам, морфологии, окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы и спектру сбраживаемых углеводов) дополняют молекулярно-генетическими методами на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, используя программное обеспечение MegAlign 6.00 DNASTAR Inc. Однако высокая стабильность нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК не позволяет однозначно идентифицировать близкородственные виды. Среди лактобацилл встречаются многочисленные виды и подвиды филогенетически близких групп *L. casei*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. acidophilus*, трудно поддающихся точной дифференциации, что приводит к поиску новых генетических маркеров. Для использования анализа нуклеотидной последовательности видовой идентификации рекомендовано идентифицировать маркерные гены, анализ которых позволяет оценить связанность всего генома между микроорганизмами (Blaiotta et al., 2008). Анализ генов *groEL*, *rplB* и *rpoB* позволил выявить высокую полиморфность их нуклеотидных последовательностей у представителей филогенетической группы *L. casei* и достоверно идентифицировать фенотипические и генетически близкие виды этой группы лактобацилл (Shvetsov et al., 2011). При этом дискриминационная способность данных генов в несколько раз превышает ген 16S рРНК. Нуклеотидные последовательности были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6.0 (“Applied Biosystems”).

К важным дифференцирующим признакам дрожжей относится их способность окислять и сбраживать различные углеводы, в том числе мальтозу, сахарозу, галактозу, трегалозу и др. Дрожжи способны расти в довольно широком диапазоне рН от 3 до 9, при этом предпочитают кислые среды (рН_{опт} 4.5–5.5). Дрожжи относятся к осмофильным микроорганизмам, некоторые из них способны выдерживать концентрацию сахаров до 55%, соли – до 8%. По способности к ассимиляции лактозы несколько десятков штаммов дрожжей разных таксономических групп предложено разделить на три группы:

I – использующие лактозу и способные вызывать ее брожение;

II – использующие лактозу путем прямого окисления;

III – не использующие лактозу.

Для сравнения микробного профиля кефирных зерен, наряду с классическими методами выделения чистых культур, был использован метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE). Данный метод признан наиболее информативным при сравнении микробных сообществ, поскольку он позволяет изучать микробный профиль без выделения чистых культур. При использовании метода DGGE также не было выявлено принципиальных различий микробного профиля между исследованными образцами кефирных зерен (Mayoa et al., 2012). Доминирующими по степени четкости выраженных полосок являлись 7 видов микроорганизмов. Отмечены некоторые различия среди наиболее малочисленных групп микроорганизмов, образующих трудноразличимые полосы. Таким образом, в результате проведенной работы не было выявлено различий в микробных профилях кефирных зерен, используемых на разных молочных производствах России. Об этом свидетельствуют результаты исследований, проводимых как “с выделением чистых культур” и их последующей идентификацией с помощью анализа гена 16S рРНК, так и метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE) “без выделения чистых культур” (Magalhães et al., 2011; Shevtsov et al., 2011).

Комбинация всех вышеуказанных фено- и генотипических характеристик привела к возникновению нового полифазного метода дифференциации.

С целью молекулярной идентификации выделенных чистых культур бактерий проводили высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК с бактериальными праймерами. ДНК из образцов выделяли с использованием Fast DNA Spin Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Коллекции ампликонов 16S рРНК были получены методом ПЦР с универсальными праймерами к V4 региону по ранее описанной методике (Yang et al., 2007; Mayoa et al., 2012). Были использованы следующие праймеры: 515F (5'-GTGBCAGCMGC-CGCGGТАА-3' (Стоянова, 2017) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTСТААТСС-3' (Karaçali et al., 2018). Секвенирование проводили на приборе MiSeq system (“Illumina”, США) с использованием набора реагентов, считывающих по 150 нуклеотидов с каждого конца. Демультимплексирование, последующая обработка и анализ полученных сиквенсов были проведены с использованием соответствующих скриптов QIIME 2 программного обеспечения ver. 2019.1. Таблица OTU была составлена в программе SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>).

Высокопроизводительное секвенирование дрожжей по области ITS1 комплекса 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S рРНК проводили после амплифи-

цирования ДНК выделенных дрожжей с использованием набора праймеров для ПЦР ITS1F и ITS1R. После амплификации полученные участки очищали магнитными шариками AMPure XP (“Beckman Coulter”, США) и готовили к секвенированию с помощью набора Nextera XT DNA в соответствии с инструкциями производителя (“Illumina”, США).

После каналов UPARSE сиквенсы были собраны, отфильтрованы и дереплицированы. Операционные таксономические единицы (OTUs) были объединены в группы с идентичностью последовательности $\geq 97\%$, из которых были удалены химеры. Таксономическая идентичность была присвоена с использованием BLASTn и справочной базы данных Fittings v. 1-2. Таксономия и операционные таксономические единицы были преобразованы в таблицу с помощью программы biom-format V1.3.1 (Fonseca et al., 2007).

Программное обеспечение MEGAN использовалось для получения таксономической классификации микробов и отображения разнообразия кефирного зерна в соответствии с таксономией NCBI (Zamberi et al., 2016). На рис. 3 показан род *Lactobacillus* как наиболее распространенный (99.03%). Вторым по численности родом в зерне кефира была филлобактерия с общим содержанием 0.11%, за которой следовали ацинетобактер, стрептококк и бактериоиды в следовых количествах. На рис. 4 показано разнообразие кефирного зерна на уровне видов, причем наиболее распространенными видами являются *Lactobacillus kefiranofaciens*, за которыми следует *L. kefir* (91.66 и 2.52% соответственно).

Невозможность объективного определения структуры сообщества кефирных зерен на основании выделения чистых культур показана многими авторами, изучающими ассоциативные культуры.

Метаболические и структурные взаимодействия дрожжей и бактерий

Полученные данные по идентификации позволили сделать вывод, что в кефирных зернах основным продуцентом системы могут быть молочнокислые бактерии, относящиеся к физиологической группе, активно использующих лактозу для молочнокислого брожения. Микроорганизмы, относящиеся к другой группе, используют продукты метаболизма лактозы (глюкозу и галактозу) и могут находиться между собой либо в отношениях пассивного антагонизма, либо кооперации. Изучая молочнокислое брожение в динамике развития культуры было установлено, что химические превращения в среде изменяются по ходу развития. При сбраживании углеводов ясно можно различить две фазы. В первый период (логарифмическая фаза роста бактерий) идет интенсивный синтез белков

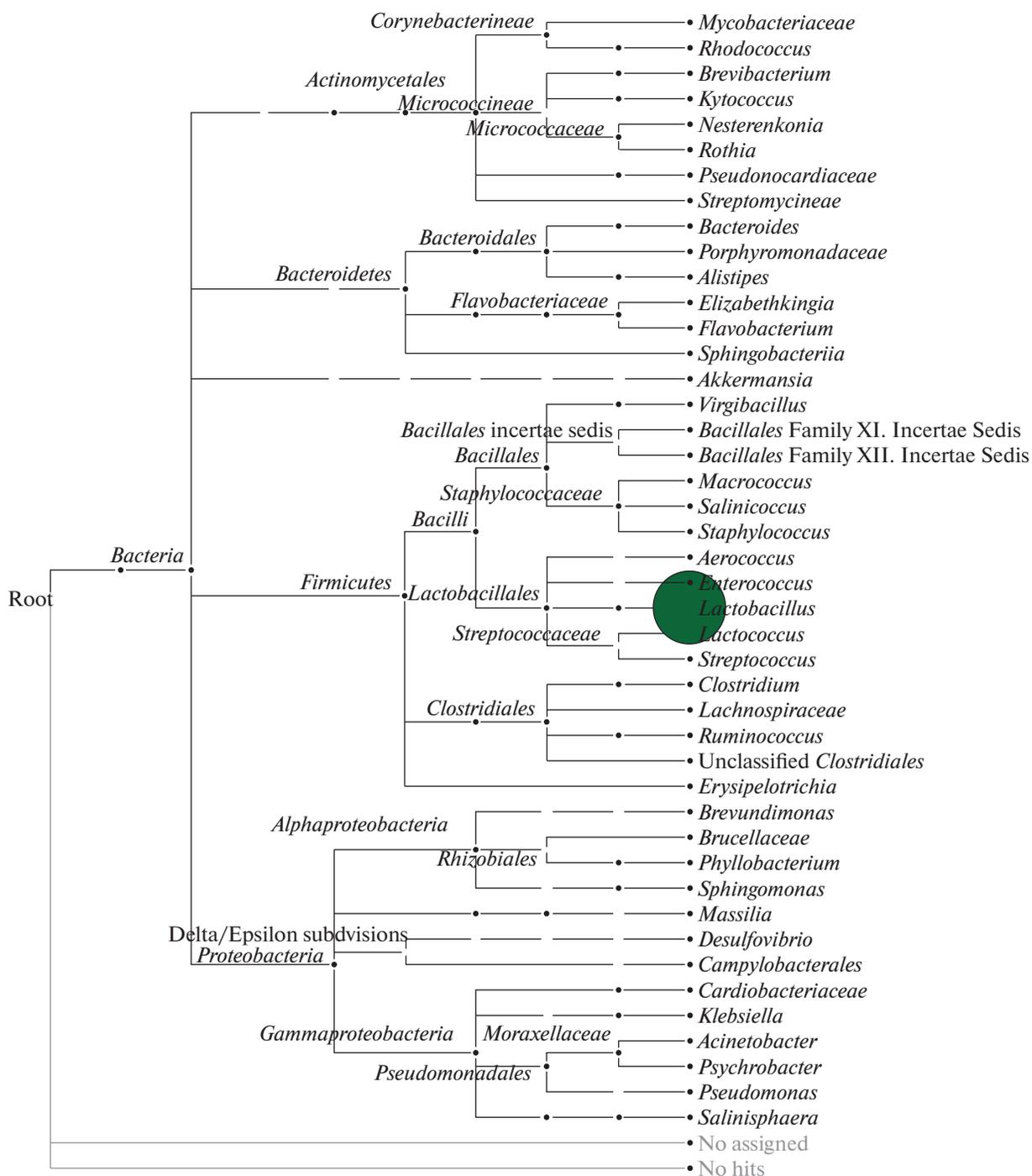


Рис. 3. Таксономическое дерево, полученное в результате анализа MEGAN для кефирного зерна на уровне рода (по Zanirat et al., 2015). Пятно указывает на наиболее распространенный род.

и других веществ клетки, которые являются более восстановленными, чем углеводы. В среде накапливаются более окисленные продукты обмена. Вторая фаза характеризуется замедлением биосинтеза, происходит постепенное снижение окислительно-восстановительного потенциала в культуре, что приводит к ускорению передачи протонов на

ФГК с последующим восстановлением ее в молочную кислоту. Двухфазность отражает перераспределение окислительно-восстановительных реакций по ходу биосинтеза структурных элементов клетки бактерий – конструктивных процессов и брожения – энергетического процесса. Тесные симбиотические отношения молочнокислых бактерий и

дрожжей, стимулирующее действие дрожжей на рост молочнокислых бактерий, показано многими исследователями (Motaghi et al., 1997; Aziza et al., 2012; Стоянова и соавт., 2017).

Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями, а также их зависимость от микробного состава кефирных зерен еще не полностью осознаны. Однако когда бактерии отделяются от зерна, дрожжи не будут расти так эффективно (Cheirsilp et al., 2003; Farnworth, Mainville, 2008; Rattray, O'Connell, 2011). Взаимодействие между дрожжами и МКБ занимает центральное место в широком спектре ферментированных продуктов, в частности, в кефире (Han et al., 2018). Обе группы микроорганизмов естественным образом поддерживают друг друга различными способами.

Усвоение молочной кислоты. Один интересный механизм взаимодействия между дрожжами и МКБ осуществляется в присутствии ассимилирующих молочную кислоту дрожжей. Накопление молочной кислоты повреждает и убивает лактобактерии, даже когда pH культуры поддерживается добавлением щелочных растворов (Katakura et al., 2010). Однако молочная кислота может потребляться в качестве источника углерода дрожжами, не потребляющими лактозу, такими как *S. cerevisiae*, что приводит к повышению pH и длительному росту лактобактерий. Физиологической особенностью МКБ является их кислотоустойчивость, как следствие характерного для них энергетического обмена. Кислотный стресс вызывает внутриклеточное подкисление, которое снижает активность цитоплазматических ферментов (Miyoshi et al., 2013). Транскриптомные и протеомные исследования показали, что многие МКБ повышают уровень активности гликолитических ферментов при кислотном, термическом и осмотическом стрессах, но без увеличения синтеза молочной кислоты. Хотя исследования, посвященные выяснению механизма образования диацетила, проводятся давно, единого мнения о том, как идет биосинтез этого соединения у молочнокислых бактерий до настоящего времени нет. Один из путей образования диацетила — синтез из L-ацетолактата как одного из промежуточных продуктов метаболизма цитрата. Это соединение нестабильное, выделяется бактериальными клетками в среду, где окислительно декарбоксилируется в диацетил и неокислительно — в ацетоин. Другой путь — через конденсацию ацетальдегида-тиаминпирофосфата и ацетил-КоА не признан большинством исследователей, т.к. не выделены ферменты, катализирующие реакции. Ацетат выделяется во внешнюю среду, а оксалоацетат декарбоксилируется с образованием пирувата. Диацетил образуется в реакции ацетил-КоА с “активным ацетальдегидом” (комплекс фермент—оксиэтилтиаминпирофосфат). При восстановлении диацетила ацетоиндегидрогеназой образуется ацетоин (рис. 5).

Лактобациллы, такие как *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* и лактококки *L. lactis* модифицируют метаболизм пирувата за счет молочной кислоты, и, таким образом, увеличивают синтез основных соединений, богатые энергией промежуточные продукты, такие как АТФ и НАД, ЭПС и/или гликоген. Уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которая отвечает за синтез молочной кислоты из пирувата, заметно снижается. Пируватоксидоза и фосфатацетилтрансфераза, используемые для синтеза ацетил-кофермента А (ацетил-КоА), индуцируются у *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *L. rhamnosus* в условиях кислотного стресса. Ацетил-КоА перенаправляется на биосинтез жирных кислот, которые могут усилить прочность и непроницаемость цитоплазматической мембраны (Leile et al., 2013).

Образование CO₂/удаление O₂. Углекислый газ может обеспечить подходящую атмосферу (пониженное содержание кислорода и повышенное содержание CO₂) для роста *Lactobacillus* spp. Несмотря на то, что отсутствуют исследования микроорганизмов, выделенных из кефира, исследования других сообществ и микроорганизмов, выделенных из пищи, подтверждают это взаимодействие. Углекислота, вырабатываемая дрожжами, способствует появлению резкого кислого и дрожжевого вкуса кефира (Karaçali et al., 2018).

Обеспечение бактерий питательными веществами. Трофические взаимодействия и обмен метаболитами (перекрестное питание) позволяют нескольким группам микроорганизмов выживать при ограниченных ресурсах. Было показано, что дрожжи помогают бактериям, обеспечивая их витаминами, факторами роста и незаменимыми аминокислотами (Pahva et al., 2010; Ponomarova et al., 2017). Исследования показали (Stadie et al., 2013), что *Zygorhizopus florentinus* выделяет незаменимые аминокислоты, которые поддерживают рост *L. nagei* при совместном культивировании, но не в том случае, если они культивируются как монокультура.

Для изучения деталей перекрестного питания метаболитами между *S. cerevisiae* и двумя группами МКБ (*Lactobacillus plantarum* или *Lactococcus lactis*) были проведены эксперименты, где в модельных системах с использованием комбинированных метаболических и генетических инструментов (Ponomarova et al., 2017) было замечено, что избыток азота в среде культивирования способствует возникновению мутуализма (форма взаимопользования сожительства, когда присутствие партнера становится обязательным условием существования каждого из них) дрожжей с *L. lactis*. Взаимодействие между *L. lactis* и *S. cerevisiae* легко возникает, когда лактоза является основным источником углерода. Это еще раз подчеркивает тот факт, что состав питательной среды играет важ-

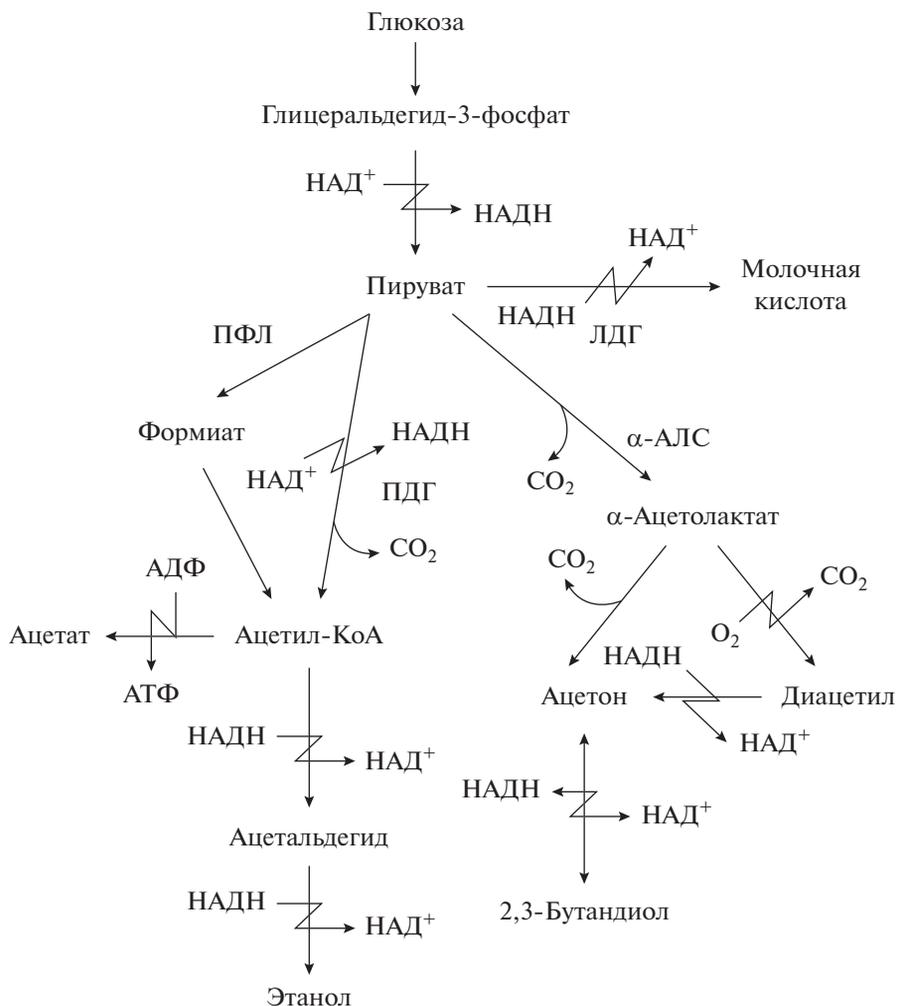


Рис. 5. Сбраживание глюкозы у *Lactococcus lactis* в аэробных условиях (по Miya et al., 2003): ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ПДГ – пируватдегидрогеназа; ПФЛ – пируват-формиатлиаза; α-АЛС – α-ацетолактатсинтаза.

ную роль в формировании межвидовых взаимодействий.

Сложные взаимодействия между дрожжами и бактериями, а также их зависимость в кефирных зернах еще не полностью изучены. Однако когда бактерии отделяются от зерна, дрожжи не будут расти так эффективно (Ratarura et al., 2010). Взаимодействие между дрожжами и МКБ занимает центральное место в широком спектре ферментированных продуктов, в том числе в кефире. Разные группы микроорганизмов естественным образом поддерживают друг друга различными способами (Aziza et al., 2012).

Для определения трофических взаимодействий между микробными компонентами представлены исследования физиологической активности выделенных изолятов из кефирных зерен (около 33 изолятов бактерий и 55 изолятов дрожжей). Выявлено присутствие двух физиологических групп молочнокислых бактерий по их способности

синтезировать фермент β-галактозидазу, необходимую для сбраживания лактозы, и показано, что выделенные дрожжи не обладали β-галактозидазной активностью, не использовали лактозу, а активно использовали глюкозу и с низкой активностью – галактозу, не образовывали сгусток на молоке. Подход, основанный на оценке физиологической активности выделенных изолятов молочнокислых бактерий, позволяет утверждать, что продуцентом системы микробного сообщества являются молочнокислые бактерии, относящиеся к первой физиологической группе, обладающие β-галактозидазной активностью, использующие лактозу для молочнокислого брожения и быстро закисляющие систему. Присутствие в системе нескольких видов молочнокислых бактерий, обладающих β-галактозидазной активностью, говорит о том, что между бактериями этой группы должны существовать определенные регулирующие факторы развития: либо конкурентные взаимоотношения

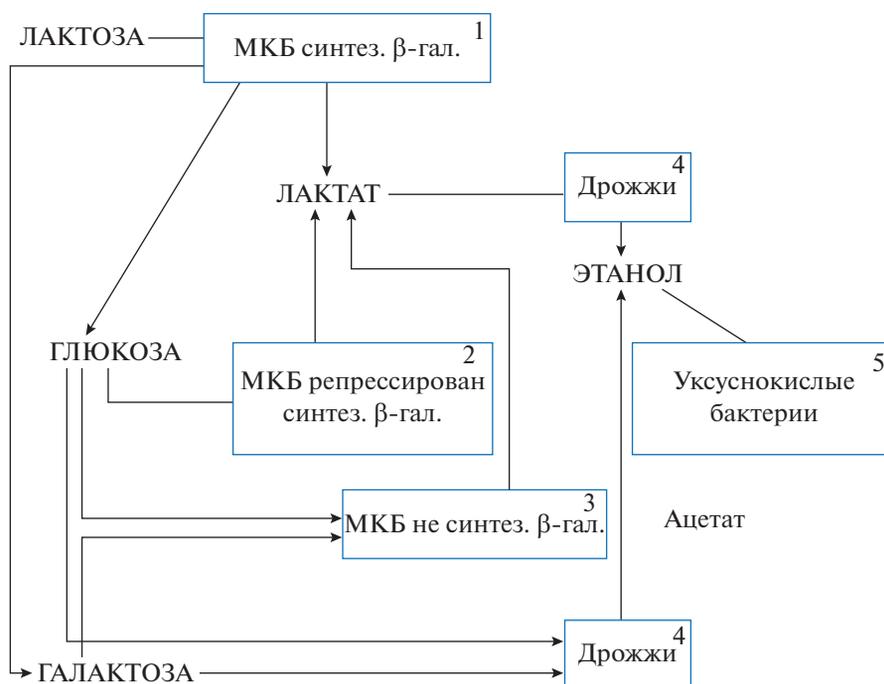


Рис. 6. Общая схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен, сбраживающих и не сбраживающих лактозу (изменено по Cheirsilp, Radchabut, 2011). 1 – молочнокислые бактерии, синтезирующие β -галактозидазу; 2 – молочнокислые бактерии группы 1, у которых синтез β -галактозидазы репрессирован глюкозой; 3 – молочнокислые бактерии, не синтезирующие β -галактозидазу; 4 – дрожжи; 5 – уксуснокислые бактерии.

за субстрат, либо смена основного продуцента в зависимости от условий, в частности, изменение pH среды (Cheirsilp, Radchabut, 2011). Общая схема трофической цепи ассоциативной культуры кефирных зерен, в составе которых входят 3 группы МКБ: синтезирующие и не синтезирующие β -галактозидазу, с репрессивным синтезом β -галактозидазы группа МКБ, а также уксуснокислые бактерии и дрожжи представлена на рис. 6.

В зависимости от среды и условий культивирования микробиота кефирных зерен и кефирной закваски обладает уникальной способностью к саморегуляции. Симбиоз микроорганизмов в кефирных зернах обеспечивает сохранение на всем протяжении года качества кефира и микробного профиля кефирных зерен, лишь с незначительными изменениями соотношений основных групп микроорганизмов. Микробный состав кефира может отличаться от микробного состава кефирных зерен из-за различий в условиях pH, времени культивирования, а также это различие может быть связано с местом нахождения микроорганизмов в зернах. Так, например, молочнокислые бактерии р. *Lactococcus*, располагающиеся на поверхности кефирных зерен, легко десорбируются в культуральную жидкость и поэтому в кефире их достаточно много (Градова и соавт., 2014).

Ферментация и сохранение кефирных зерен

Основным маркером для оценки симбиотических отношений между различными микроорганизмами является увеличение биомассы кефирного зерна во время ферментации. Ассоциативная микробная культура кефирных зерен является устойчивым высокоорганизованным сообществом, обладающим сложными вертикальными и горизонтальными трофическими связями. Основными продуктами брожения углеводов молока при производстве кефира являются молочная кислота, этанол (в низком содержании) и CO_2 , которые придают этому напитку вязкость, кислотность и остроту. Также можно найти второстепенные компоненты, в том числе диацетил, ацетальдегид и аминокислоты, входящие в состав ароматизаторов (Ratray, O'Connell, 2011). Во время брожения зерна увеличиваются в размере и количестве и обычно извлекаются из ферментированного молока и повторно используются. При правильном хранении они могут сохранять свою активность в течение многих лет (Lopitz-Otsoa et al., 2006; Garrote et al., 2010; Ratray, O'Connell, 2011; Leite et al., 2013). Высушенные зерна сохраняют свою активность в течение 12–18 месяцев, в то время как влажные зерна сохраняют активность в течение 8–10 дней. Были протестированы различные методы консервирования, при этом замораживание считается лучшим методом. Лиофилизация зерна также была протестирована, но привела к сниже-

нию метаболизма лактозы, а также изменениям бактериального профиля, который отличался от исходного профиля зерна (Farnworth et al., 2008). Кефир можно употреблять сразу после отделения зерна или хранить в холодильнике для последующего употребления (Ogles et al., 2003). Характеристики ферментированного молока должны сохраняться во время хранения; однако, поскольку может происходить непрерывная метаболическая активность остаточной микробиоты кефира, состав охлажденного кефира может изменяться во время хранения (Gronnevik et al., 2011). Сообщается, что при хранении в холодильнике при температуре 4°C вязкость со временем резко снижается (Magra et al., 2012), в то время как общий жир, лактоза, сухое вещество и pH остаются постоянными до 14 дней хранения (Vieira et al., 2015), а количество молочной кислоты незначительно увеличивается после 7 дней хранения. Хотя липолитическая активность молочного жира в лабораторных условиях ограничена, он все еще может способствовать выработке свободных жирных кислот (Kim et al., 2002).

На производство кефира влияют несколько факторов: сырье, технология производства, условия хранения кефира и используемых кефирных зерен, которые необходимо оптимизировать параллельно для достижения наилучшего качества продукта. Повышение температуры культивирования с 20 до 30°C приводило к увеличению количества дрожжей (от 7.1×10^6 до 10^7 КОЕ/г кефирного зерна и от 1.2×10^5 до 1.7×10^6 КОЕ/мл в закваске), уксуснокислых бактерий (от 10^5 до 10^7 КОЕ/г в зерне и от 4.2×10^4 до 7.0×10^6 КОЕ/мл в закваске) и незначительно влияло на количество мезофильных молочнокислых бактерий в составе кефирных зерен (Schoevers, Britz, 2003; Хохлачева и соавт., 2006).

Однако в составе закваски более высокая температура ферментации 25°C приводила к быстрому снижению значений pH, что вызывало ингибирование роста гомо- и гетероферментативных молочнокислых стрептококков. В закваске, приготовленной при 25°C, отмечено большее количество молочнокислых палочек, чем в закваске, приготовленной при 18–20°C. В результате исследований было обнаружено, что все штаммы, относящиеся к этому виду, могут активно развиваться в температурном интервале 20–30°C, а при 35°C культуры развивались очень слабо (Londero et al., 2012). Все штаммы образуют максимальную биомассу при 25°C. Биомасса, образованная при 25°C, превышает биомассу, образованную при 20°C, в 1.3–1.9 раз, а при 30°C – в 1.2–1.8 раз (Хамагаева, Ванданова, 2006). При встряхивании в процессе культивирования наблюдались увеличение продукции экзополисахаридов культурами кефирного грибка и существенные различия в качественном и количественном составе зерен. Так, при встряхивании снижалось количество дрожжей

и молочнокислых бактерий в кефирных зернах, но при этом значительно увеличивалось содержание углеводов и жиров (Schoevers, Britz, 2003). На основании скрининга полисахарид-синтезирующих молочнокислых бактерий показано, что из 119 исследованных изолятов 60% способны синтезировать экзополисахариды. Из них отобраны 9 изолятов, наиболее активно синтезирующих экзополисахариды. Отмечено повышение активности синтеза экзополисахаридов на среде с сахарозой молочнокислыми бактериями, способными ее сбраживать. Отобраны культуры *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* как наиболее активные продуценты экзополисахаридов при культивировании их на среде с лактозой и сахарозой. При сравнительном исследовании экзополисахаридов из кефирных зерен и синтезированных монокультурами методами ИК-спектроскопии и методом динамического и статистического светорассеивания показана аналогичность структуры ЭПС, но обнаружены различия физико-химических свойств полученных образцов экзополисахаридов с потенциальной пребиотической активностью.

Кефиран – это полисахарид кефирных грибков, который образуется уксуснокислыми бактериями и дрожжами, вовлеченных в процесс сбраживания молока. Он обладает противомикробным и ранозаживляющим свойствами, способностью снижать кровяное давление и уровень холестерина в сыворотке крови. Кефиран в концентрациях 5.9–14.3 г/л способен образовывать криогели, способные плавиться при 37°C, что может найти применение при разработке новых пищевых продуктов. Причем при добавлении сахарозы или фруктозы в разных концентрациях к растворам кефирана можно изменять вязкость полученных гелей (Градова и соавт., 2012; Zavala, 2015). Аэрация при культивировании кефирного зерна в молоке способствовала увеличению продукции экзополисахаридов и вызывала существенные различия в качественном и количественном составе зерен.

Кефирные зерна – это сложный симбиоз нескольких видов микроорганизмов: молочнокислых стрептококков и палочек, уксуснокислых бактерий и дрожжей. С помощью таких зерен можно каждый день получать кефир в домашних условиях. В последнее время популярность среди населения “кефирных зерен” неуклонно растет.

Кефирные зерна увеличивают свою массу в результате роста микроорганизмов и биосинтеза компонентов зерна – белков и полисахаридов. Микробиоту кефирного зерна можно считать биопленкой. Процессы, управляющие образованием биопленки, включают создание поверхности для прочного прикрепления клеток к этой поверхности, межклеточные взаимодействия и рост сложной структуры. Сообщалось о формировании биопленок некоторыми видами и описан ряд генов, которые, как полагают, отвечают за адгезию или образование

био пленки. Образование био пленки может помогает клеткам противостоять стрессу окружающей среды, такому как высокие концентрации кислоты и этанола.

Кефир содержит легкоусвояемые белки. Незаменимые минорные кислоты, в избытке содержащиеся в кефире, регулируют белковый, углеводный и липидный обмен и оказывают положительное влияние на регуляцию массы тела, поддержание иммунного ответа и энергетического баланса. Пептиды проявляют антиоксидантную и антимикробную активность в молочном кефире, полученном в результате протеолиза β -казеина; было обнаружено 236 пептидов, которые проявляли антимикробные, антиоксидантные, ингибирующие ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), иммуномодулирующие и анти тромботические эффекты (Namet et al., 2013; Ebner et al., 2015). Выделенный из тибетского кефира и очищенный пептид F3 проявлял антибактериальные свойства в отношении кишечной палочки и золотистого стафилококка (Miao et al., 2016). Идентифицировано 35 пептидов из кефира, приготовленного из коровьего молока, которые проявляли антигипертензивный эффект, опосредованный ингибированием активности АПФ (Amorim et al., 2019). Продукт богат аминокислотами, такими как серин, треонин, аланин, лизин, валин, изолейцин, метионин, фенилаланин и триптофан, которые играют важную роль в центральной нервной системе, а также содержит метаболиты, которые способствуют перевариванию казеина и усвоению его организмом (Bensmira et al., 2015).

Известно, что пробиотические культуры кефира могут регулировать иммунную систему для подавления вирусных инфекций. Противовирусный механизм кефира включает усиленную продукцию макрофагов, усиленный фагоцитоз, повышенную продукцию с положительной дифференциацией CD4+/CD8+ как биомаркер ответа на лечение, иммуноглобулинов (IgG+ и IgA+), В-клеток, Т-клеток, нейтрофилов, определенная часть которых при необходимости способны вырабатывать антитела. Молочнокислые бактерии из кефира повышают цитотоксичность натуральных клеток-киллеров по отношению к опухолевым клеткам (Yamane et al., 2018). Кефир может действовать как противовоспалительное средство за счет снижения экспрессии интерлейкинов IL-1 и IL-6, синтезируемых макрофагами и Т-клетками и стимулирующих иммунный ответ, а интерфероны IFN- α и II типа (IFN- γ) индуцируют анти вирусную защиту. Под влиянием чужеродных антигенов вырабатывается повышенное количество цитокинов — медиаторов воспалительного процесса, выполняющих регуляторные функции, которые, в свою очередь, продуцируют повышенное образование IL-6, вызывают активацию Т-лимфоцитов и других иммунных клеток и их

миграцию, приводящее к развитию признаков “цитокинового шторма” при коронавирусной инфекции. Поэтому кефир может быть важным ингибитором “цитокиновой бури”, способствующей развитию COVID-19 (Nakagaki et al., 2018; Boyoglu-Barnum et al., 2019; Bornstein et al., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с ухудшением эпидемиологической обстановки в мире увеличился спрос на продукты и безопасные препараты, полезные для здоровья. Традиционные кисломолочные продукты смешанного молочнокислого и спиртового брожения, включая кефир, с древних времен зарекомендовали себя как средство для борьбы с инфекциями и преждевременной старостью. Ферментация молока с целью получения кефира — это процесс общего метаболизма симбиотических культур микроорганизмов, способствующих формированию и стабильности микроэкологии кефирных зерен. Из анализа литературных данных следует, что, несмотря на некоторые отличия в количественных соотношениях, в кефирных зернах практически постоянно присутствуют четыре основные группы микроорганизмов: молочнокислые палочки, молочнокислые кокки, дрожжи и уксуснокислые бактерии. Каково синергетическое или антагонистическое влияние этих микробов друг на друга в процессе метаболизма смешанных бактерий? Можно ли определить один или несколько показательных микроорганизмов или показательных метаболитов для количественной оценки и оценки состояния ферментации кефирных бактерий? Ответы на эти вопросы не только закладывают теоретическую основу для изучения кефирных сообществ, но и служат руководством для исследования многих других микробных консорциумов. Противоречивы данные, позволяющие разработать концептуальную модель, включающую исследование микробного состава и трофических взаимоотношений компонентов сложившегося консорциума кефирных зерен, что является необходимым для конструирования новых сообществ и разработки способов управления стабильностью состава кефирных зерен при создании на их основе других продуктов функционального питания и фармацевтических препаратов, полезных для здоровья человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке правительства провинции Шэньчжэнь и Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне и в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ № 23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7).

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

ГОСТ 31454-2012. Кефир. Технические условия. gost-31454-2012.

Градова Н.Б., Хохлачева А.А., Мурзина Е.Д., Мясоедова В.В. Микробные компоненты кефирных грибов, как продуценты экзополисахарида кефирана // Биотехнология. 2014. № 6. С. 18–26.

Gradova N.B., Khokhlacheva A.A., Murzina E.D., Myasoe-dova V.V. Microbial components of kefir fungi, as a producer of kefiran exopolysaccharide // Biotechnology. 2014. № 6. P. 18–26.

Еникеев Р.Р. Описание, биосинтез и биологическое действие полисахарида кефирных грибов – кефирана // Биофармацевтический журн. 2011. Т. 3. № 3. С. 11–18.

Yenikeyev R.R. Description, biosynthesis and biological effect of kefir fungi polysaccharide – kefiran // Biopharmaceutical J. 2011. V. 3. № 3. P. 11–18.

Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты. М.: Мир, 2005. 656 с.

Lengeler J., Drews G., Schlegel G. (eds.) Biology of Prokaryotes. Wiley-Blackwell, 1999. 984 p.

Олескин А.В., Шендеров Б.А. Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2020. Т. 2. № 3. С. 233–243.

Oleskin A.V., Shenderov B.A. Probiotics, prebiotics and metabiotics: problems and prospects // Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation. V. 2. № 3. P. 233–243.

Стоянова Л.Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2017. № 5. С. 41–61.

Stoyanova L.G. Isolation and identification of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with antimicrobial action // News of the Timiryazev Agricultural Academy. 2017. № 5. P. 41–61.

Сычева М.В., Карташова О.Л. Биологические свойства энтерококков различного происхождения // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2015. № 4. С. 17–21.

Sycheva M.V., Kartashova O.L. Biological properties of enterococci of various origins // J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2015. № 4. P. 17–21.

Хамагаева И.С., Ванданова Е.В. Подбор условий культивирования симбиотической закваски для производства кефира // Пищевая и перерабатывающая промышленность. Реферативный журн. 2006. № 2. С. 95–98.

Khatmagayeva I.S., Vandanova Ye.V. Selection of conditions for the cultivation of symbiotic starter culture for the production of kefir // Food and Processing Industry. Abstract J. 2006. № 2. P. 95–98.

Хохлачева А.А., Егорова М.А., Калинина А.Н., Градова Н.Б. Трофические закономерности функционирования и

микробный профиль эволюционно сложившейся ассоциативной культуры кефирных зерен // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 466–447.

Khokhlacheva A.A., Egorova M.A., Kalinina A.N., Gradova N.B. Trophic patterns of functioning and microbial profile of an evolutionarily established associative culture of kefir grains // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 561–569.

Шендеров Б.А. Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья // Метаморфозы. 2014. № 5. С. 72–80.

Shenderov B.A. Microbial ecology of man and its role in maintaining health // Metamorphoses. 2014. № 5. P. 72–80.

Amorim F.G., Coitinh L.B., Dias A.T., Friques A.G.F., Monteiro B.L., Rezende L.C.D., Pereira Th.M.C., Campagnaro B.P., Pauw E.D., Vasquez E.C., Quinton L. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteoepitidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules // Food Chem. 2019. V. 282. P. 109–119.

Assad M.M., Pourahmad R., Moazami N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production // World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 16. P. 541–543.

Aziza M., Amrane A. Diauxic growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on amino acids and glucose // Braz. J. Chem. Engin. 2012. V. 29. P. 203–210.

Bornstein S.R., Rubin O.F., Khuntii K., Mingrone G., Hopkins D., Birkenfeld A.L., Boehm B., Amiel S., Holt R.I., Skyler J.S. et al. Practical recommendations for the management of diabetes in patients with COVID-19 // Lancet. Diabetes Endocrinol. Published online. April 23, 2020.

Bourrie B.C.T., Willing B.P., Cotter P.D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 647–664.

Boyoglu-Barnum S., Chirkova T., Anderson L.J. Biology of infection and disease pathogenesis to guide RSV vaccine development // Front. Immunol. 2019. V. 10. Art. 1675. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01675>

Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biotechnol. 2003. V. 100. P. 43–53.

Diosma G., Romanin D.E., Rey-Burusco M.F., Londero A., Garrote G.L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 30. P. 43–53.

Ebner J., Asgi Arslan A., Fedorova M., Hoffmann R., Kugukgetin A., Pischetsrieder M. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains // J. Proteomics. 2015. V. 117. P. 41–57.

Fleet G.H. Growth of yeasts during wine fermentation // J. Wine Res. 1990. P. 211–223.

Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanh J., Mingsheng D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis // Food Microbiol. 2009. V. 26. P. 770–775.

Farag M.A., Jomaa S.A., El-Wahed A.A. The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety // Nutrients. 2020. V. 12. P. 346–359.

Farnworth E.R., Mainville I. Kefir – a fermented milk product // Handbook of Fermented Functional Foods / Ed. Farnworth E.R. 2th edn. 2008. № 2. P. 89–127.

Farnworth E.R. Kefir a complex probiotic // Food Science and Technology Bull.: Functional Foods. 2005. V. 2. P. 1–17.

Fonseca G.G., Hei Latorre-García L., del Castillo-Agudo L., Polaina J. Taxonomical classification of yeasts isolated from

- kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 785–791.
- Gao J., Gu F., Abdella N.H., Ruan H., He G. Investigation on culturable in Tibetan kefir grains from different areas of China // J. Food Sci. 2012. V. 77. P. 425–433.
- Gao J., Gu F., He J., Xiao J., Chen Q., Ruan H. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains // Eur. Food Res. Technol. 2013. V. 236. P. 549–556.
- Garofalo C., Osimani A., Milanović V., Aquilanti L., De Filippis F., Stellato G. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions // Food Microbiol. 2015. V. 49. P. 123–133.
- Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios // J. Dairy Res. 1998. V. 65. P. 149–154.
- Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains // J. Dairy Res. 2001. V. 68. P. 639–652.
- Guzel-Seydim Z., Wyffels J.T., Seydim A.C., Greene A.K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation // Int. J. Dairy Technol. 2005. V. 58. P. 25–29.
- Hamet M.F., Londero A., Medrano M., Vercammen E., Van H.K., Garrote G.L. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains // Food Microbiol. 2013. V. 36. P. 327–334.
- Jianzhong Z., Xiaoli L., Hanhu J., Mingsheng D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis // Food Microbiol. 2009. V. 26. P. 770–775.
- Katakura Y., Sano R., Hashimoto T., Ninomiya K., Shioya S. Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. P. 319–326.
- Karaçali R., Özdemir N., Çon A.H. Aromatic and functional aspects of kefir produced using soya milk and *Bifidobacterium* species // Int. J. Dairy Technol. 2018. V. 71. P. 921–933.
- Kesmen Z., Kacmaz N. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods // J. Food Sci. 2011. V. 76. P. 276–283.
- Kim Y.J., Liu R.H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria // J. Food Sci. 2002. V. 67. P. 1731–1737.
- Kok-Tas T., Ekinçi F.Y., Guzel-Seydim Z.B. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR // Int. J. Dairy Technol. 2012. V. 65. P. 126–131.
- Korsak N., Taminiu B., Leclerc, M., Nezer C., Crevecoeur S., Ferauche C., Detry E., Delcenserie V., Daube G. Short communication: evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments // J. Dairy Sci. 2015. V. 98. P. 3684–3689.
- Kotova I.B., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. V. 4. P. 93–121.
- Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 4th edn. CRC Press, 2011. 798 p.
- Latorre-García L., del Castillo-Agudo L., Polaina J. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 785–791.
- Leite A.M.O., Leite D.C.A., del Aguila E.M., Alvares T.S., Peixoto R.S., Miguel M.A.I., Silva J.T., Paschoalin V.M.F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes // J. Dairy Sci. 2013. V. 96. P. 4149–4159.
- Leite A.M.O., Miguel M.A., Peixoto R.S., Rosado A.S., Silva J.T., Paschoalin V.M.F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage // Braz. J. Microbiol. 2013. V. 44. P. 341–349.
- Londero A., Hamet M.F., De Antoni G.L., Garrote G.L., Abraham A.G. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterization // J. Dairy Res. 2012. V. 79. P. 262–271.
- Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezabala N., Garaizar J. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities // Rev. Iberoam Micol. 2006. V. 23. P. 67–74.
- Loretan T., Mostert J.F., Viljoen B.C. Microbial flora associated with South African household kefir // South Afr. J. Sci. 2003. V. 99. P. 92–94.
- Machado A., Leite D.O., Antonio M., Miguel L., Peixoto R.S., Rosado A.S., Silva J.T., Margaret V., Paschoalin F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage // Braz. J. Microbiol. 2013. V. 44. P. 341–349.
- Mainville I., Robert N., Lee B., Farnworth E.R. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir // Syst. Appl. Microbiol. 2006. V. 29. P. 59–68.
- Magalhães K.T., Pereira G.V.M., Campos C.R., Dragone G., Schwan R.F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition // Braz. J. Microbiol. 2011. V. 42. P. 693–702.
- Mayoa B., Rachid C.T., Peixoto R.S., Silva J.T., Paschoalin V.M. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis // Food Microbiol. 2012. V. 31. P. 215–221.
- Meier R., Steuerwald M. Place of probiotics // Curr. Opin. Crit. Care. 2005. V. 11. P. 318–325.
- Miao J., Liu G., Ke C., Fan W., Li C., Chen Y., Dixon W., Song M., Cao Y., Xiao H. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli* // Food Control. 2016. V. 65. P. 63–72.
- Mitra S., Ghosh B.C. Quality characteristics of kefir as a carrier for probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG // Int. J. Dairy Technol. 2020. V. 73. P. 384–391.
- Miguel M.G.C.P., Cardoso P.G., Lago L.A., Schwan R.F. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods // Food Res. Int. 2010. V. 43. P. 1523–1528.
- Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J.J., Le Loir Y., Costa Oliveira S., Langella P., Azevedo V. Oxidative stress in *Lactococcus* // Gen. Mol. Res. 2003. V. 3. P. 348–359.
- Motaghi M., Mazaheri M., Moazami N., Farkhondeh A., Fooladi M., Goltapeh E. Kefir production in Iran // World J. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 13. P. 579–581.
- Nakagaki T., Nakano Y., Yamane T., Sakamoto T., Nakagaki T., Nakano Y. Lactic acid bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells // Foods. 2018. V. 7. P. 48.
- Nalbantoglu U., Cakar A., Dogan H., Abaci N., Ustek D., Sayood K. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains // Food Microbiol. 2014. V. 41. P. 42–51.
- Pakhomov Y.D., Blinkova L.P., Dmitrieva O.V., Berdyugina O.S., Stoyanova L.G. Non-culturable and nisin production of *Lactococcus lactis* // J. Bacteriol. Parasitol. 2013. V. 5. P. 2–8.

- Pogačić T., Sinko S., Zamberlin S., Samaržija D. Microbiota of kefir grains // *Mljekarstvo*. 2013. V. 63. P. 3–14.
- Pahwa S., Kaur S., Jain R., Roy N. Design based on the structure of new histidinol dehydrogenase inhibitors from *Geotrichum candidum* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. P. 3972–3976.
- Prado M.R., Blandón L.M., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Castro G.R., Thomaz-Soccol V., Soccol C.R. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 01177.
- Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova T., Frengova G., Spasov Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 28. P. 1–6.
- Schoevers A., Britz T.J. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase // *Int. J. Dairy Techn.* 2003. V. 56. P. 183–187.
- Shevtsov A.B., Kushugulova A.R., Tynybaeva I.K., Kozhakhmetov S.S., Abzhalelov A.B., Momynaliev K.T., Stoyanova L.G. Identification of phenotypically and genotypically related *Lactobacillus* strains based on nucleotide sequence analysis of the *gro EL*, *rpo B*, *rpl B*, and 16S rRNA genes // *Microbiology (Moscow)*. 2011. V. 80. P. 672–681.
- Stadie J., Gulitz A., Ehrmann M.A., Vogel R.F. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir // *Food Microbiol.* 2013. V. 35. P. 92–98.
- Tamang J.P., Watanabe K., Holzapfel W.H. Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 377.
- Walsh A.M., Crispie F., Kilcawley K., O'Sullivan O., O'Sullivan M.G., Claesson M.J., Cotter P.D. Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir // *mSystems*. 2016. V. 1. e00052-16. P. 2–16.
- Wang S.Y., Chen K.N., Lo Y.M., Chiang M.-L., Chen H.-Ch., Liu J.-R., Chen M.-J. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain // *Food Microbiol.* 2012. V. 32. P. 274–285.
- Witthuhn R.C., Schoeman T., Britz T.J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains // *Int. J. Dairy Technol.* 2004. V. 57. P. 33–37.
- Witthuhn R.C., Schoeman T., Britz T.J. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation // *Int. Dairy J.* 2005. V. 15. P. 383–389.
- Yang X.J., Fan M.T., Shi J.L., Dang B. Isolation and identification of preponderant flora in Tibetan kefir // *China Brewing*. 2007. V. 171. P. 52–55.
- Yamane T., Sakamoto T., Nakagaki T., Nakano Y. Lactic acid bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells // *Foods*. 2018. V. 7. P. 1–9.
- Yüksekdağ Z.N., Beyatlı Y., Aslım B. Determination of some characteristic coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic // *Food Sci. Technol.* 2004. V. 37. P. 663–667.
- Zanirati D.F., Abatemarco M., Jr., de Cicco Sandes S.H., Nicoli J.R., Cantini Nunes A., Neumann E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures // *Anaerobe*. 2015. V. 32. P. 70–76.
- Zamperi N.R., Mohamad N.E., Yeap S.K., Ky H., Beh B.K., Liew W.C., Tan S.W., Ho W.Y., Boo S.Y., Chua Y.H. 16S metagenomic microbial composition analysis of kefir grain using megan and basespace // *Food Biotechnol.* 2016. V. 30. P. 219–230.
- Zavala L. Gelling ability of kefir in the presence of sucrose and fructose and physicochemical characterization of the resulting cryogels // *J. Food Sci. Technol.* 2015. V. 52. P. 5039–5047. <https://ngs.arb-silva.de/silvangs>

Microbiome and Metabiotic Properties of Kefir Grains and Kefirs Based on Them

Ding Fan^{1, 2}, L. G. Stoyanova^{1, *}, and A. I. Netrusov^{1, 3}

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

²Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, P.R. China

³Faculty of Biology and Biotechnology, High School of Economics, Moscow, 101000 Russia

*e-mail: stoyanova@mail.ru

Received March 20, 2022; revised March 24, 2022; accepted March 24, 2022

Abstract—The analysis of the literature on the microbiome composition and metabolic properties of kefir available at the RSCI and Web of Science was carried out. Kefir has been used by humans for centuries. It is a useful product of mixed lactic and alcoholic fermentation, produced using evolutionarily established associative cultures, collected in an aggregated state termed kefir grains. General characterization of kefir grains from the territorial zones of different continents (Russia, Europe, Asia, and America) is provided. The methods for differentiation and identification of individual species are described, as well as the interactions there within the community. The diversity of microbial composition of kefir grains depending on local cultivation conditions and storage processes is shown. The microorganisms present in kefir have a number of properties that determine their metabolism, interaction in the community, beneficial effects on human health and immune system, which is important for the prevention and control of bacterial and viral infections, especially during the COVID-19 pandemic.

Keywords: kefir, kefir grains, microbiota, differentiation, identification, community interaction, metabiotic properties

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИВНЕСЕНИЕ ЭКЗОГЕННОГО АКТИВНОГО ИЛА КАК СПОСОБ
ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ УДАЛЕНИЯ АЗОТА
В ПРОЦЕССЕ АНАММОКС¹

© 2022 г. Н. В. Пименов^а, Ю. А. Николаев^{а, *}, А. Г. Дорофеев^а, В. А. Грачев^а, А. Ю. Каллистова^а,
Т. А. Канапацкий^а, Ю. В. Литти^а, Е. В. Груздев^б, Ш. А. Бегматов^б, Н. В. Равин^б, А. В. Марданов^б

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

^бИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Поступила в редакцию 25.03.2022 г.

После доработки 29.03.2022 г.

Принята к публикации 30.03.2022 г.

Исследовано влияние внесения экзогенного активного ила (биоаугментации) на активность и состав микробного консорциума, реализующего процесс нитритации–анаммокс в биореакторе SBR-типа. Использовали 2 стратегии биоаугментации: экзогенный ил добавляли в момент запуска реактора сразу после внесения инокулята — активного ила анаммокс или после его выхода на стабильный режим удаления азота. Доля внесенного ила составляла 28–35% от общей массы активных илов (по сухому беззольному веществу). Условия выращивания и состав анаммокс-бактерий активных илов существенно различались: в аборигенном иле доминировали представители родов “*Candidatus Brocadia*” и “*Ca. Jettenia*”, в экзогенном — “*Ca. Kuenenia*” и “*Ca. Jettenia*”. При биоаугментации в момент запуска эффективность удаления азота повышалась на 15%, положительный эффект был краткосрочным (к 46-м сут культивирования эффективность удаления азота в контрольном и опытным реакторах сравнялись). Внесение экзогенного активного ила после выхода реактора на стабильный режим удаления азота (53-и сут) увеличивало эффективность удаления азота на 21–35%, эта разница сохранялась до конца эксперимента (90 сут). Интродуцированные анаммокс-бактерии не приживались в микробном сообществе SBR-реактора; их численность снижалась до минимальных значений вне зависимости от способа внесения. Полученные данные свидетельствуют о возможности повышения эффективности удаления азота в процессе нитритации–анаммокс при внесении активных илов, значительно отличающихся по составу и условиям выращивания от аборигенных, как при запуске реактора, так и в активно функционирующий биореактор.

Ключевые слова: нитритация–анаммокс, биоаугментация, состав сообщества, очистка сточных вод

DOI: 10.31857/S0026365622300176

В связи с возрастающим дефицитом чистой воды и загрязнением водоемов, в последние годы происходит модификация существующих и разработка новых экологически чистых, энергоэффективных технологий очистки сточных вод от биогенных элементов, в том числе от азота (Hasan et al., 2021). Среди таких технологий наиболее перспективными считаются технологии с использованием биохимического процесса “анаммокс”, работающие по схеме “нитритация/анаммокс” (Н/А) (деаммонификация), экономически более выгодные, чем традиционные, основанные на схеме “нитрификация/денитрификация” (Agrawal et al., 2018; Кевбрина и соавт., 2018; Izadi et al., 2021; Re-

drouso et al., 2021). Процесс Н/А состоит из двух последовательных этапов: 1) окисление части аммония до нитрита аммоний-окисляющими бактериями и 2) окисление оставшейся части аммония образовавшимся на первом этапе нитритом до молекулярного азота анаммокс-бактериями. Технологический процесс Н/А проводится в биореакторах микробным консорциумом, развивающимся, как правило, в виде взвешенных агрегатов активного ила или биопленки, прикрепленной к носителю. Консорциум включает не только аммоний-окисляющие и анаммокс-бактерии, но также и широкий спектр гетеротрофных и автотрофных микроорганизмов. Поэтому для эффективного управления процессом Н/А требуется достаточно жесткое регулирование физико-химических условий для поддержания высокой активности и конкурентоспо-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622300176 для авторизованных пользователей.

способности аммоний-окисляющих и анаммокс-бактерий (Каллистова и соавт., 2016; Cho et al., 2020).

Низкие скорости роста анаммокс-бактерий и чувствительность к ингибиторам, присутствующим в богатых азотом сточных водах, обуславливают длительный период запуска биореакторов. Кроме того, в процессе эксплуатации нередко возникают ситуации, приводящие к нестабильности процесса и снижению его эффективности, вызванные временными колебаниями состава и расхода поступающей сточной воды, изменением температурного режима, эксплуатационными проблемами (Ali, Okabe, 2015; Talan et al., 2021). Одним из перспективных путей повышения стабильности работы биореакторов и снижения продолжительности периода запуска считается биоаугментация – добавление чистых или смешанных микробных культур с целью интенсифицировать биодеградацию загрязнителей и повысить эффективность процесса биологической очистки (Herrero, Stuckey, 2015; Zhang et al., 2017; Raper et al., 2018). В ряде исследований было показано, что при неблагоприятных условиях биоаугментация анаммокс-бактериями поддерживает стабильность и повышает эффективность собственно анаммокс-процесса, например, после шокового действия антибиотика окситетрациклина (Jin et al., 2014; Zhang et al., 2018). На основе регулярной биоаугментации гранулами с высокой анаммокс-активностью был разработан процесс SBA-ANAMMOX, позволяющий очищать токсичные сточные воды фармацевтической промышленности, губительно действующие на анаммокс-бактерии (Tang et al., 2011).

Учитывая двухэтапность процесса Н/А, следует ожидать, что наиболее эффективными организмами для биоаугментации будут аммоний-окисляющие и/или анаммокс-бактерии. Действительно, в ряде работ показано, что биоаугментация биореактора обогащенным аммоний-окисляющими бактериями активным илом ускоряет запуск процесса нитритации и создает благоприятные условия для последующего развития анаммокс-бактерий (Zhang et al., 2012; Ma et al., 2013; Miao et al., 2017; Пименов и соавт., 2022). Определенные успехи получены при постоянной (регулярной) биоаугментации основного (mainstream) биореактора Н/А активным илом, обогащенным аммоний-окисляющими и анаммокс-бактериями. Однако для реализации такой технологии необходима постоянно работающая дополнительная (sidestream) установка по получению обогащенного активного ила (Wett et al., 2013, 2015; Trinh et al., 2021). Для повышения активности Н/А в холодный период года предложено вносить активный ил, обогащенный аммоний-окисляющими и анаммокс-бактериями, полученный заранее в теплый период и хранившийся в анаэробных условиях при 20°C (Zhu et al., 2022a, 2022b). Учитывая, что при смене условий роста происходит постепенная смена структуры микробного сообщества и доминирующих видов, для

ускорения процесса предложено использовать биоаугментацию биореактора заблаговременно адаптированными анаммокс-бактериями (Lin et al., 2021).

Вместе с тем, существуют высокие риски того, что внесение в сформированное сообщество бактерий извне может не оказать положительного влияния на процесс или даже ухудшить ситуацию. Это может быть связано с неоптимальностью физико-химических условий для роста вносимых микроорганизмов, их низкой конкурентоспособностью по сравнению с аборигенными микроорганизмами, быстрым выеданием хищниками, негативными изменениями физико-химических условий или структуры микробного сообщества в биореакторе после аугментации и т.п. (Zhang et al., 2017; Raper et al., 2018). Поэтому для снижения рисков и повышения эффективности биоаугментации гетерогенными активными илами нужны дальнейшие детальные исследования в этой области.

Ранее нами было показано, что биоаугментация обогащенным нитрификаторами *Nitrosospira* микробным сообществом способствует быстрому увеличению активности аммоний-окисляющих и анаммокс-бактерий и повышению эффективности удаления азота в реакторе Н/А (Пименов и соавт., 2022). Целью настоящей работы было изучение влияния на процесс Н/А внесения анаммокс-сообщества, кардинально отличающегося по составу и условиям выращивания от сообщества, развивающегося в биореакторе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная установка. Эксперименты проводили в трех одинаковых параллельно работающих лабораторных биореакторах SBR-типа с рабочим объемом 4.5 л, внутрь которых для развития биопленки была помещена цилиндрическая загрузка из волокнистых полиэтилена и полипропилена общей площадью поверхности 11.6 дм² (Поливом, “Этек”, РФ). В биореакторы подавали синтетическую среду следующего состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 0.942 (200 мг N-NH₄/л); NaCH₃COO · 3H₂O – 0.04; KH₂PO₄ – 0.044; NaHCO₃ – 2.1. Реакторы эксплуатировали в одинаковом режиме при температуре 32 ± 2°C; pH 8.3 ± 0.1.

Продолжительность каждого SBR-цикла составляла 6 ч. Цикл состоял из следующих фаз: фаза чередования аэрации и механического перемешивания – 310 мин; фаза отстаивания – 20 мин; фаза одновременной подачи 1 л свежей и слива 1 л отработанной среды – 30 мин. Свежая среда подавалась снизу, что обеспечивало одновременное “поршневое” вытеснение без перемешивания очищенной воды сверху реактора. Минимальная и максимальная концентрации растворенного кислорода в период без аэрации и в период аэра-

Таблица 1. Масса активных илов ИА и ИБ (по массе беззольного сухого вещества, СВ, в г), внесенных в каждый реактор

Время внесения ИБ	Реактор № 1		Реактор № 2		Реактор № 3	
	контроль		опыт 1. Инокуляция ИБ в момент запуска биореактора		опыт 2. Инокуляция ИБ в активный реактор	
	ИА	ИБ	ИА	ИБ	ИА	ИБ
День 0	1.44	0	1.04	0.56	1.44	0
День 53	0	0	0	0	0	0.56

ции (по 20 мин) составляли, соответственно, 0.2 и 2 ($\pm 10\%$) мг/л. Детальное описание биореакторов и методов анализа приведено ранее (Каллистова и соавт., 2020; Пименов и соавт., 2022).

Подготовка активных илов анаммокс. Основной (аборигенный) активный ил анаммокс (ИА) был выращен в описанной выше экспериментальной установке в течение 5 мес., собран путем механического удаления с загрузочного материала, и в течение 5 нед. хранился при температуре 4°C. Для запуска нового цикла работы биореактора ил суспендировали в свежей среде (1–1.5 л) и вносили в реактор. В течение двух недель наблюдали прикрепление практически всего активного ила на загрузочном материале. В течение всего периода инкубации свободноплавающий ил в реакторе в виде взвешенных частиц присутствовал в минимальном количестве (его доля от внесенного не превышала 1–2%).

Биоаугментирующий активный ил анаммокс (ИБ) выращивали при комнатной температуре (24°C) в течение двух лет в осуществляющем анаммокс-процесс проточном вертикальном реакторе в виде биопленки на ершовом носителе (Mardanov et al., 2019). Синтетическая минеральная среда, поступающая в реактор, имела следующий состав (г/л): NaHCO_3 – 0.9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.12; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.18; KH_2PO_4 – 0.027; 1 мл/л раствора микроэлементов (г/л): ЭДТА – 1.5; H_3BO_3 – 0.004; $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.078; ZnSO_4 – 0.128; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.324; CuCl_2 – 0.051; Na_2MoO_4 – 0.009; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.057; Na_2SeO_3 – 0.034. В качестве субстратов для анаммокс-процесса в среду добавляли NH_4Cl (250 мг N- NH_4 /л) и NaNO_2 (250 мг N- NO_2 /л). Реактор работал в режиме гидравлического времени пребывания 0.7 сут, эффективность удаления общего азота составляла около 90%.

Схема эксперимента. Реактор № 1 был контрольным, реакторы № 2 и 3 – опытными. Для запуска процесса Н/А в реакторы 1 и 3 добавили по 1.44 г ИА (по массе беззольного сухого вещества; СВ), в реактор № 2 – 1.04 г ИА (табл. 1). Одновре-

менно с ИА в реактор № 2 был также добавлен ИБ в количестве 0.56 г по массе беззольного СВ (54% от массы аборигенного ИА). В течение первых 53 сут реактор № 3 работал в режиме, идентичном контрольному реактору № 1, затем, в реактор № 3 был внесен ИБ в количестве 39% от массы исходного ИА.

Определение эффективности удаления азота. Регулярно из биореакторов отбирали образцы отходящей воды для химического анализа и развивающейся на загрузке биопленки для молекулярного профилирования состава микробного сообщества.

Концентрацию удаленного азота рассчитывали, как разность между концентрацией аммонийного азота (N- NH_4) в поступающей среде и суммарной концентрацией минеральных форм азота в очищенной воде (N- NH_4 , N- NO_2 , N- NO_3). Эффективность удаления азота (%) рассчитывали, как долю удаленного азота от его содержания в поступающей среде.

Анализ состава микробных сообществ в активных илах (ИА и ИБ, или их смеси после выращивания в биореакторе), проводили методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК. Активный ил отбирали в момент инокуляции, через 53 и 70 сут инкубации.

Метагеномную ДНК из образцов выделяли с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (“Qiagen”, Германия) по протоколам производителя. Вариабельный V3–V4 регион гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров 341F CCTAYGGGDBGWCWSCAG и 806R GGACTACNVGGGTHTCTAAT (Frey et al., 2016). Полученные ПЦР фрагменты использовали для приготовления библиотек ампликонов с баркодами с помощью наборов Nextera XT Index Kit v2 (“Illumina”, San Diego, США) по протоколам производителя. ПЦР фрагменты секвенировали с использованием Illumina MiSeq в формате 2 × 300 нт.

Полученные парные чтения объединили с помощью программы FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salz-

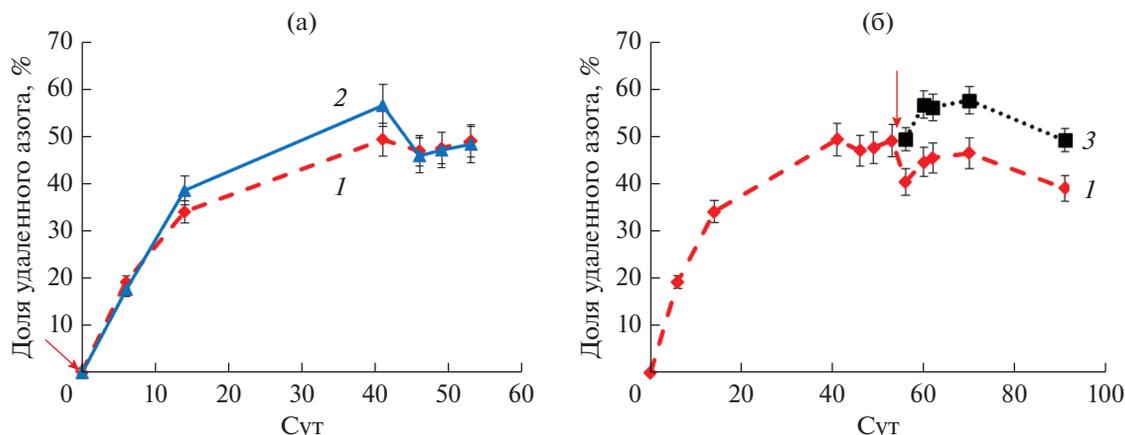


Рис. 1. Изменение количества удаленного минерального азота в ходе работы биореакторов (в жидкости, выходящей из реактора): (1) – контроль; (2) – опыт 1 (внесение ИБ одновременно с ИА при запуске биореакторов); (3) – опыт 2 (внесение ИБ на 53 сут работы биореакторов). (а) – Сравнение вариантов контрольного и опыт № 1; (б) – сравнение вариантов контрольного и опыт № 2. Стрелками отмечено внесение ИБ в опытных вариантах. Контрольная кривая (1) получена усреднением данных по реакторам № 1 и 3 на участке 1–53 сут и построена на основании данных только реактора № 1 на участке 53–91 сут.

berg, 2011). На следующем этапе из дальнейшего анализа были исключены низкокачественные чтения, синглтоны и химеры.

Оставшиеся чтения были кластеризованы в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) с идентичностью последовательностей на уровне 97%. Для определения доли ОТЕ в каждом из образцов, на репрезентативные последовательности ОТЕ были наложены исходные чтения (включая низкокачественные и синглтоны) с помощью пакета программ USEARCH v.11 (Edgar, 2010). Таксономическую идентификацию полученных ОТЕ проводили с использованием алгоритма VSEARCH v.2.14.1 и базы данных Silva v.138 (Rognes et al., 2016).

Полученные последовательности фрагментов гена 16S рРНК депонированы в базу NCBI и доступны в рамках проекта BioProject PRJNA556270.

Статистическая обработка результатов. В экспериментах по определению концентраций форм азота и кислорода проводили по 3 определения каждого показателя. Для каждой точки определяли среднее арифметическое и среднее абсолютных значений отклонений точек данных от среднего. Эта величина соответствовала экспериментальному разбросу и составляла не более 3%. Схема эксперимента позволила рассчитать экспериментальную ошибку при получении средних данных в контрольных опытах. Поскольку в реактор № 3 не вносили никаких добавок до 53 сут, то результаты по реакторам № 1 и 3 рассматривали как две независимые повторности, и они были усреднены. Средний экспериментальный разброс составил 9%. Эту величину откладывали как разброс данных на всех графиках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность работы биореактора

В связи с длительным хранением ИА в неактивном состоянии при температуре 4°C, эффективность удаления азота в течение первой недели после запуска реактора была ожидаемо невысокой, независимо от внесения ИБ – не более 20% (рис. 1). В течение последующих 7 сут эффективность удаления выросла в 2 раза (до 34–39%), а к 41 сут достигла максимума – 49 и 57%, соответственно, в контрольном и опытном варианте. Удаление азота на 41 сут культивирования в опытном варианте было выше, чем в контрольном, на 15%. Затем эффективность удаления азота в опытном биореакторе снизилась, и с 46 сут реакторы работали с близкой эффективностью.

После внесения ИБ в опытный реактор № 3 скорость удаления азота по сравнению с контролем увеличилась на 23–27% и на протяжении 56–91 сут составила 100–115 мг N/л/сут, против 83–92 мг N/л/сут в контроле. Содержание соединений азота, аммония, нитритов и нитратов в очищенной в реакторах воде и эффективности удаления азота представлены на рисунках в приложении (рис. S1–S4).

Несмотря на то, что в течение эксперимента происходило увеличение биомассы анаэробных бактерий в биореакторе, можно оценочно сравнить активности ИА и ИБ, рассчитав удельные скорости удаления азота v илами ИА и ИБ, т.е. в расчете на 1 г внесенной биомассы.

Удельную скорость удаления азота аборигенным илом $v_{ИА}$ определяли по эффективности удаления азота в контрольном биореакторе. На 41 сут культивирования в контрольном варианте (реактор 1) суммарная скорость удаления азота составила 99 мг

N/л/сут. Учитывая, что было внесено 1.44 г ИА, рассчитывали $v_{ИА} = 99$ (мг N/л/сут)/1.44 г = 68.75 мг N/л/сут/г.

Для оценки активности ИБ было составлено уравнение для вычисления скорости удаления азота в реакторе № 2:

$$V_{\text{Общ}} = M_{\text{ИА}}v_{\text{ИА}} + M_{\text{ИБ}}v_{\text{ИБ}},$$

где $V_{\text{Общ}}$ – скорость удаления азота в реакторе 2, $M_{\text{ИА}}$ и $M_{\text{ИБ}}$ – массы активных илов АИ и АБ соответственно, $v_{\text{ИА}}$ и $v_{\text{ИБ}}$ – удельные активности илов АИ и АБ.

$V_{\text{Общ}}$ на 41 сут составила 113 мг N/л/сут, $M_{\text{ИА}}$ и $M_{\text{ИБ}}$ – соответственно 1.04 г и 0.56 г (табл. 1, рис. S4).

Решив это уравнение, находили, что удельная активность ИБ составила 74.0 мг N/л/сут/г. С учетом экспериментального разброса данных можно считать активности обоих илов одинаковыми.

Аналогичный расчет для удельной активности илов на 56–70 сут дал величины: $v_{\text{ИА}} = 50$ –66 мг N/л/сут/г, а $v_{\text{ИБ}} = 41$ –49 мг N/л/сут/г. Рассчитанная удельная активность экзогенного ИБ в среднем на 20% ниже, чем аборигенного активного ила. С учетом прироста исходного активного ила ИА и, соответственно, возрастания его массы на 53 сут культивирования, относительная доля вносимого ила будет ниже, и, соответственно, его расчетная удельная активность – выше.

Таким образом, можно считать удельные активности аборигенного и вносимого илов близкими или одинаковыми, как при биоаугментации в момент запуска биореактора, так и при биоаугментации зрелого анаммокс-сообщества, развивающегося в процессе Н/А.

Состав микробных сообществ активных илов

Исходный таксономический состав микробного сообщества аборигенного, биоаугментирующего и синтетического илов. Микробное сообщество ИА содержало 16% (от общего количества последовательностей генов 16S рНК) анаммокс-бактерий с соотношением последовательностей представителей родов “*Ca. Jettenia*” к “*Ca. Brocadia*” 1 : 1.5; 8% нитрификаторов I стадии рода *Nitrosomonas* (табл. S1, рис. 2). ИБ содержал несколько больше анаммокс-бактерий (19.4%), из них “*Ca. Jettenia*” – 3.4%, “*Ca. Brocadia*” – 0.12% и “*Ca. Kuenenia*” – 15.9%. Последовательности в ИБ, относящиеся к “*Ca. Brocadia*” (ОТЕ16 и ОТЕ52) были идентичны последовательностям в аборигенном анаммокс-сообществе. Из последовательностей “*Ca. Jettenia*” (ОТЕ13 – 1.3% и ОТЕ559 – 2.1%) идентичной аборигенному сообществу была только последовательность ОТЕ13 (в аборигенном сообществе ее доля достигала 6.5%) (рис. 2). Последовательность, относящаяся к “*Ca. Kuenenia*”

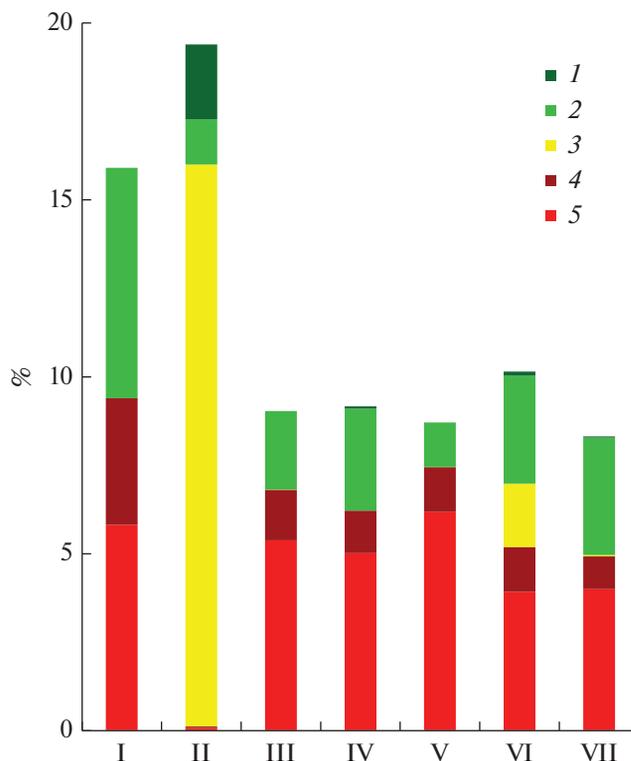


Рис. 2. Содержание основных групп анаммокс-бактерий в исходном аборигенном активном иле (ИА) и биоаугментирующем иле (ИБ), а также в общих илах, сформированных в опытных реакторах на 53 и 70 сут. Обозначения: I – ИА; II – ИБ; III – контроль (53 сут); IV – опыт 1, с 1-го дня (53 сут); V – контроль (70 сут); VI – опыт 2, с 53 сут (70 сут); VII – опыт 1, с 1-го дня (70 сут). 1 – ОТЕ559, 2 – ОТЕ13, 3 – ОТЕ7, 4 – ОТЕ52, 5 – ОТЕ16. ОТЕ559 – “*Ca. Jettenia*” из ИБ; ОТЕ13 – “*Ca. Jettenia*” из ИА; ОТЕ7 – “*Ca. Kuenenia*” из ИБ; ОТЕ52 – “*Ca. Brocadia*” из ИБ; ОТЕ16 – “*Ca. Brocadia*” из ИА. Опыт 1 – вариант, когда ИБ вносили с первого дня работы реактора; опыт 2 – вариант, когда ИБ вносили на 53 сут работы реактора.

(ОТЕ7) была уникальна и имела 98.9% сходства с “*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*” (CP049055.1).

Следует отметить, что условия культивирования ИБ (Mardanov et al., 2019) отличались от культивирования аборигенного анаммокс-сообщества (Пименов и соавт., 2021), результатом чего явилась существенная разница в общем разнообразии и относительном обилии различных таксонов в ИБ по сравнению с аборигенным сообществом. Сообщество ИБ было менее разнообразно по составу, чем аборигенный ил. В ИБ детектировано 162 ОТЕ, принадлежащих разным бактериальным таксонам, в аборигенном иле – 213 ОТЕ. При этом только 70 ОТЕ были детектированы в обоих илах. Из этих 70 ОТЕ, подавляющее большинство с высокой долей в ИБ (>1%), в аборигенном иле имело низкую долю (<0.1%) и наоборот. Только 5 ОТЕ в обоих илах имели долю ≥1%: “*Ca. Jettenia*” (ОТЕ13), некультивируемые *Chloro-*

flexi (*Anaerolineaceae*, ОТЕ1), неидентифицированный представитель *Bacteroidetes/Chlorobi* group (ОТЕ3), *Nitrosomonas europaea* (ОТЕ6) и некультивируемые *Bacteroidetes* (ОТЕ14). Это может указывать на устойчивые межвидовые связи между представителями рода “*Ca. Jettenia*” (а возможно и другими анаммокс-бактериями) и данными микроорганизмами, независимо от физико-химических условий культивирования и состава сообщества.

Эффект биоаугментации в момент запуска био-реакторов. Анализ последовательностей генов 16S рРНК позволил проследить динамику развития анаммокс-бактерий в контрольном и опытных реакторах (таблица S1, рис. 2). Внесение ИБ в момент запуска (реактор № 2) незначительно увеличило производительность реактора посредством увеличения общего количества анаммокс-бактерий, однако, привнесенные извне анаммокс-бактерии оказались недостаточно конкурентоспособными по отношению к аборигенным в условиях адаптации сообщества на этапе запуска (до выхода реактора на стабильный режим). Через 53 сут в реакторе № 3 детектировались лишь следы (0.07%) ОТЕ559, исходно преобладавшей в ИБ среди представителей рода “*Ca. Jettenia*”. При этом условия в реакторе № 2 были более благоприятными для другой анаммокс-бактерии рода “*Ca. Jettenia*”, соответствующей ОТЕ13, которая также была важной компонентой аборигенного сообщества. О вкладе ОТЕ13 из ИБ в аборигенное сообщество свидетельствует ее большая доля (3% vs 2.2%) в реакторе № 2 по сравнению с усредненным контролем (реакторы № 1 и № 3, как повторности). Кроме того, условия в реакторе № 2 в первые 53 сут с момента запуска оказались совсем неподходящими для размножения доминировавших в ИБ представителей рода “*Ca. Kuenenia*”. Последовательности представителей рода “*Ca. Kuenenia*” не были обнаружены в реакторе № 2 на 53 сут и были детектированы позднее (на 70 сут) в том же реакторе в минимальном количестве 0.04% вместе с ОТЕ559 (“*Ca. Jettenia*”, 0.03%). При этом, если на 53 сут как в контроле, так и в реакторе № 2 доминировали аборигенные “*Ca. Brocadia*” (6.58% в контроле и 6.22% в реакторе № 2), то на 70 сут в контроле их доля возросла до 7.45%, а в реакторе № 2, наоборот, снизилась до 4.5%. Доля “*Ca. Jettenia*” (ОТЕ13) в реакторе № 2, наоборот, незначительно увеличилась на 70 сут с 3 до 3.3%, тогда как в контроле – снизилась с 2.2 до 1.3%.

Эффект биоаугментации зрелого микробного сообщества. Внесение новых анаммокс-бактерий в биореактор № 3 после выхода реакторов на стабильный режим оказалось более благоприятно для процесса Н/А, что привело к возрастанию доли и разнообразия анаммокс-бактерий и увеличению удаления азота на 23–27%. Очевидно, в зрелом сообществе (после 40 сут инкубации) происходит луч-

шая адаптация новых анаммокс-бактерий, что приводит к увеличению скорости и эффективности процесса удаления азота, а также к увеличению доли и разнообразия анаммокс-бактерий. На 70 сут общая доля анаммокс-бактерий в реакторе № 3 была выше, чем в контроле (10.2% vs 8.7%), благодаря увеличению не только доли представителей “*Ca. Jettenia*” (ОТЕ13 и ОТЕ 559), но и доли представителей рода “*Ca. Kuenenia*” (1.8%). При этом в сообществе реактора № 3 по-прежнему доминировали представители рода “*Ca. Brocadia*” (5.2%). Как и в опыте 1, в котором бактерии “*Ca. Kuenenia*” не смогли закрепиться и после длительного инкубирования практически не обнаруживались, в опыте 2 их численность также снижалась. При содержании “*Ca. Kuenenia*” в ИБ 19% и “разбавлении” исходным илом в 5 раз, исходная доля в сообществе составляла около 4%. Через 17 сут их доля составляла 1.8%.

Таким образом, после внесения в биореакторы биоаугментирующего ила анаммокс наблюдалось постепенное изменение состава микробных сообществ. Во всех вариантах прослеживалась тенденция к установлению сообщества с соотношением анаммокс-бактерий, близким к аборигенному сообществу, характеризующемуся доминированием родов “*Ca. Jettenia*” и “*Ca. Brocadia*”. Нехарактерные для аборигенного сообщества “*Ca. Kuenenia*” с течением времени элиминировались. Причины, определяющие таксономический состав и соотношение видов в анаммокс-сообществах детально еще не выяснены. На структуру анаммокс-сообщества могут влиять множество факторов: температура, рН, концентрация кислорода, минеральных форм азота и органических веществ, соленость, наличие токсичных веществ, тип пространственной организации (например, рост в виде прикрепленных биопленок или суспензия клеток), а также режим работы биореактора или длительное голодание (Gonzalez-Martinez, 2018; Trinh et al., 2021; Kallistova et al., 2022). Однако точно предсказать доминирующий вид и, тем более, структуру сообщества до сих пор не представляется возможным. Вместе с тем, установлена взаимосвязь известных родов анаммокс-бактерий (*Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia*, *Scalindua* и *Loosdrehtii*) с их местообитанием: в активных илах промышленных очистных сооружений в основном встречаются представители *Brocadia* и *Kuenenia* и *Loosdrehtii*. *Anammoxoglobus*, *Jettenia* и *Scalindua* приурочены, главным образом, к анаэробным системам очистки, пресноводным и морским водоемам, реже встречаются и в активных илах промышленных и лабораторных биореакторов (Trinh et al., 2021, Yang et al., 2021).

В работе Zhang et al. (2017) исследовалось взаимодействие между тремя филогенетически отдаленными видами анаммокс-бактерий – “*Candidatus Brocadia sinica*”, “*Candidatus Jettenia caeni*” and “*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*” в условиях

лимита по одному из субстратов роста – нитриту. Было показано, что в зависимости от условий выращивания, преимущество получает либо “*Ca. V. sinica*” (высокие нагрузки по азоту), либо “*Ca. J. saeni*” (низкие нагрузки по азоту). В таких условиях “*Ca. J. saeni*” обнаруживались в ядре агрегатов, а “*Ca. V. sinica*” – в наружном слое. Вместе с тем, “*Ca. K. stuttgartiensis*” не доминировала ни при каких условиях, что противоречило ее кинетическим характеристикам. Ожидалось, что, обладая высоким сродством к субстрату (нитриту), “*Ca. K. stuttgartiensis*” должна была выиграть конкуренцию при низких концентрациях субстрата и развиваться в ядре агрегатов. Авторы объясняют это противоречие низкой численностью этих бактерий в исходном инокуляте, неточностью определенных кинетических констант и наличием неизвестных факторов (например, отсутствием какого-то микроэлемента), препятствующих развитию “*Ca. K. stuttgartiensis*”. Эта ситуация напоминает описанную в настоящей работе, когда внесение даже значительного количества бактерий рода “*Ca. Kuenenia*” не обеспечило им закрепления в сообществе, и в течение короткого периода времени произошла их элиминация или существенное сокращение численности.

В нашем случае, очевидно, имело место несколько факторов, повлиявших на развитие анаммокс-бактерий. Стрессовыми факторами для бактерий экзогенного ила были двукратное снижение концентрации соединений азота и наличие конкурентов за субстраты. При внесении активных илов в момент инокуляции реакторов пористый загрузочный материал был не заселен, бактерии из ИА и ИБ проникали в него и располагались равномерно в одинаковых физико-химических условиях. Их близкое взаиморасположение обуславливало конкуренцию за субстраты. При этом привнесенные бактерии находились в активном состоянии, что было их преимуществом и обусловило некоторую стимуляцию протекания анаммокс-процесса.

Важным селективным фактором был высокий уровень концентрации кислорода, к которому аборигенное сообщество было адаптировано в течение нескольких лет, а интродуцируемое развивалось в условиях без активной аэрации. Влияние кислорода на анаммокс-бактерии изучено в настоящее время недостаточно для количественного предсказания его влияния на физиологическую активность и исход конкурентной борьбы. Считается, что устойчивость анаммокс-сообществ к кислороду видоспецифична и зависит от типа развития биомассы (в виде суспензии одиночных клеток или в виде агрегатов и биопленок). В наших экспериментах анаммокс-сообщество развивалось в виде биопленок. Вероятно, “*Ca. Jettienia*” и “*Ca. Brocadia*” образуют менее проницаемые для O_2 микроагрегаты или биопленку по сравнению с “*Ca. Kuenenia*”, что при переменной аэрации в те-

чение длительного периода обеспечивает им более эффективный рост даже при высоких концентрациях кислорода. Так, при гранулированном росте биомассы процесс деаммонификации эффективно осуществлялся вплоть до концентраций растворенного кислорода 3 мг/л.

К нашему удивлению, анаммокс-бактерии, выращенные в условиях без активной аэрации, показывали сопоставимую скорость удаления азота по сравнению с аборигенными представителями. Учитывая увеличение анаммокс-активности после внесения ИБ в обоих вариантах опыта, можно сделать вывод, что доминирующая в ИБ “*Ca. Kuenenia*” в условиях биореактора с переменной аэрацией (и концентрацией O_2 в объеме жидкости 0.2–2.0 мг/л) обладала активностью, сравнимой с активностями аборигенных анаммокс-бактерий (“*Ca. Jettienia*” и “*Ca. Brocadia*”). Одно из возможных объяснений этому связано с предысторией ИБ (Mardanov et al., 2019). Этот ил хотя и культивировали без аэрации, но конструкция биореактора не исключала попадания воздуха в среду культивирования, концентрация O_2 составляла около 1 мг/л, и, таким образом, анаммокс-бактерии ИБ были адаптированы к присутствию кислорода. Кроме того, микробный консорциум ИБ в момент запуска биореактора находился в активном физиологическом состоянии, тогда как аборигенный ил длительное время хранился в неактивном состоянии при низкой температуре.

Другим важным моментом является необходимость различать текущую физиологическую активность бактерий, детектируемую по эффективности удаления азота, и их способность к размножению и конкуренции с другими видами. Наличие метаболической активности ИБ в обоих вариантах их внесения в реактор не обеспечило им высокой скорости размножения, и они проиграли в конкуренции с аборигенными анаммокс-бактериями при длительном культивировании.

Два варианта внесения экзогенного активного ила отражают две реальные ситуации в работе биореакторов Н/А: запуск и повышение активности уже работающего реактора. Полученные результаты показывают, что биоаугментация активно функционирующего реактора более эффективна, чем на этапе его запуска.

Таким образом, использование для биоаугментации процесса Н/А активного ила из местобитаний, сильно отличающихся по условиям от таковых в биореакторе, позволяет увеличить производительность реактора путем увеличения общего содержания анаммокс-бактерий, их активности и разнообразия. Биоаугментация оказывает положительное влияние как в момент запуска биореактора, так и после длительной эксплуатации, однако имеет ограниченный временной эффект и должна применяться с осторожностью.

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

Статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каллистова А.Ю., Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Пименов Н.В.* Роль анаммокс-бактерий в очистке сточных вод от соединений азота // *Микробиология*. 2016. Т. 85. С. 126–144.
- Kallistova A.Y., Nikolaev Y.A., Pimenov N.V., Dorofeev A.G., Kozlov M.N., Kevbrina M.V.* Role of Anammox bacteria in removal of nitrogen compounds from wastewater // *Microbiology (Moscow)*. 2016. V. 85. P. 140–156.
- Кевбрина М.В., Дорофеев А.Г., Агарёв А.М., Козлов М.Н., Николаев Ю.А., Асеева В.Г.* Анаммокс – перспективная технология удаления азота из сточных вод // *Водоснабжение и санитарная техника*. 2019. № 5. С. 28–35.
- Пименов Н.В., Николаев Ю.А., Дорофеев А.Г., Грачёв В.А., Каллистова А.Ю., Миронов В.В., Вантеева А.В., Григорьева Н.В., Берестовская Ю.Ю., Груздев Е.В., Бегматов Ш.А., Равин Н.В., Марданов А.В.* Биоаугментация активного ила анаммокс нитрифицирующим сообществом бактерий как способ повышения эффективности удаления азота // *Микробиология*. 2022. Т. 91. С. 160–170.
- Pimenov N.V., Nikolaev Yu.A., Dorofeev A.G., Grachev V.A., Kallistova A.Yu., Mironov V.V., Vanteeva A.V., Grigor'eva N.V., Berestovskaya Yu.Yu., Gruzdev E.V., Begmatov Sh.A., Ravin N.V., Mardanov A.V.* Bioaugmentation of Anammox activated sludge with a nitrifying bacterial community as a way to increase the nitrogen removal efficiency // *Microbiology (Moscow)*. 2022. V. 91. № 2. P. 126–135.
- Agrawal S., Seuntjens D., Cocker P.D., Lackner S., Vlaeminck S.* Success of mainstream partial nitritation/anammox demands integration of engineering, microbiome and modeling insights // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. V. 50. P. 214–221.
- Ali M., Okabe S.* Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues // *Chemosphere*. 2015. V. 141. P. 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.094>
- Cho S., Kambej C., Nguyen V.K.* Performance of anammox processes for wastewater treatment: a critical review on effects of operational conditions and environmental stresses // *Water*. 2020. V. 12. Art. 20. <https://doi.org/10.3390/w12010020>
- Gonzalez-Martinez A., Munoz-Palazon B., Rodriguez-Sanchez A., Gonzalez-Lopez J.* New concepts in anammox processes for wastewater nitrogen removal: recent advances and future prospects // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. fny031. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny031>
- Hasan M.N., Altaf M.M., Khan N.A., Khan A.H., Khan A.A., Ahmed S., Kumar P.S., Naushad Mu., Rajapaksha A.U., Iqbal J., Tirth V., Islam S.* Recent technologies for nutrient removal and recovery from wastewaters: A review // *Chemosphere*. 2021. V. 277. Art. 130328. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130328>
- Herrero M., Stuckey D.C.* Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review // *Chemosphere*. 2015. V. 140. P. 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.033>
- Izadi P., Izadi P., Eldyasti A.* Towards mainstream deammonification: Comprehensive review on potential mainstream applications and developed sidestream technologies // *J. Environ. Manag.* 2021. V. 279. Art. 111615.
- Jin R.-C., Zhang Q.-Q., Zhang Z.-Z., Liu J.-H., Yang B.-E., Guo L.-X., Wang H.-Z.* Bio-augmentation for mitigating the impact of transient oxytetracycline shock on anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) performance // *Biore-sour. Technol.* 2014. V. 163. P. 244–253.
- Lin L., Pratt S., Li Z., Ye L.* Adaptation and evolution of freshwater Anammox communities treating saline/brackish wastewater // *Water Research*. 2021. V. 207. Art. 117815.
- Ma B., Wang S., Zhang S., Li X., Bao P., Peng Y.* Achieving nitritation and phosphorus removal in a continuous-flow anaerobic/oxic reactor through bio-augmentation // *Biore-sour. Technol.* 2013. V. 139. P. 375–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.077>
- Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Botchkova E.A., Litt Y.V., Nozhevnikova A.N.* Genome of a novel bacterium “*Candidatus Jettenia ecosi*” reconstructed from the metagenome of an anammox bioreactor // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 02442. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02442>
- Miao Y., Zhang L., Li B., Zhang Q., Wang S., Peng Y.* Enhancing ammonium oxidizing bacteria activity was key to single-stage partial nitrification-anammox system treating low-strength sewage under intermittent aeration condition // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 231. P. 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.045>
- Morales N., Val Del Río A., Vázquez-Padín J.R. et al.* Influence of dissolved oxygen concentration on the start-up of the anammox-based process: ELAN // *Water Sci. Technol.* 2015. V. 72. P. 520–527. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.233>
- Oshiki M., Satoh H., Okabe S.* Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. P. 2784–2796.
- Pedrouso A., Vázquez-Padín J.R., Crutchik D., Campos J.L.,* Application of anammox-based processes in urban WWTPs: are we on the right track? // *Processes*. 2021. P. 9. Art. 1334. <https://doi.org/10.3390/pr9081334>
- Raper E., Stephenson T., Anderson D.R., Fisher R., Soares A.* Industrial wastewater treatment through bioaugmentation // *Proc. Saf. Environ. Prot.* 2018. V. 118. P. 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.06.035>
- Talan A., Tyagi R.D., Drogui P.* Critical review on insight into the impacts of different inhibitors and performance inhibition of anammox process with control strategies // *Environ. Technol. Innovat.* 2021. V. 23. 101553.
- Tang C.J., Zheng P., Chen T.T., Mahmood Q., Zhang J.Q., Chen X.G., Ding S., Chen J.W., Wu D.T.* Enhanced nitrogen removal from pharmaceutical wastewater using SBA-ANAMMOX process // *Water Res.* 2011. V. 45. P. 201–210.
- Trinh H.P., Lee S.-H., Jeong G., Yoon H.-J., Park H.-D.* Recent developments of the mainstream anammox processes:

Challenges and opportunities // *J. Environ. Chem. Engin.* 2021. V. 9. Art. 105583.

Wett B., Podmirseg S.M., Gómez-Brandón M., Hell M., Nyhuis G., Bott C., Murthy S. Expanding DEMON sidestream deammonification technology towards mainstream application // *Water Environ. Res.* 2015. V. 87. 2084–2089. <https://doi.org/10.2175/106143015x14362865227319>

Wett B., Omari A., Podmirseg S., Han M., Akintayo O., Brandon M.G., Murthy S., Bott C., Hell M., Takaes I. Going for mainstream deammonification from bench to full scale for maximized resource efficiency // *Water Sci. Technol.* 2013. V. 68. P. 283–289.

Yang Y., Azari M., Herbold C.W., Meng L., Huaihai C., Xinghua D., Denecke M., Gu Ji-D. Activities and metabolic versatility of distinct anammox bacteria in a full-scale wastewater treatment system // *Water Research.* V. 206. 11776. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117763>

Zhang L., Narita Y., Gao L., Ali M., Oshiki M., Ishii S., Okabe S. Microbial competition among anammox bacteria in nitrite-limited bioreactors // *Water Res.* 2017. V. 125. P. 249–258.

Zhang L., Zhang S.J., Gan Y.P., Peng Y.Z. Bio-augmentation to rapid realize partial nitrification of real sewage // *Chemosphere.* 2012. V. 88. P. 1097–1102.

Zhang L., Okabe S. Ecological niche differentiation among anammox bacteria // *Water Res.* 2020. V. 171. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115468>

Zhang Q.-Q., Yang G.-F., Sun K.-K., Tian G.-M., Jin R.-C. Insights into the effects of bio-augmentation on the granule-based anammox process under continuous oxytetracycline stress: Performance and microflora structure // *Chem. Engin. J.* 2018. V. 348. P. 503–513. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.204>

Zhang Q.-Q., Yang G.-F., Zhang L., Zhang Z.-Z., Tian G.-M., Jin R.-C. Bioaugmentation as a useful strategy for performance enhancement in biological wastewater treatment undergoing different stresses: application and mechanisms // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2017. V. 47. P. 1877–1899. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1400851>

Zhu W., Van Tendeloo M., Alloul A., Vlaeminck S.E. Towards mainstream partial nitrification/anammox in four seasons: Feasibility of bioaugmentation with stored summer sludge for winter anammox assistance // *Bioresour. Technol.* 2022. V. 347. Art. 126619.

Zhu W., Van Tendeloo M., Xie Y., Timmer M.J., Peng L., Vlaeminck S.E. Storage without nitrite or nitrate enables the long-term preservation of full-scale partial nitrification/anammox sludge // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 806. Art. 151330. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151330>

Introduction of Exogenous Activated Sludge as a Way to Enhance the Efficiency of Nitrogen Removal in the Anammox Process

N. V. Pimenov¹, Yu. A. Nikolaev¹, *, A. G. Dorofeev¹, V. A. Grachev¹, A. Yu. Kallistova¹, T. A. Kanapatskii¹, Yu. V. Litt¹, E. V. Gruzdev², Sh. A. Begmatov², N. V. Ravin², and A. V. Mardanov²

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Received March 25, 2022; revised March 29, 2022; accepted March 30, 2022

Abstract—The effect of introduction of exogenous activated sludge (bioaugmentation) on the activity and composition of the microbial consortium carrying out the nitrification-anammox process in an SBR bioreactor was investigated. Two bioaugmentation strategies were tested: the exogenous sludge was added either immediately after inoculation with the anammox activated sludge or when the stable mode of nitrogen removal was achieved. The share of introduced sludge (by the amount of ash-free dry matter) was 28–35% of the total activated sludge mass. The growth conditions and community composition for activated sludges differed significantly: members of the genera “*Candidatus Brocadia*” and “*Ca. Jettenia*” were predominant in the aboriginal sludge, while “*Ca. Kuenenia*” and “*Ca. Jettenia*” predominated in the exogenous one. While bioaugmentation at the time of launching resulted in a 15% increase in nitrogen removal efficiency, this positive effect was short-lived (by day 46 of cultivation, the values of nitrogen removal efficiency in the control and experimental reactors were the same). Addition of exogenous activated sludge after the stable nitrogen removal mode was reached (day 53) increased the efficiency of nitrogen removal by 21–35%, and this difference was maintained until the end of the experiment (90 days). The introduced anammox bacteria did not get acclimatized in the community of the SBR reactor; whatever was the method of their introduction, their abundance decreased to the minimum values. Our data indicate that the efficiency of nitrogen removal by nitrification-anammox may be enhanced by introduction of activated sludges differing in both the composition and the cultivation conditions from the aboriginal ones, either at reactor launching or into an actively operating bioreactor.

Keywords: nitrification-anammox, bioaugmentation, community composition, wastewater treatment

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ БИОДЕСТРУКЦИЯ ЭКОТОКСИЧНОЙ
ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НЕРАСТУЩИМИ КЛЕТКАМИ
RHODOCOCCUS RHODOCHROUS ИЭГМ 107¹© 2022 г. К. М. Иванова^а, *, В. В. Гришко^а, И. Б. Ившина^а^аПермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения
Российской академии наук, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: kseniya.cheremnykh@gmail.com

Поступила в редакцию 03.03.2022 г.

После доработки 11.03.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

Экспериментально обоснована возможность полной биодеструкции токсичной дегидроабиетиновой кислоты (ДАК) в высокой (более 500 мг/л) концентрации с помощью не растущих клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107 (ОП₆₀₀ 2.5) в фосфатно-щелочном буфере (рН 8.0). Получен стабильный биокаллизатор, сохраняющий функциональную активность при повторном (до 3 циклов) использовании и длительном (до 84 сут, 4°C) хранении. Показано, что высокая устойчивость родококков к ДАК связана с повышенной растворимостью экотоксиканта в буфере с рН 8.0, что способствует усилению синтеза липидов (в том числе биосурфактантов), повышению сродства клеток к гидрофобному субстрату за счет увеличения гидрофобности клеточной поверхности и, как следствие, детоксикации и биоразложению поллютанта.

Ключевые слова: адаптация, биодеструкция, липиды, *Rhodococcus rhodochrous*, не растущие клетки

DOI: 10.31857/S002636562230022X

Перспективными способами утилизации токсичных соединений являются естественные процессы разложения поллютантов под действием ферментативной активности микроорганизмов, которая протекает при физиологических температурах, нормальном давлении и без применения агрессивных химических реагентов.

Дегидроабиетиновая кислота (ДАК), продуцируемая хвойными растениями семейства *Pinaceae*, является одним из токсичных (ЛД₅₀ 0.5–6.3 мг/л) компонентов сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности (Luchnikova et al., 2019). ДАК обнаруживается в концентрациях 500 мг/л и выше в стоках целлюлозно-бумажных комбинатов, морской и речной воде (Volkman et al., 1993), донных отложениях и почве (Pérez-de-Mora et al., 2008), а также в живых организмах (Hernández et al., 2008). Известно, что многие микроорганизмы способны к биодеструкции ДАК. В основном они представлены мицелиальными грибами (представителями родов *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*) или грамотрицательными бактериями (представителями родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas* и др.) (Luchnikova et al., 2019). Ферментные системы грибов обычно катализируют реакцию гидроксилирования ДАК (300 мг/л) и не способ-

ны полностью ее разлагать, что может привести к образованию производных с аналогичной или большей токсичностью. Кроме того, использование грибов сопряжено с определенными рисками из-за их посевного (спорового) материала и способности синтезировать микотоксины. По литературным данным, биодеградирующая активность бактериальных культур, как правило, проявляется при концентрации ДАК не выше 250 мг/л (Smith et al., 2008). В связи с этим актуален поиск новых биодеструкторов, способных эффективно утилизировать высокие (500 мг/л и выше) концентрации ДАК. Ранее нами было показано, что актинобактерии *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в условиях кометаболизма с *n*-гексадеканом (0.1 об. %) осуществляют биодеструкцию ДАК (500 мг/л) в течение 7 сут (Cheremnykh et al., 2018).

С целью усиления нативных свойств бактериальных клеток используются различные технологические приемы. Для биодеструкции и биотрансформации полициклических органических соединений наиболее распространенным является способ применения не растущих клеток, т.е. отмытых от питательной среды бактериальных клеток (в поздней экспоненциальной или стационарной фазе роста) и перенесенных в среду без источников питания (буферный раствор) (Carvalho et al., 2009; Mutafova et al., 2016; Nawawi et al., 2016). Использование не растущих клеток по сравнению с активно растущей культурой имеет ряд преимуществ.

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S002636562230022X для авторизованных пользователей.

шеств: возможность осуществления строгого регулирования исходной клеточной суспензии; применение высокой плотности клеток, что способствует увеличению уровня биоконверсии и сокращению продолжительности процесса; затрачиваемая на рост энергия перенаправляется на преобразование субстрата; проведение процесса в нестерильных условиях (Julsing et al., 2012; Grishko et al., 2013; Nawawi et al., 2016). Показано (Gefen et al., 2014), что остановка роста бактериальной культуры в стационарной фазе (до 7 сут) не влияет на метаболическую активность клеток (экспрессию генов, синтез белка). Такой период голодания может даже способствовать повышению их каталитической активности в отношении труднодоступных соединений. Например, после двухдневного голодания протеобактерии *Ralstonia eutropha* сохраняли фенолдеструктурирующую активность, при этом гидрофобность их клеточной поверхности и, как следствие, каталитическая активность увеличивались. Использование нерастущих клеток позволяет сократить период их адаптации к токсичному субстрату и повысить индукцию ферментов, ответственных за деградацию фенола (Watanabe et al., 2000).

Целью настоящей работы явилось изучение возможности использования нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 для эффективной биодеструкции ДАК в высоких (500, 750, 1000 мг/л) концентрациях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Микроорганизмы. В работе использовали штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, УНУ 73559, <http://www.iegmc.ru>). Штамм выделен из воды реки Днепр (Днепропетровская область, Украина). Видоспецифичная ПЦР показала положительный результат *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 с праймерами для *R. rhodochrous*. Секвенирован полный геном штамма (номер доступа GenBank WGS JAJNCP010000001-JAJNCP010000118).

Химические вещества. В экспериментах применяли ДАК производства “Mosinter Group Limited” (99.1%, Китай). Использованные в работе этилацетат, гексан, ацетонитрил имели квалификацию х. ч., ч. д. а. или о. с. ч. (“Merck”, “Sigma-Aldrich”). В качестве метилирующего агента использовали (триметилсилил)диазометан в диэтиловом эфире (2.0 М) производства “Sigma-Aldrich” (США).

Биодеструкция с использованием активно растущих клеток. Периодическое культивирование родококков проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 100 мл минеральной среды (Cheremnykh et al., 2018), при температуре 28°C и постоянном перемешивании со скоростью 160 об./мин. Дополнительно в минераль-

ную среду вносили *n*-гексадекан (0.1 об. %). В качестве инокулята использовали суспензию бактериальных клеток (ОП₆₀₀ 1.0), предварительно выращенных на мясопептонном агаре в течение 2 сут.

Биодеструкция с использованием нерастущих клеток. Родококки предварительно выращивали в среде LB (“Sigma-Aldrich”, США), а также в минеральной среде с *n*-гексадеканом (1.0 об. %) или глюкозой (1.0%) при постоянном перемешивании (160 об./мин) и температуре 28°C. В стационарной фазе роста (дополнительные материалы, рис. S1) бактериальные клетки осаждали центрифугированием (4000 об./мин, 10 мин, Hermle Z 200 A, Германия) и трижды промывали эквивалентным объемом фосфатно-щелочного буфера (рН 7.0) по Кларку–Лабсу (Dawson et al., 1986). Отмытые клетки ресуспендировали в 50 мл фосфатно-щелочного буфера (рН 6.0, 7.0, 8.0 или 9.0) и доводили до значения оптической плотности (ОП₆₀₀) 1.5, 2.0, 2.5 или 3.0. ДАК вносили в приготовленную суспензию в виде раствора в 96%-ном этаноле (1 мг/10 мкл) в концентрациях 500, 750 или 1000 мг/л. Процесс биодеструкции контролировали путем отбора проб каждые 24 ч.

Контроли. В экспериментах с растущими клетками использовали 1) минеральную среду, содержащую ДАК (для оценки абиотической стабильности ДАК); 2) минеральную среду без ДАК, содержащую *n*-гексадекан и бактериальные клетки (для дифференциации возможных метаболитов). Контролями в исследованиях с нерастущими клетками служили 1) стерильный раствор ДАК в фосфатно-щелочном буфере и 2) бактериальная суспензия без ДАК (биотический контроль).

Длительное хранение и повторное использование нерастущих клеток. Суспензии клеток (ОП₆₀₀ 2.5) в фосфатно-щелочном буфере (рН 8.0) хранили при температуре 4°C без воздействия солнечного света в течение 84 сут. В случае повторного использования суспензии нерастущих клеток ДАК добавляли трехкратно непосредственно в одну и ту же клеточную суспензию по мере достижения 2% остаточной концентрации ДАК. В отдельных опытах суспензию повторно использовали после 3, 7, 14, 28, 56 или 84 сут хранения. Процесс биодеструкции контролировали путем отбора проб с 12-часовыми интервалами.

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) и концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) ДАК. МПК ДАК определяли микрометодом серийных двукратных разведений с использованием 96-луночных круглодонных полистироловых планшетов. Для этого 100 мкл стерильной среды LB вносили в лунки микропланшета. В первую лунку каждого ряда добавляли 100 мкл растворенной в этаноле ДАК (исходный раствор с концентрацией 100 мг/мл) и тщательно перемешивали. Из полученной смеси отбирали 100 мкл и переносили в следующую лунку. Процедуру повторяли до

образования ряда двукратных разведений. Диапазон концентрации ДАК в одном ряду составлял от 50.0 до 0.7 мг/л. В каждую лунку инокулировали 10 мкл бактериальных клеток (5×10^5 кл./мл), предварительно выращенных в LB. Планшеты инкубировали при температуре 28°C в течение 48 ч. Концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) определяли также микрометодом серийных двукратных разведений с аналогичным титрованием ДАК, однако вместо LB в данном случае в лунки микропланшета вносили 100 мкл суспензии нерастущих клеток (ОП₆₀₀ 2.5) в буфере (рН 6.0, 7.0, 8.0 или 9.0). Планшеты инкубировали при температуре 28°C в течение 48 ч. За значение IC_{50} принимали концентрацию, при которой оставалось 50% живых бактериальных клеток.

Оценка жизнеспособности. Для определения жизнеспособности бактериальных клеток применяли метод окрашивания йодонитротетразолиевым фиолетовым (INT). Для этого 100 мкл опытного образца и 50 мкл 0.2%-ного водного раствора INT вносили в 96-луночные круглодонные полистироловые микропланшеты ("Медполимер", Россия). Для разрушения агрегатов смесь клеток с INT многократно пипетировали. Образцы инкубировали при температуре 28°C в течение 24 ч. Оптическую плотность окрашенной суспензии измеряли с помощью микропланшетного ридера Multiscan Ascent ("Thermo Electron Corporation", Финляндия) при длине волны 630 нм.

Респираторная активность. Дыхательную активность бактериальных клеток измеряли с помощью 10-канального респирометра непрямого замкнутого цикла MicroOxymaxR ("Columbus Instruments", США), подключенного к персональному компьютеру. Эксперименты проводили в стеклянных флаконах Micro-Oxymax вместимостью 300 мл при постоянном перемешивании (300 об./мин, $28 \pm 2^\circ\text{C}$) на многоместной магнитной мешалке RT 10 ("Power IKAMAG", Германия). Количество (мкл) и скорость (мкл/мин) потребляемого O_2 и выделяемого CO_2 регистрировали автоматически с 30-минутными интервалами в течение 7 сут.

Микроскопия. Изображения бактериальных клеток, полученные с помощью микроскопа Axiostar plus ("Carl Zeiss", Германия) в фазово-контрастном режиме, визуализировали с использованием камеры PRO-150ES ("Pixera", США). Размеры клеток и клеточных агрегатов определяли с помощью компьютерной программы Video Test-Size 5.0 (Санкт-Петербург, Россия). Среднеквадратичную шероховатость поверхности живых клеток и силу адгезии измеряли с помощью комбинированной микроскопической системы, состоящей из атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D-BIO ("Asylum Research", США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV1000 ("Olympus Corporation", Япония). Внутриклеточные ли-

пидные включения анализировали с помощью микроскопа Axio Imager M2 ("Zeiss", Германия), оснащенного флуоресцентным источником света HXP 120 B и камерой AxioCam 506 Color ("Zeiss", Германия).

Окрашивание бактериальных клеток нильским красным. Для выявления внутриклеточных липидных включений родококки окрашивали 0.08% раствором нильского красного в диметилсульфоксиде ("Nanjing Dulai Biotechnology Co.", Китай), как описано в работе (Mrunalini, Girisha, 2017). Суспензию клеток (1 мл) центрифугировали при 12000 об./мин в течение 5 мин. Осажденные клетки ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды и добавляли 40 мкл рабочего раствора нильского красного (конечная концентрация 0.3 мкг/мл). Полученную суспензию инкубировали при температуре 28°C в течение 40 мин при постоянном перемешивании (160 об./мин). От реакционной среды клетки отделяли центрифугированием и ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды. Суспензию клеток (0.02 мл) наносили на чистое предметное стекло и регистрировали флуоресценцию при двух спектральных установках на микроскопе Axio Imager M2 ("Zeiss", Германия): желто-золотистая флуоресценция с использованием узкополосного светофильтра 450–500 нм и красная флуоресценция с использованием узкополосного светофильтра 515–560 нм.

Выделение общих клеточных липидов и миколовых кислот. Для выделения общих клеточных липидов сухую биомассу (0.05 г) суспендировали в 3.75 мл смеси хлороформ–метанол (2 : 1) (Hawthorne, 1988). Полученную клеточную суспензию интенсивно встряхивали и инкубировали при температуре 28°C в течение 2 ч. После центрифугирования при 3000 об./мин в течение 15 мин супернатант собирали в центрифужную пробирку, к осадку добавляли 5 мл смеси хлороформ–метанол–вода (2 : 1 : 0.8), встряхивали, центрифугировали и снова собирали супернатант. К объединенным супернатантам добавляли 2.5 мл хлороформа и 2.5 мл воды, перемешивали и центрифугировали. Слой хлороформа переносили в предварительно взвешенную круглодонную колбу, разбавляли равным объемом бензола и упаривали при температуре 60°C на ротормном испарителе ("Heidolph", Германия). Затем колбу взвешивали до постоянного веса на высокоточных аналитических весах AUW 120D ("Shimadzu", Япония). Количество общих клеточных липидов выражали в мг/г абсолютно сухого веса (АСВ).

Миколовые кислоты анализировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) их метиловых эфиров (Minnikin et al., 1975). Для этого готовили метанолизаты бактериальных клеток. Сухую биомассу (0.2 г) суспендировали в 10 мл смеси метанола и толуола (1 : 1), добавляли 0.2 мл H_2SO_4 и инкубировали при температуре 50°C не менее 12 ч. Затем метиловые эфиры миколовых кислот экс-

трагировали *n*-гексаном (2 мл). ТСХ проводили трехкратно на пластинах с силикагелем (20 × 20 см, “Merck”) в системе растворителей петролейный эфир–диэтиловый эфир (85 : 25). Метанолизаты цельных клеток *R. ruber* ИЭГМ 70^T использовали в качестве контроля для определения метиловых эфиров миколовых кислот типа “ruber/rhodochrous”.

Выделение биосурфактантов. Клеточные суспензии, полученные после 72-часовой ферментации с 500, 750 или 1000 мг/л ДАК, обрабатывали с помощью ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 (“Sanyo”, Великобритания) в течение 30 минут при амплитуде 10 мкм и обязательном охлаждении. Биосурфактанты экстрагировали с использованием метил-*трет*-бутилового эфира, который добавляли к клеточному гомогенату в соотношении 2 : 1 (Kuyukina et al., 2001). Экстрагирование проводили на орбитальном шейкере (160 об./мин) при температуре 28°C в течение 3 ч. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя (“Heidolph”, Германия).

Степень гидрофобности клеточной поверхности измеряли методом Salt Aggregation Test (SAT) (Lindahl et al., 1981). Родококки суспендировали в фосфатном буфере (pH 6.0, 7.0, 8.0 и 9.0) с добавлением (NH₄)₂SO₄. За условную величину гидрофобности клеточной поверхности принимали минимальную концентрацию раствора (NH₄)₂SO₄, при которой наблюдалось формирование клеточных агрегатов. Оценку степени гидрофобности проводили по шкале: высокая гидрофобность – показатель солености раствора сульфата аммония от 0 до 0.8 М; умеренная – от 1.0 до 2.0 М; слабая – от 2.2 до 3.8 М.

Растворимость ДАК определяли микрометодом серийных двукратных разведений с использованием 96-луночных круглодонных полистироловых планшетов. В лунки микропланшета вносили 100 мкл буфера (pH 6.0, 7.0, 8.0 или 9.0). Растворимость определяли как концентрацию, при которой ОП₆₃₀ экспериментального раствора ДАК и ОП₆₃₀ контрольного буфера были сопоставимы (микропланшетный ридер Multiscan Ascent, “Thermo Electron Corporation”, Финляндия) (Singh et al., 2017).

Получение клеточных фракций. Родококки, предварительно выращенные в среде LB течение 48 ч, трижды отмывали и ресуспендировали в 100 мл фосфатно-щелочного буфера (pH 8.0). Суспензию клеток гомогенизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 (“Sanyo”, Великобритания, амплитуда 10 мкм, 45 мин, обязательное охлаждение). В результате обработки ультразвуком менее 0.1% клеток оставалось интактными, что подтверждалось микроскопическими исследованиями и микрометодом точечных высевов (КОЕ/мл). Клеточный гомогенат центрифугировали (6000 об./мин, 4°C, 15 мин) для получения

цитоплазматических ферментов (супернатант) (I) на центрифуге Mikro 22R (“Hettich Zentrifugen”, Германия). Солюбилизацию мембраносвязанных ферментов проводили путем ресуспендирования осадка в 100 мл 1% раствора Triton X-100 (“Sigma-Aldrich”) в фосфатно-щелочном буфере (pH 8.0) и перемешивания на орбитальном шейкере в течение 30 мин. С помощью центрифугирования (6000 об./мин, 4°C, 15 мин) получали супернатант с экстрагированными мембраносвязанными ферментами (II). Осадок клеточных соникатов с ферментами, прочно связанными с мембраной и неэкстрагируемыми детергентом (III), ресуспендировали в 100 мл фосфатно-щелочного буфера (pH 8.0). Подготовленные клеточные фракции включали (I) супернатант с цитоплазматическими ферментами; (II) супернатант с экстрагированными мембраносвязанными ферментами; (III) ресуспендированный клеточный соникат с неэкстрагируемыми ферментами. В качестве контроля использовали нерастущие клетки (ОП₆₀₀ 2.5) в фосфатно-щелочном буфере (pH 8.0).

Экстракция и идентификация остаточной ДАК и ее метаболитов. Для выделения остаточной ДАК и ее возможных метаболитов ферментационную среду подкисляли 10%-ным раствором HCl и трижды экстрагировали эквивалентным объемом этилацетата. Объединенные экстракты последовательно промывали 1%-ным водным раствором NaHCO₃ и дистиллированной водой (до pH 7.0). Этилацетатный экстракт обезвоживали над безводным Na₂SO₄. Растворитель удаляли с помощью роторного испарителя (“Heidolph”, Германия). Качественный контроль проводили методом ТСХ в системе этилацетат–*n*-гексан (3 : 7). Остаточную ДАК и продукты ее биотрансформации предварительно метилировали (триметилсилил)дiazометаном и анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на хроматографе Agilent 6890N/5975B (“Agilent Technologies”, США), оборудованном капиллярной колонкой HP-5ms (30 м × 0.25 мм, 0.25 мкм) и работающем в режиме ионизации электронным ударом (70 эВ). В качестве газа-носителя использовали гелий (1 мл/мин). Температуру колонки программировали от 120 до 320°C. Масс-спектры записывали в диапазоне *m/z* от 40 до 460 а.е.м. и подтверждали с использованием библиотеки NIST08. Количественный анализ убыли ДАК проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LC Prominence 20AD (“Shimadzu”, Япония) с обращенно-фазовой колонкой SupelCosilTM LC-18 (150 × 4.5 мм, 5 мкм) и диоксидно-матричным детектором (SPD-M20A). Подвижная фаза содержала 70%-ный раствор ацетонитрила; скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин; температура колонки 40°C; длина волны детектирования ДАК составляла 190 нм. В описанных условиях время удерживания метилового эфира ДАК составляло 14.99 ± 0.02 мин.

Данные регистрировали и обрабатывали с помощью программы LCSolution (v. 1.25).

Анализ экотоксичности и растворимости ДАК и ее метаболитов *in silico*. Экотоксичность, $\log K_{ow}$ и растворимость в воде ДАК оценивали с помощью компьютеризированных систем ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship, v. 1.11), KOWWIN (программа коэффициента распределения Log Octanol-Water, v. 1.68) и WSKOWWIN (v. 1.41), доступных в программном пакете EPI Suite™ (The Estimation Programs Interface, EPA, США) соответственно. Программа ECOSAR позволяет проводить оценку потенциальной острой и хронической токсичности химических веществ для водных организмов с помощью компьютеризированных взаимосвязей между структурой и активностью (SAR). Экотоксичность соединений прогнозировали на основании имеющихся данных о токсическом действии органических соединений различных химических классов. С помощью программы KOWWIN оценивали логарифмические коэффициенты распределения октанол–вода ($\log K_{ow}$) органических соединений на основе химической структуры с использованием методологии, описанной в (Meylan, Howard, 1995). Программное обеспечение WSKOWWIN использовали для оценки растворимости органического соединения в воде с использованием коэффициента $\log K_{ow}$ соединения в соответствии с методологией (Meylan et al., 1996).

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для статистического анализа данных использовали программу STATISTICA (StatSoft Россия, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биодеструкция ДАК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. В работе использовали различные условия предварительного выращивания для получения каталитически активной биомассы клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. Ранее (Cheremnykh et al., 2018) была показана возможность эффективной биодеструкции ДАК в условиях роста в минеральной среде с *n*-гексадеканом. Однако использование гексадекансодержащей среды для приготовления суспензий нерастущих клеток малоэффективно: бактериальные клетки в присутствии *n*-гексадекана образуют агрегаты, которые трудно отделить от инкубационной среды и остаточного *n*-алкана. Использование глюкозы как альтернативного источника углерода не позволило получить клеточную биомассу в достаточном количестве ($OP_{600} < 1.0$). Применение богатой питательной среды (LB) для предварительного выращивания *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 позволило получить клеточную суспензию с высокой плотностью (OP_{600} до 3.0). Для полного (более 99%) разложения 500 мг/л ДАК в течение 5 сут наиболее

эффективным оказалось использование бактериальной суспензии с OP_{600} 2.5. Дальнейшее увеличение концентрации используемой биомассы до OP_{600} 3.0 (16 г/л сухой биомассы) сопровождалось снижением уровня биодеструкции ДАК (рис. 1а).

Согласно полученным данным, изменение pH от 6.0 до 9.0 не влияло на выживаемость родококков (OP_{600} 2.5, без ДАК). Тем не менее, показатели pH буфера влияли на устойчивость бактериальных клеток к токсическому действию поллютанта. Установлено, что значения IC_{50} ДАК для родококков в слабокислых (pH 6.0) и щелочных (pH 9.0) условиях среды составляли 3.0 и 1.0 г/л соответственно. В то время как в буферном растворе с нейтральным (pH 7.0) и слабощелочным (pH 7.0, 8.0) значением pH IC_{50} регистрировали на уровне 8 г/л. Кроме того, при изменении pH буфера с 6.0 до 9.0 было зафиксировано увеличение растворимости ДАК с 31 до 250 мг/л. Как показано на рис. 1б, из всех испытанных буферных растворов (pH 6.0, 7.0, 8.0 или 9.0) буфер с pH 8.0 оказался наиболее эффективным для сокращения продолжительности процесса биодеструкции ДАК до 3 сут. При этом остаточная концентрация ДАК составляла менее 1% (5 мг/л).

По результатам проведенных исследований респираторной активности бактериальных клеток, скорость потребления O_2 (дополнительные материалы, рис. S2) и выделения CO_2 также зависели от значений pH буферного раствора (рис. 2а, 2б). Максимальная скорость выделения CO_2 нерастущими клетками до добавления ДАК выявлялась при pH 7.0, тогда как дыхательная активность клеток в буферах с pH 6.0, 8.0 и 9.0 была несколько ниже. Внесение ДАК в реакционную среду приводило к значительному увеличению скорости выделения родококков. Наиболее выраженное изменение (от 6.46 до 25.60 мкл/мин) скорости выделения CO_2 регистрировали через сутки после добавления ДАК в бактериальную суспензию в буфере с pH 8.0 (рис. 2а). В этих условиях достигался максимальный уровень биодеструкции ДАК – от 500 до 280 мг/л (см. рис. 1б). В целом, дыхательная активность клеток в присутствии ДАК была значительно выше, чем в биотическом контроле. В абиотическом контроле показатели дыхательной активности клеток и биодеструкции ДАК были нулевыми.

Биодеструкция ДАК в высоких концентрациях нерастущими клетками при их многократном использовании. Нерастущие клетки сохраняли каталитическую активность в слабощелочной среде при концентрации ДАК более 500 мг/л и практически полностью (98%) разлагали ДАК (до 1000 мг/л) в течение 7 сут. В сравнительных экспериментах с растущими клетками биодеструкция 750 и 1000 мг/л ДАК протекала в течение 8 и 11 сут соответственно (рис. 3).

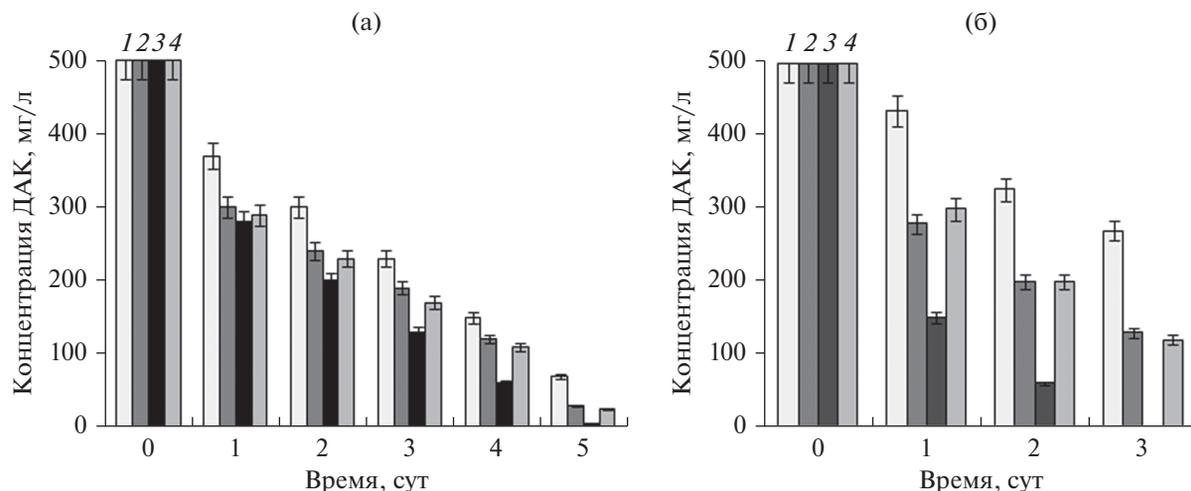


Рис. 1. (а) – Влияние ОП₆₀₀ 1.5 (1), 2.0 (2), 2.5 (3) или 3.0 (4) клеточной суспензии *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 на биодеструкцию ДАК (500 мг/л): использовали фосфатно-щелочной буфер с рН 7.0. (б) – Влияние значений рН 6.0 (1), 7.0 (2), 8.0 (3) и 9.0 (4) фосфатно-щелочного буфера на биодеструкцию ДАК (500 мг/л): использована суспензия нерастущих клеток (ОП₆₀₀ 2.5).

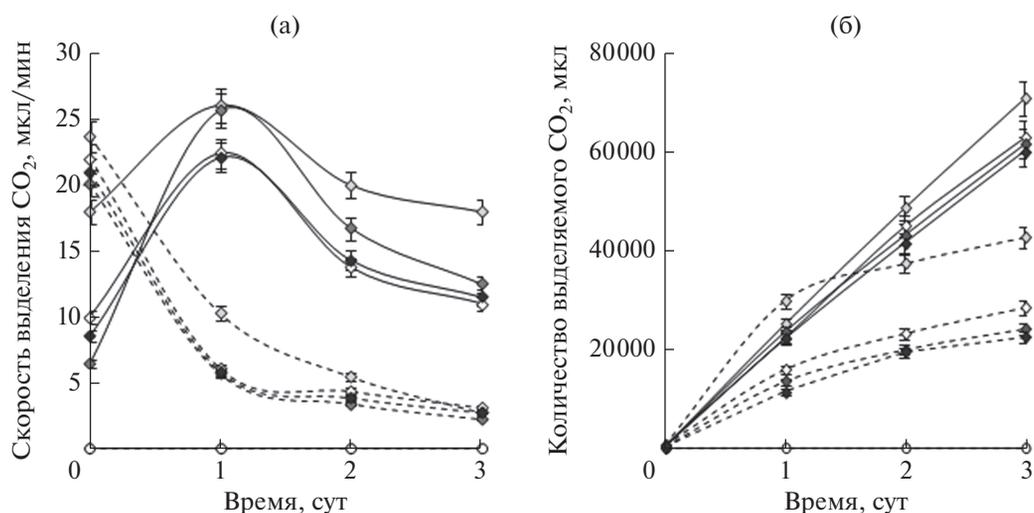


Рис. 2. Влияние значений рН 6.0 (◇), 7.0 (◊), 8.0 (◆) и 9.0 (♦) фосфатно-щелочного буфера на скорость (а) и количество (б) выделяемого CO₂ в процессе биодеструкции ДАК (500 мг/л) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (—), биотический контроль (- - -), абиотический контроль (○).

Как видно из рис. 4, клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 сохраняли жизнеспособность и проявляли деструктирующую активность по отношению к ДАК даже после длительного хранения в течение 84 сут при температуре 4°C. Стабильность биодеструктора также подтверждалась возможностью многократного использования бактериальной суспензии. Как представлено на рис. 5, использование свежеприготовленной клеточной суспензии позволяло утилизировать три порции токсиканта подряд во всем диапазоне концентраций. Средняя продолжительность деструкции одной порции 500, 750 и 1000 мг/л ДАК составляла 3, 7 и 8 сут соответственно. Кроме того, такое мно-

гократное использование возможно и после длительного хранения бактериальных клеток при температуре 4°C.

Биодеструкция ДАК с использованием клеточных фракций. Как видно из табл. 1, максимальную деструктирующую активность по отношению к ДАК регистрировали у супернатантов, содержащих цитоплазматические ферменты. Важно отметить, что именно в этой фракции после метилирования обнаружены интермедиаты с m/z 328.1 и 362.2, масс-спектры которых соответствовали масс-спектрам метиловых эфиров 7-оксо-

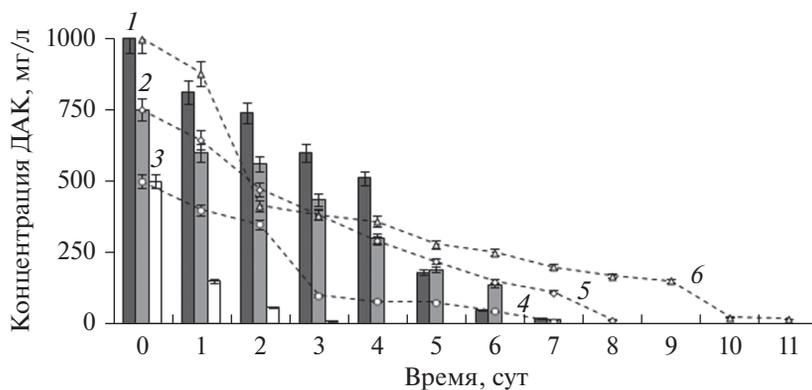


Рис. 3. Динамика биодеструкции ДАК нерастущими (столбцы; 500 (1), 750 (2) и 1000 (3) мг/л) и активно растущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (пунктирные линии; 500 (4), 750 (5) и 1000 (6) мг/л ДАК).

ДАК (соединение 2) и 11,12-дигидрокси-7-оксо-абиета-8,13-диен-18-овой кислоты (соединение 3).

В табл. 2 приведены результаты оценки растворимости и экотоксичности ДАК и ее метаболитов с помощью пакета программного обеспечения EPI Suite™. Значение $\log K_{ow}$ использовали для оценки способности химических веществ накапливаться в жировых тканях организмов (биоаккумуляция). В соответствии со Стокгольмской конвенцией о стойких органических загрязнителях (СОЗ), соединения с $\log K_{ow}$ более 5 считаются способными к биоаккумуляции (The United Nations Environment Programme, 2019). На основании расчетных данных, соединение 3 имеет значение $\log K_{ow}$ 3.9, что в 1.2 и 1.4 раз меньше аналогичных значений ДАК и соединения 2, и, соответственно, обладает меньшей способностью к биоаккумуляции в тканях водных организмов. Соединение 3 характеризуется большей (7.5 мг/л) растворимостью в воде, чем исходная ДАК (6.6 мг/л) и соединение 2 (0.5 мг/л). Ранее нами было показано, что значение МПК смеси остаточной ДАК и ее метаболитов в отношении *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 составляло 1500 мг/л по сравнению с таковым исходной ДАК (750 мг/л) (Sheremnykh et al., 2018).

Реакция нерастущих клеток на токсическое действие ДАК. Нерастущие клетки в присутствии ДАК в концентрации 500 мг/л образовывали обособленные микроагрегаты (50–300 мкм) с гетерогенной структурой, представляющие собой клетки, прикрепленные к поверхности мелких частиц ДАК (рис. 6). При этом адгезия бактерий имела неспецифический характер, поскольку инактивированные автоклавированием клетки образовывали аналогичные агрегаты (50–250 мкм) в присутствии 500 мг/л ДАК (данные не представлены). Внесение ДАК в концентрации 750 и 1000 мг/л приводило к достоверному увеличению размеров клеточных агрегатов (≤ 350 мкм). Поверхность крупных (200–350 мкм) агрегатов покрывали в основном мертвые клетки (дополнительные материалы, рис. S3). По результатам

ИТ-окрашивания, а также подсчета КОЕ, количество (менее 10%) живых клеток существенно не менялось в процессе биодеструкции ДАК независимо от исходной концентрации токсиканта. На АСМ- и АСМ-КЛСМ-изображениях нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии ДАК отмечали образование внеклеточной жидкости (рис. 7). Окрашивание нильским красным клеток выявляло наличие множества мелких дискретных образований, распределенных по всей цитоплазме (рис. 8). В контрольных вариантах опытов таких включений не обнаруживалось. По мере повышения концентрации ДАК отмечали постепенное увеличение морфометрических показателей клеток и среднеквадратичной шероховатости клеточной поверхности (табл. 3). В целом, действие ДАК на родококки проявлялось в уменьшении (от 3.7 до 9.2%) относительной площади поверхности (S/V) бактериальных клеток в зависимости от концентрации ДАК.

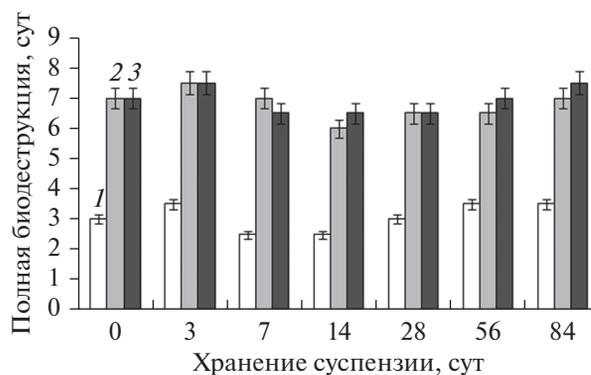


Рис. 4. Продолжительность процесса биодеструкции ДАК (500 (1), 750 (2) и 1000 (3) мг/л) с использованием свежеприготовленной суспензии (0 сут) и клеточными суспензиями *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 после длительного хранения (3, 7, 14, 28, 56 и 84 сут). Представлены данные, полученные по мере достижения 2% остаточной концентрации ДАК.

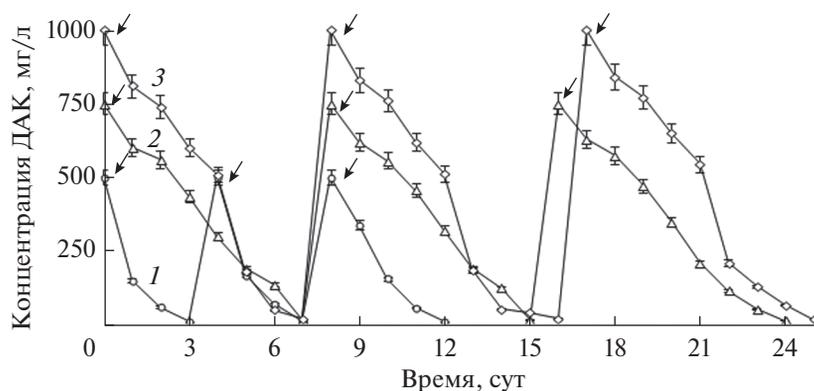


Рис. 5. Многократное использование свежеприготовленных суспензий нерастающих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 для биодеструкции 500 (1), 750 (2) и 1000 (3) мг/л ДАК. Стрелками указано время внесения ДАК.

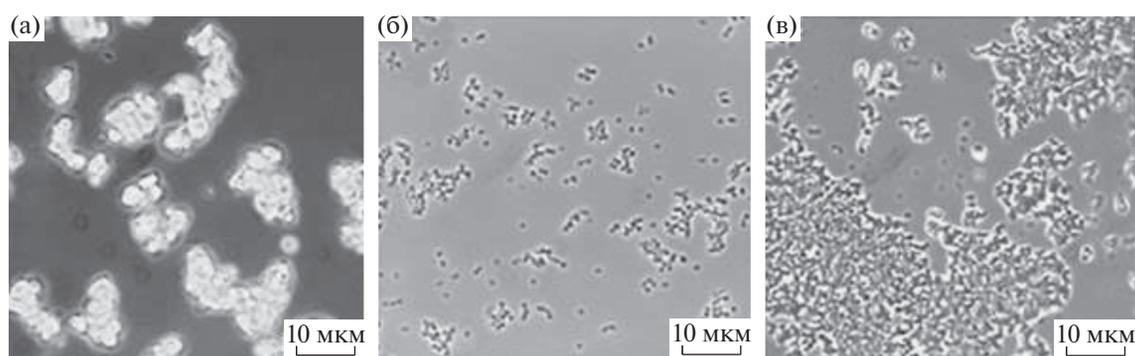


Рис. 6. Фазово-контрастная микроскопия ДАК (а), биотического контроля (б) и агрегации клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии 500 мг/л ДАК (в) ($\times 1000$).

В присутствии 500, 750 и 1000 мг/л ДАК регистрировали значительное увеличение продукции биосурфактантов (6.9 ± 2.1 , 27.3 ± 1.7 и 39.8 ± 4.3 мг/г соответственно) по сравнению с контрольными вариантами опыта (0.1 ± 0.02 мг/г). Помимо биосурфактантов клетки *R. rhodochrous* синтезировали и другие липидные вещества, что приводило к увеличению общих клеточных липидов с 48.6 ± 3.5 мг/г (контроль) до 64.0 ± 4.4 , 64.2 ± 0.4 и 111.1 ± 5.6 мг/г (500, 750 и 1000 мг/л ДАК соответственно). ТСХ-анализ метанолиза-

тов клеток выявлял также увеличение количества метиловых эфиров миколовых кислот (дополнительные материалы, рис. S4).

Повышение биосинтеза липофильных соединений в присутствии ДАК сопровождалось значительным увеличением степени гидрофобности родококков. По данным SAT, клетки после биодеструкции ДАК (500, 750 или 1000 мг/л) образовывали устойчивые микроагрегаты под действием относительно низких концентраций раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.2, 0.8 и 0.6 М соответственно) за счет усиления

Таблица 1. Биодеструкция ДАК с использованием клеточных фракций

Клеточная фракция	Продукты биодеструкции*, %		
	ДАК	Метаболит m/z 328.1	Метаболит m/z 362.2
Целые клетки	30.6 ± 0.5	—	—
Супернатант с цитоплазматическими ферментами (I)	33.5 ± 3.6	17.3 ± 3.7	13.5 ± 2.3
Супернатант с тритон-экстрагированными мембранно-связанными ферментами (II)	100.0	—	—
Ресуспендированный клеточный соникат с неэкстрагированными ферментами (III)	84.7 ± 3.4	—	—

* Приведены результаты ГХ-МС после 24 ч инкубирования клеточных фракций родококков с ДАК (500 мг/л).

Таблица 2. Оценка растворимости и экотоксичности ДАК и ее метаболитов с использованием программного пакета EPI Suite™

	ДАК	Соединение 2	Соединение 3
ECOSAR класс	Смолы – кислоты	Нейтральная органика – кислоты	Винил/аллилкетоны – кислоты
Log K _{ow}	4.8	5.5	3.9
Растворимость в воде, мг/л	6.6	0.5	7.5
Острая токсичность, мг/л			
Рыба LD ₅₀ (96 ч)	1.152	1.833	128.231
Дафния LD ₅₀ (48 ч)	1.971	1.439	47.358
Зеленые водоросли ED ₅₀ (96 ч)	5.159	4.087	40.679
Хроническая токсичность, мг/л			
Рыба ED ₅₀ (30 сут)	0.177	0.262	17.192
Дафния ED ₅₀ (21 сут)	0.303	0.345	10.815
Зеленые водоросли ED ₅₀ (16 сут)	1.753	2.201	29.098
Категория экотоксичности*	II	II	III

* В соответствии с “Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ, СГС”.

гидрофобного межклеточного взаимодействия. В контроле (без ДАК) степень гидрофобности оценивалась как умеренная, поскольку устойчивые микроагрегаты образовывались в присутствии 1.6 М раствора (NH₄)₂SO₄. Проведенное АСМ-сканирование и анализ карт адгезии зонда кантилевера к поверхности клеток выявили перераспределение адгезивных участков клеточной поверхности и появление высокоадгезивных (светлых) участков (дополнительные материалы, рис. S5). В целом, средние значения сил адгезии (30.82 ± 3.59, 34.83 ± 4.08, 37.56 ± 2.60 нН) в присутствии 500, 750 или

1000 мг/л ДАК по сравнению с контролем (15.63 ± 2.23 нН) увеличивались в 1.9, 2.0, 2.2 и 2.4 раза соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ранних исследованиях по биоконверсии различных органических соединений с использованием нерастущих клеток *Rhodococcus* была уже показана взаимосвязь между каталитической активностью и высокой плотностью биомассы (Grishko et al., 2013; Nawawi et al., 2016; Mutafova

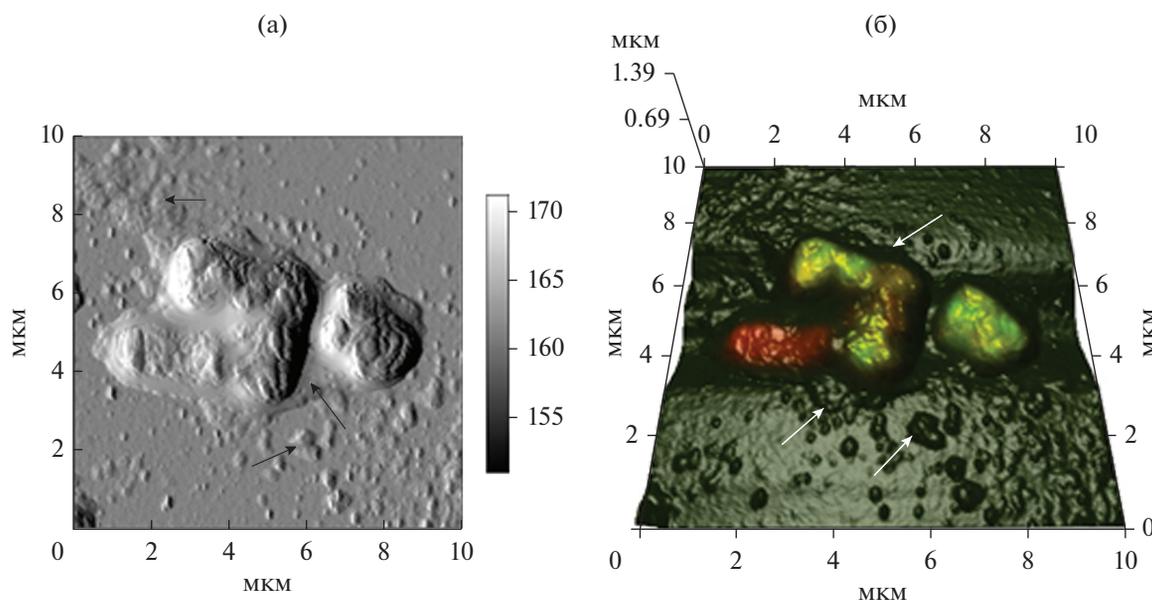


Рис. 7. АСМ (а) и комбинированные АСМ-КЛСМ (б) изображения клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии ДАК. Данные представлены через 3 сут инкубации родококков. Стрелками указана внеклеточная жидкость.

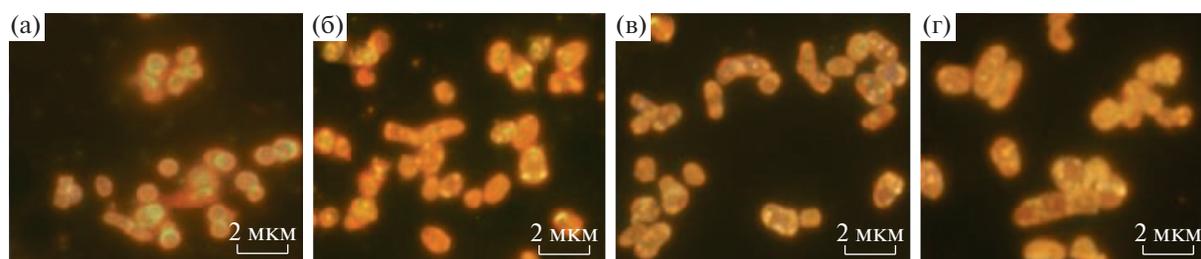


Рис. 8. Образование внутриклеточных липидных включений родококками ((а) – биотический контроль) в присутствии 500 (б), 750 (в) и 1000 (г) мг/л ДАК ($\times 1000$).

et al., 2016). В настоящем исследовании обнаружена аналогичная зависимость при разложении ДАК (500 мг/л) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. Однако, по нашим данным, увеличение количества биомассы ОП₆₀₀ выше 2.5 (13 г/л сухой биомассы) приводило к снижению уровня биоконверсии ДАК. Наблюдаемый эффект, по-видимому, обусловлен снижением массопереноса при увеличении плотности биомассы клеток и перераспределении субстрата в буферной системе.

Известно, что родококки способны выживать при экстремальных значениях pH от 1.0 до 11.0, однако оптимальными для них являются нейтральные значения pH (Pátek et al., 2021). Согласно нашим результатам, величина pH оказывала существенное влияние на продолжительность процесса биодеструкции, устойчивость родококков к токсическому действию ДАК и их дыхательную активность.

Повышение скорости биодеструкции ДАК в слабощелочных условиях может быть связано с увеличением биодоступности (растворимостью) и снижением токсичности ДАК по отношению к бактериальным клеткам. Peng и Robert (2000) указывали на тенденцию к снижению токсичности при увеличении растворимости смоляных кислот. Кроме того, на примере дафний и рыб показано, что при увеличении величины pH с 6.5 до 10.0 токсичность ДАК снижалась, так как показатель ЛД₅₀ смещался с 1–2 до 45–70 мг/л (Zanella, 1983). Поскольку биологическая очистка сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности про-

водится при pH 7.8 (Kang et al., 2009), полученные нами данные свидетельствует о целесообразности использования нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в промышленных условиях.

В сточных водах целлюлозно-бумажной промышленности ДАК может присутствовать в концентрации до 1000 мг/л. Поэтому для оценки возможного использования родококков в качестве эффективных биокатализаторов были проведены исследования по биодеструкции ДАК в аналогичной концентрации. Более того, за счет повторного использования общая нагрузка ДАК на одну порцию суспензии нерастущих клеток была увеличена до 3000 мг/л. Такой подход является достаточно распространенным методом повышения эффективности биоконверсии трудноразлагаемых соединений (Pan et al., 2019). Важно отметить, что большинство известных бактериальных деструкторов ДАК способны утилизировать только до 300 мг/л токсиканта. Грибные культуры способны к неполной деструкции ДАК в более высоких концентрациях с образованием гидроксипроизводных (Luchnikova et al., 2019).

Известно, что ферменты, участвующие в биокислении ксенобиотиков, как правило, локализованы в цитоплазме или связаны с клеточной мембраной (Janocha et al., 2013). По нашим данным, в процессе биодеструкции ДАК в основном принимали участие цитоплазматические ферменты клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, что косвенно свидетельствовало о наличии транспортной системы, обеспечивающей перенос ДАК че-

Таблица 3. Влияние ДАК на морфометрические параметры и изменения клеточной поверхности

Условия	Морфометрические параметры				Относительная площадь (S/V), мкм ⁻¹	Шероховатость, нм
	Длина, мкм	Ширина, мкм	Объем (V), мкм ³	Площадь (S), мкм ²		
Клетки без ДАК (Контроль)	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.14 ± 0.3	6.04 ± 0.2	5.38 ± 0.1	229.6 ± 14.1
Клетки с ДАК 500 мг/л*	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.23 ± 0.2	6.38 ± 0.3	5.18 ± 0.1	231.2 ± 11.3
Клетки с ДАК 750 мг/л*	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.33 ± 0.3	6.73 ± 0.4	5.06 ± 0.1	237.1 ± 15.3
Клетки с ДАК 1000 мг/л*	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.52 ± 0.4	7.42 ± 0.5	4.88 ± 0.1	249.6 ± 19.3

* Данные получены после инкубации бактериальных клеток в фосфатно-щелочном буфере (pH 8.0) с ДАК.

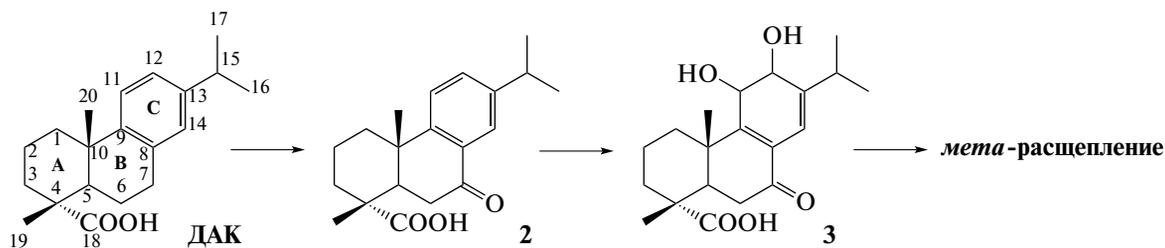


Рис. 9. Предполагаемый путь биодеструкции ДАК с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107.

рез мембрану внутрь клетки. Биодеструкция ДАК клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 107, по-видимому, происходила аналогично, как в случае использования клеток *P. abietaniphila* ВКМЕ-9, путем окисления атома С-7 с последующим дигидроксилированием ароматического кольца и его *мета*-расщеплением (рис. 9), что коррелирует с предложенным ранее (Martin et al., 1999) “классическим” путем бактериальной деструкции смоляных кислот абиетанового типа.

Результаты моделирования и оценки растворимости и экотоксичности выявленных соединений с использованием пакета программ EPI Suite™ показали, что соединение 3 является значительно менее гидрофобным (7.5 мг/л) по сравнению с ДАК (6.6 мг/л) и другим ее производным (соединение 2, 0.5 мг/л). Сравнительно низкая биоаккумуляция и высокая растворимость в воде соединения 3 свидетельствуют о его большей биодоступности. Кроме того, в отношении соединения 3 обнаружена значительно меньшая степень экотоксичности по отношению к водным организмам. В соответствии с принятой “Согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ, СГС”, соединение 3 относится к категории III, а ДАК и соединение 2 – II категории экотоксичности веществ, опасных для водной среды и представляющих наибольший экологический риск (The United Nations, 2011). Таким образом, на основании компьютерного анализа и результатов определения ингибирующей активности (данные МПК) можно предположить, что процесс биодеструкции ДАК с использованием нерастающих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 протекает через менее токсичный интермедиат 3.

При изучении особенностей взаимодействия бактериальных клеток с ДАК установлено, что наиболее типичной адаптивной реакцией нерастающих клеток явилось формирование обособленных многоклеточных агрегатов. Биологический смысл агрегации состоит прежде всего в защите бактериальных клеток от токсического воздействия химических соединений. По нашим данным, агрегация усиливается по мере увеличения концентрации ДАК. Поверхность клеточных агрегатов в основном покрыта мертвыми клетками.

Мертвые клетки в составе многоклеточных агрегатов, по-видимому, играют защитную роль от стресс-факторов внешней среды, снабжают живые клетки источниками питания, способствуют экономии энергии и тем самым обеспечивают реализацию адапционных стратегий консорциума для успешной биодеструкции токсического субстрата (Allocati et al., 2015). Аналогичные реакции адаптации описаны у биопленок *Klebsiella pneumoniae* к антибиотикам (Desai et al., 2019), представителей *Rhodococcus* spp. к фармполлютантам (Ivshina et al., 2019) и органическим растворителям (Коршунова и соавт., 2016).

Другой адаптивной реакцией на токсическое действие ДАК явилось изменение морфометрических параметров клеток. По мере увеличения концентрации ДАК действие токсиканта на родококки проявлялось в уменьшении соотношения площади и объема бактериальной клетки на 3.7–9.3%. Это защитная реакция, обеспечивающая постепенное поступление молекул токсиканта внутрь клеток. Полученные данные согласуются с ранними наблюдениями за реакциями родококков на присутствие таких токсичных веществ, как тиоанизол и диклофенак (Kylosova et al., 2016; Ivshina et al., 2019).

При АСМ- и АСМ-КЛСМ-сканировании нерастающих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 в присутствии высоких концентраций ДАК зарегистрировано образование внеклеточной жидкости. Такое наблюдение может быть объяснено возможным формированием биопленки: клетки прикрепляются к субстрату и начинают секретировать внеклеточные полимерные вещества (полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды) или внеклеточный матрикс, цементирующий клеточный консорциум в биопленку (Flemming, 2016). Возможен и другой характер формирования обнаруживаемой внеклеточной жидкости. Родококки при взаимодействии с гидрофобными соединениями, как правило, продуцируют биосурфактанты гликолипидной природы с высокой поверхностной активностью, которые способствуют солиubilизации субстрата и обеспечивают увеличение площади контакта клеток с субстратом (Ivshina et al., 1998). Можно предположить, что функция биосурфактантов заключается в посте-

пенном растворении гидрофобного субстрата и запуске механизма его транспорта в клетку (Tagarova et al., 2017). Наблюдаемые на рис. 7 внеклеточные структуры (мицеллы, везикулы и пузырьки) аналогичны обнаруженным ранее при сканировании актинобактериальных сурфактантов, абсорбированных на стекле (Куукина et al., 2016). Подтверждением вывода о липидной природе внеклеточной жидкости являются полученные нами результаты по увеличению общего количества биосурфактантов, экстрагируемых из клеточной суспензии после биодеструкции ДАК.

Под воздействием высоких концентраций ДАК у родококков выявлено усиление биосинтеза общих липидов и их накопление в виде внутриклеточных включений. Известно, что внутриклеточные включения часто образуются в условиях дисбаланса питательных веществ и представляют собой идеальные запасы углерода и энергии, они участвуют в биосинтезе миколовых кислот и тем самым способствуют регуляции текучести мембран (Thomson et al., 2010). Результаты предварительного ТСХ-анализа метанолизатов нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 позволили нам предположить увеличение содержания миколовых кислот, находящихся как в свободном состоянии, так и в составе сложных липидов клеточной стенки и *Rhodococcus*-биосурфактантов. По-видимому, усиление биосинтеза липидных соединений, в том числе миколовых кислот, может способствовать повышению гидрофобности и последующему перераспределению адгезивных участков клеточной поверхности (дополнительные материалы, рис. S5).

Таким образом, в присутствии ДАК в высоких (500, 750 или 1000 мг/л) концентрациях выявлены следующие адаптивные реакции родококков: агрегация клеток (рис. 6), увеличение морфометрических показателей (табл. 3), образование внеклеточной жидкости (биосурфактантов или внеклеточного матрикса) (рис. 7), увеличение биосинтеза липидов (биосурфактантов, общих липидов, миколовых кислот, липидных включений) (рис. 8; дополнительные материалы, рис. S4), а также изменение свойств клеточной поверхности (степени среднеквадратичной шероховатости, гидрофобности, появление областей высокой адгезии) (дополнительные материалы, рис. S5).

Несмотря на то, что изменение значений pH от 6.0 до 9.0 не влияло на выживаемость родококков (ОП₆₀₀ 2.5, без ДАК), эффективность биодеструкции ДАК зависела от уровня величины pH буфера. Поэтому мы попытались проанализировать факторы, обеспечивающие высокий уровень каталитической активности *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. Установлено, что степень биодоступности ДАК напрямую зависит от pH буферного раствора: повышение pH буфера с 6.0 до 9.0 приводило к значительному увеличению растворимости ДАК с 31 до 250 мг/л. В то же время наблюдалась тен-

денция к повышению гидрофобности клеточной поверхности родококков (контроль, без ДАК). Однако максимальную устойчивость бактериальных клеток к ДАК (IC₅₀) регистрировали при pH 7.0 и 8.0. Выявленные закономерности согласуются с данными (Zanella, 1983) о том, что ДАК полностью диссоциирует и становится менее токсичной при повышении pH. По нашим данным, при pH 8.0 уровень сродства родококков к гидрофобному субстрату (растворимость ДАК, гидрофобность клеточной поверхности) наиболее оптимально гармонирует с высокой устойчивостью бактериальных клеток к ДАК, что, по-видимому, обеспечивает максимальный уровень биоконверсии токсиканта (рис. 10). Изучение таких параметров, как IC₅₀, растворимость и гидрофобность клеточной поверхности, может быть полезным для выбора условий биодеструкции родококками других органических кислот.

В настоящей работе впервые показана возможность биодеструкции ДАК в высоких концентрациях (500–1000 мг/л) с использованием отмытых от питательных веществ нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 107. За счет повторного применения клеточных суспензий общая нагрузка на одну порцию биокатализатора может быть увеличена до 3000 мг/л. Экспериментально обосновано, что нерастущие клетки *R. rhodochrous* сохраняли каталитическую активность в широком диапазоне концентраций ДАК (от 500 до 1000 мг/л) при повторном использовании (до 3 циклов) после длительного хранения (84 сут, 4°C). Подобраные условия (pH, общая плотность бактериальных клеток) способствовали увеличению степени биодоступности ДАК и, как следствие, ее эффективного разложения и детоксикации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены на оборудовании ЦКП “Исследование материалов и веществ” и “Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов” Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственных заданий 122031400671-1, АААА-А19-119112290008-4, 122012400109-8. Она также была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение 075-15-2021-1051).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

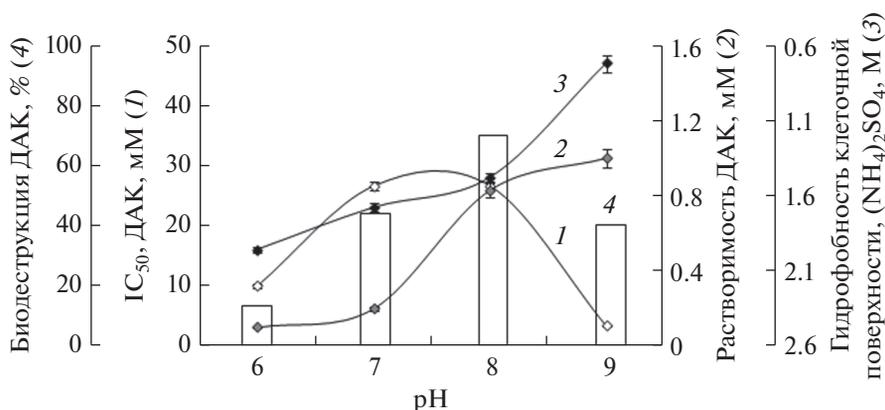


Рис. 10. Зависимость показателей IC₅₀ ДАК (1), растворимости ДАК (2) и гидрофобности клеточной поверхности *R. rhodochrous* ИЭГМ 107 (3) от pH буферной системы. На графике приведены данные о биодеструкции ДАК (500 мг/л) через 24 ч в зависимости от уровня pH (4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Коршунова И.О., Писцова О.Н., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние органических растворителей на жизнеспособность и морфофункциональные свойства родококков // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. С. 53–61.

<https://doi.org/10.7868/S0555109916010074>

Korshunova I.O., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Pistsova O.N. The effect of organic solvents on the viability and morpho-functional properties of *Rhodococcus* // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. P. 43–50.

Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., De Laurenzi V. Die for the community: An overview of programmed cell death in bacteria // Cell Death Dis. 2015. V. 6. P. 4050–4053.

Carvalho F., Marques M.P.C., de Carvalho C.C.C.R., Cabral J.M.S., Fernandes P. Sitosterol bioconversion with resting cells in liquid polymer based systems // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 4050–4053.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.044>

Cheremnykh K.M., Luchnikova N.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Bioconversion of ecotoxic dehydroabietic acid using *Rhodococcus* actinobacteria // J. Hazard. Mater. 2018. V. 346. P. 103–112.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.025>

Dawson R., Elliott D., Elliott W., Jones K. Data for Biochemical Research (3rd edn), Oxford Sci. London, 1986.

Desai S., Sanghrajka K., Gajjar D. High adhesion and increased cell death contribute to strong biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* // Pathogens. 2019. V. 8. Art. 277. P. 1–16.

<https://doi.org/10.3390/pathogens8040277>

Flemming H.-C. EPS – Then and Now // Microorganisms. 2016. V. 4. P. 41.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>

Gefen O., Fridman O., Ronin I., Balaban N.Q. Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 556–561.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1314114111>

Grishko V.V., Tarasova E.V., Ivshina I.B. Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of the ac-

tinobacterium *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 // Process. Biochem. 2013. V. 48. P. 1640–1644.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.012>

Hawthorne J.N. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids (2nd revised edition) // Biochem. Soc. Trans. 1988. V. 16. P. 906.

<https://doi.org/10.1042/bst0160906>

Hernández V., Silva M., Gavilán J., Jiménez B., Barra R., Becerra J. Resin acids in bile samples from fish inhabiting marine waters affected by pulp mill effluents // J. Chil. Chem. Soc. 2008. V. 53. P. 1718–1721.

Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. P. 711–717.

<https://doi.org/10.1023/A:1008885309221>

Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 1–13.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45732-9>

Janocha S., Zapp J., Hutter M., Kleser M., Bohlmann J., Bernhardt R. Resin acid conversion with CYP105A1: An enzyme with potential for the production of pharmaceutically relevant diterpenoids // ChemBioChem. 2013. V. 14. P. 467–473.

<https://doi.org/10.1002/cbic.201200729>

Julsing M.K., Kuhn D., Schmid A., Bühler B. Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition // Biotechnol. Bioeng. 2012. V. 109. P. 1109–1019.

<https://doi.org/10.1002/bit.24404>

Kang J., Wang M., Xiao Z. Modeling and control of pH in pulp and paper wastewater treatment process // J. Water Resource Prot. 2009. V. 1. P. 122–127.

<https://doi.org/10.4236/jwarp.2009.12016>

Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Korshunova I.O., Stukova G.I., Krivoruchko A.V. Diverse effects of a biosurfactant from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 on the adhesion of resting and growing bacteria to polystyrene // AMB Express. 2016. V. 6. P. 14.

<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0186-z>

Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // J. Microbiol. Methods. 2001. V. 46. P. 149–156.

- Kylosova T.I., Elkin A.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Bio-transformation of prochiral sulfides into (R)-sulfoxides using immobilized *Gordonia terrae* IEGM 136 cells // J. Mol. Catal. B Enzym. 2016. V. 123. P. 8–13.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.10.014>
- Lindahl M., Faris A., Wadström T., Hjertén S. A new test based on “salting out” to measure relative hydrophobicity of bacterial cells // BBA. 1981. V. 677. P. 471–476.
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90261-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90261-0)
- Luchnikova N.A., Ivanova K.M., Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Microbial conversion of toxic resin acids // Molecules. 2019. V. 24. P. 4121.
<https://doi.org/10.3390/molecules24224121>
- Martin V.J.J., Yu Z., Mohn W.W. Recent advances in understanding resin acid biodegradation: Microbial diversity and metabolism // Arch. Microbiol. 1999. V. 172. P. 131–138.
<https://doi.org/10.1007/s002030050752>
- Meylan W.M., Howard P.H. Atom/fragment contribution method for estimating octanol–water partition coefficients // J. Pharm. Sci. 1995. V. 84. P. 83–92.
- Meylan W.M., Howard P.H., Boethling R.S. Improved method for estimating water solubility from octanol/water partition coefficient // Environ. Toxicol. Chem. 1996. V. 15. P. 100–106.
[https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1996\)015](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1996)015)
- Minnikin D.E., Alshamaony L., Goodfellow M. Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates // J. Gen. Microbiol. 1975. V. 88. P. 200–204.
- Mrunalini B.R., Girisha S.T. Screening and characterization of lipid inclusions in bacteria by fluorescence microscopy and mass spectrometry as a source for biofuel production // Indian J. Sci. Technol. 2017. V. 10. P. 1–10.
- Mutafova B., Fernandes P., Mutafov S., Berkov S., Pavlov A. Microbial transformations of plant secondary metabolites // Bioprocess Plant. Vit. Syst. 2016. P. 1–41.
- Nawawi N.M., Ahmad S.A., Maniyam M.N., Ibrahim A.L. Biotransformation of phenol by the resting cells of *Rhodococcus* sp. NAM 81 // Indian J. Fundam. Appl. Life Sci. 2016. V. 6. P. 101–107.
- Pan T., Wang R., Xiao K., Ye W., Dong W., Xu M. Continuous degradation of phenanthrene in cloud point system by reuse of *Sphingomonas polyaromaticivorans* cells // AMB Express. 2019. V. 9. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1186/S13568-019-0736-2>
- Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains // Biotechnol. Adv. 2021. Article 107698.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107698>
- Peng G., Roberts J.C. Solubility and toxicity of resin acids // Wat. Res. 2000. V. 34. P. 2779–2785.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00406-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00406-6)
- Pérez-de-Mora A., Madejón E., Cabrera F., Buegger F., Fuß R., Pritsch K., Schloter M. Long-term impact of acid resin waste deposits on soil quality of forest areas I. Contaminants and abiotic properties // Sci. Total. Environ. 2008. V. 406. P. 88–98.
- Singh N., Soukup O., Fisar Z., Kuca K. Method optimization for determination of drug solubility limit // Mil. Med. Sci. Lett. 2017. V. 86. P. 11–16.
- Smith D.J., Patrauchan M.A., Florizone C., Eltis L.D., Mohn W.W. Distinct roles for two CYP226 family cytochromes P450 in abietane diterpenoid catabolism by *Burkholderia xenovorans* LB400 // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 1575–1583.
- Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation // Process Biochem. 2017. V. 52. P. 1–9.
- The United Nations Environment Programme, Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPS). SAGE Publications, Inc., 2455 Teller Road. Thousand Oaks California 91320 United States. 2019. P. 77.
- The United Nations, Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). Fourth revised edition. 2011.
- Thomson N., Summers D., Sivaniah E. Synthesis, properties and uses of bacterial storage lipid granules as naturally occurring nanoparticles // Soft Matter. 2010. V. 6. P. 4045–4057.
- Volkman J.K., Holdsworth D.G., Richardson D.E. Determination of resin acids by gas chromatography and high-performance liquid chromatography in paper mill effluent, river waters and sediments from the upper Derwent Estuary, Tasmania // J. Chromatogr. A. 1993. V. 643. P. 209–219.
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80555-M](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80555-M)
- Watanabe K., Miyashita M., Harayama S. Starvation improves survival of bacteria introduced into activated sludge // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3905–3910.
- Zanella E. Effect of pH on acute toxicity of dehydroabietic acid and chlorinated dehydroabietic acid to fish and *Daphnia* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1983. V. 30. P. 133–140.

Highly Efficient Biodegradation of Ecotoxic Dehydroabietic Acid by Resting Cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 107

K. M. Ivanova¹*, V. V. Grishko¹, and I. B. Ivshina¹

¹Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614990 Russia

*e-mail: kseniya.cheremnikh@gmail.com

Received March 3, 2022; revised March 11, 2022; accepted March 14, 2022

Abstract—The possibility of complete biodegradation of toxic dehydroabietic acid (DHA) at a high concentration (over 500 mg/L) using resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 107 (OD₆₀₀ 2.5) in phosphate-alkaline buffer (pH 8.0) was experimentally substantiated. A stable biocatalyst was obtained that retained its functional activity when reused (up to 3 cycles) and over a long storage period (up to 84 days, 4°C). It was shown that the high resistance of rhodococci to DHA is associated with increased solubility of the ecotoxicant in the pH 8.0 buffer, which contributes to the enhanced synthesis of lipids (including biosurfactants), improved affinity of cells to a hydrophobic substrate due to increased hydrophobicity of the cell surface and, consequently, to detoxification and biodegradation of the pollutant.

Keywords: adaptation, biodegradation, dehydroabietic acid, lipids, *Rhodococcus rhodochrous*, resting cells

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИСИНТЕЗ БИОГЕННЫХ АМИНОВ МОЛОЧНОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ
НА СРЕДАХ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ© 2022 г. Е. Ф. Шаненко^а, Ю. А. Николаев^б *, В. И. Ганина^а, И. Н. Серых^а,
А. В. Олескин^с, Т. Г. Мухамеджанова^а, Н. В. Григорьева^б, Г. И. Эль-Регистан^б^аФГБОУ ВО “Московский государственный университет пищевых производств”, Москва, 125080 Россия^бИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия^сМГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра общей экологии и гидробиологии,
Москва, 119234 Россия

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 17.03.2022 г.

Принята к публикации 22.03.2022 г.

Роль микробиоты кишечника в метаболизме и жизнедеятельности организма-хозяина хорошо известна. Одним из механизмов их взаимодействия базируется на биогенных аминах (БА). По этой причине синтез БА молочнокислыми бактериями (МКБ) интенсивно исследуется и рассматривается как важное свойство МКБ-пробиотиков. В настоящей работе исследован синтез БА молочнокислыми бактериями трех видов (13 штаммов), выделенных из разных местообитаний и с разными экофизиологическими функциями, выращенными на четырех разных средах. Показано, что среды существенно различаются по исходному содержанию БА. МКБ могут как потреблять БА из сред, так и синтезировать их в ходе роста, что необходимо учитывать при конструировании пробиотиков. На основании полученных данных скорректированы пути биосинтеза БА молочнокислыми бактериями и обсуждается вопрос о роли микробной продукции нейроактивных соединений в функционировании микробного сообщества организма человека, его нервной и иммунной систем, а также перспективы создания “биофабрик нейромедиаторов” на основе тестированных симбиотических и пробиотических микроорганизмов.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, биогенные амины, пробиотики, синтез на разных средах, пути метаболизма

DOI: 10.31857/S0026365622300206

Внимание к биологическим препаратам, действующим началом которых являются живые культуры молочнокислых бактерий (МКБ) симбиотической микробиоты человека, изначально было обусловлено возрастающей частотой возникающих различных патологий человека, связанных

с дисбактериозом. Особенно актуальным использование этих препаратов стало в эпоху массового применения противомикробных лекарственных средств, которые подавляют не только патогенные микроорганизмы, но и собственную симбиотическую микробиоту. Видовой состав микроорганизмов, используемых в пробиотических препаратах, достаточно широк и не исчерпывается представителями МКБ. В препаратах могут присутствовать бифидобактерии, дрожжи, мицелиальные грибы.

Хотя традиционно препараты МКБ использовались для коррекции кишечной микробиоты, оказалось, что, помимо этого воздействия, МКБ способны корректировать деятельность многих органов и физиологических систем человека, повышать иммунологическую реактивность и общую неспецифическую резистентность в условиях стрессовых нагрузок.

В последние десятилетия появилось множество данных, свидетельствующих о том, что роль сим-

Список сокращений: 3-МТ – 3-метилтриптофан; 5-Н1АА – 5-гидроксииндолилуксусная кислота; 5-НТ – серотонин; 5-НТР – 5-гидроксиметилтриптофан; БА – биогенные амины; ВНС – вегетативная нервная система; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГАМК – γ -аминомасляная кислота; ГМ – гидролизат молока; ГЭБ – гемато-энцефалический барьер; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза; КС – капустный сок; МАО – моноаминоксидаза; МКБ, молочнокислые бактерии – МПБ, мясо-пептонный бульон; С – солод; ЦНС – центральная нервная система; ЭНС – энтеральная нервная система; А – адреналин; DA – дофамин; DOPA, 2,3-дигидроксифенилаланин; DOPAC – дигидроксифенилуксусная кислота; GALT – gut-associated lymphoid tissue (кишечная иммунная система); HVA – гомованилиновая кислота; NA – норадреналин; QS – quorum sensing-система чувства кворума.

биотической микробиоты, особенно желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), не сводится к ее коррекции и защите организма хозяина от патогенных микроорганизмов. Установлено, что микробиота ЖКТ находится в тесной взаимосвязи с организмом хозяина, что реализуется посредством передачи сигналов в нервную, эндокринную, иммунную и гуморальную системы. Организм хозяина, в свою очередь, может влиять на микробиоту ЖКТ через изменение моторики, кишечной проницаемости, выработки слизи и активации иммунной системы (Foster et al., 2016).

Взаимодействие между кишечной микробиотой и иммунной системой хозяина начинаются с его рождения, и они взаимно влияют на развитие друг друга (Nicholson et al., 2012) на протяжении всей жизни хозяина. В результате формируется сложный суперорганизм, в котором микробиота кишечника становится органом, обладающим множественными регуляторными функциями. Для обозначения этого органа используется термин “микробиом”. Взаимодействие микробиома и хозяина осуществляется посредством множественных прямых химических взаимодействий, передающих сигналы в центральную нервную систему (ЦНС), вегетативную нервную систему (ВНС) и нервную систему кишечника – энтеральную нервную систему (ЭНС) хозяина. Кишечный микробиом рассматривается в настоящее время как составляющая так называемой системы “кишечник–мозг”, которая трансформировалась, с учетом современных знаний, в ось “микробиом–кишечник–мозг”, двунаправленную коммуникационную систему, обеспечивающую функционирование супрасимбиотического организма. У здоровых людей эта система осуществляет мониторинг и интеграцию различных функций кишечника и связывает эмоциональные и когнитивные центры головного мозга с периферическими кишечными функциями, такими как иммунная активация, кишечная проницаемость и энтероэндокринная передача сигналов (Siragusa et al., 2007). Поскольку ось “микробиом–кишечник–мозг” является двунаправленной, нейроэндокринный ответ организма хозяина на стресс вызывает изменения в количестве и составе микробиоты кишечника. Существенные различия наблюдаются в составе микробиоты здоровых людей и при ожирении; тревожных расстройствах, заболеваниях рассеянным склерозом, болезнью Паркинсона и болезнью Альцгеймера, аутизмом. Исследователями выявлена высокая степень корреляции между составом и соотношением микроорганизмов кишечника и функциональными способностями мозга (Barbara et al., 2005; Heijtz et al., 2011; Naseribafrouei et al., 2014; Carabottia et al., 2015; Foster et al., 2016).

На животных показано, что перенесение кишечного микробиома от одной особи к другой приводит к приобретению реципиентом поведен-

ческих особенностей, характерных для донора. Внесение определенного микробиома на ранних этапах жизни приводит к воссозданию стереотипных для этих животных моделей поведения. Внесение микробиома взрослым особям в меньшей степени влияет на поведенческие реакции, но снижает уровень тревожности и повышает когнитивные функции (Foster et al., 2016). Изучение формирования функций мозга у грудных детей также показало участие в этом процессе микробиома (Siragusa et al., 2007; Ravel et al., 2011; Nicholson et al., 2012). Другим важным направлением в исследовании влияния микробиоты на мозг является изучение роли микробиома в формировании поведенческих и когнитивных особенностей (Siragusa et al., 2007).

Взаимодействие кишечной микробиоты и нервной системы организма хозяина осуществляется посредством синтезируемых ими нейроиммунно-эндокринных нейромедиаторов. К ним относятся: нейроактивные аминокислоты (γ -аминомасляная и другие органические кислоты, янтарная и другие), ацетилхолин, биогенные амины (серотонин, норадреналин, адреналин и другие) (Tsigos, Chrousos, 2002).

Исследования взаимодействий в оси “микробиом–кишечник–мозг” показали, что в их основе лежат механизмы синтеза и рецепции нейротрансмиттеров бактериями кишечника (Tsigos, Chrousos, 2002). Сам факт наличия у клеток про- и эукариот рецепторов, позволяющих им распознавать нейроэндокринные гормоны, известен уже несколько десятилетий. Бактерии могут продуцировать самые разные гормоны: от соматостатина до ацетилхолина и прогестерона, причем количество этих соединений, связываемых рецепторами клеток кишечника, достаточно, чтобы вызвать нейрофизиологический сдвиг в организме хозяина (Tsigos, Chrousos, 2002; Bravo et al., 2011; Heijtz et al., 2011).

Секретируемые бактериями нейротрансмиттеры (нейромедиаторы) могут непосредственно воздействовать на нервные окончания в ЖКТ, а также стимулировать эпителиальные клетки кишечника, которые в ответ освобождают молекулы, модулирующие нейротрансдукцию в ЭНС, оказывая влияние на мозг и поведение человека. Эта функция микробиома обеспечивает профилактику неврологических и нейрофизиологических расстройств человека.

Исследования на животных показали, что микробиота влияет на их стрессовую реактивность и состояние тревоги. Микробиота влияет на активность ЭНС, продуцируя молекулы, действующие как локальные нейромедиаторы, такие как ГАМК, серотонин, мелатонин, гистамин и ацетилхолин, а также генерируя активную форму катехоламинов в просвете кишечника. Синтези-

руемые микробиотой короткоцепочные органические кислоты (масляная, пропионовая, уксусная) способны стимулировать высвобождение серотонина в слизистую оболочку, оказывая влияние на память и когнитивные способности (Ravel et al., 2011; Gordon, 2012; Carabottia et al., 2015).

Изучение способности пробиотических микроорганизмов синтезировать нейротрансмиттеры привело к формированию группы штаммов, объединяемых названием “психобиотики” (Dhakal et al., 2012; Zhao et al., 2015; Lim et al., 2016).

Поиск активных продуцентов нейротрансмиттеров среди пробиотических бактерий стал одним из активно развиваемых направлений в области направленного позитивного воздействия на организм человека через ось “микробиом–кишечник–мозг”. Так, методом ВЭЖХ было определено содержание катехоламинов в культурах многих про- и эукариотических микроорганизмов (Цавкелова и соавт., 2000). Например, норадреналин в концентрациях 0.2–2 мкМ присутствовал в биомассе *Bacillus mycoides*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*; дофамин в количестве 0.5–2 мкМ – в биомассе большинства тестированных прокариот (Олескин и соавт., 2020). Серотонин в низкой концентрации был обнаружен в клетках *Rhodospirillum rubrum* (Олескин и соавт., 1998), а в клетках *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus* (Цавкелова и соавт., 2000) в концентрациях порядка 1 мкМ. DA и 5-НТ в микромолярных концентрациях детектирован также у *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* и *Hafnia alvei* (Özogul, 2004). На модели *E. coli* K-12 (Шишов и соавт., 2009) показано, что максимальные (микромолярные) концентрации катехоламинов и 5-НТ накапливаются в лаг-фазе роста культуры, на основании чего можно предположить, что нейромедиаторные амины являются своеобразными “триггерами”, активирующими рост и деление клеток в начальной фазе онтогенеза микробной культуры.

Как показали исследования, способностью к синтезу нейромедиаторов обладают заквасочные молочнокислые бактерии, используемые в производстве сыров, йогуртов и других кисломолочных продуктов. Нейромедиаторы в количествах, сопоставимых с их концентрацией в кровотоке человека, обнаружены во многих ферментированных продуктах (Lim et al., 2016; Siragusa et al., 2017).

Основные обнаруживаемые в культуральной жидкости заквасочных культур нейроактивные соединения – это дофамин (DA), норадреналин (NA), адреналин (A), их предшественники L-тирозин и дигидрофенилаланин (DOPA) и продукты окислительного дезаминирования этих нейромедиаторов – 3-метокситирамин (3-МТ), дигидрокси-фенилуксусная (DOPAC) и гомованилиновая (HVA) кислоты, а также серотонин (5-НТ) и его предше-

ственники и продукты распада – L-триптофан, 5-гидроксиметилтриптофан (5-НТР) и 5-гидроксииндолилуксусная кислота (5-НIAA) и нейроактивные аминокислоты (глицин, γ -аминомасляная и глутаминовая кислоты).

Важно отметить, что на способность микробиоты синтезировать нейротрансмиттеры влияет тип питания хозяина. Так, мыши, которые получали говяжий фарш, имели более разнообразный состав микробиоты, повышенную физиологическую активность, память и пониженную тревожность по сравнению с получающими зерно (Foster et al., 2016).

Открываются новые возможности в диетотерапии при различных неврологических расстройствах, в геронтологии, в диетологии профессиональных групп людей, деятельность которых сопряжена со стрессовым воздействием. Другое направление исследования – это способность синтезировать нейротрансмиттеры с учетом ее видовой и штаммовой специфичности. В частности, подбор определенных пробиотических штаммов позволит разработать новую стратегию коррекции при метаболических нарушениях различного характера в организме хозяина (Heijtz et al., 2011; Foster et al., 2013; Naseribafrouei et al., 2014).

Бактерии-продуценты нейротрансмиттеров могут найти широкое применение в создании нового поколения функциональных продуктов с выраженной нейрохимической направленностью (Bercik et al., 2011; Жиленкова и соавт., 2013).

Однако, разрабатывая продукты питания, обогащенные живыми психобиотиками или нейроактивными соединениями, нельзя не учитывать состав питательных сред, так как известно, что количество, вид и соотношение элементов питания в среде определяет характер метаболизма продуцента (Bravo et al., 2011; Carabottia et al., 2015).

Расширение поиска активных продуцентов нейротрансмиттеров позволит создать банк продуцентов этих соединений для создания пробиотических продуктов различного назначения, а изучение влияния состава питательной среды на синтез нейротрансмиттеров позволит помимо этого разработать диетологические рекомендации для стимулирования синтеза нейротрансмиттеров собственной микробиотой (Жиленкова и соавт., 2013).

Целью работы было провести сравнительное исследование способности коллекционных штаммов молочнокислых бактерий продуцировать внеклеточные нейромедиаторы (биогенные амины) при росте культур на средах животного и растительного происхождения.

Таблица 1. Отобранные для исследований молочнокислые бактерии

Штамм	Номер во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, ВКПМ	Источники выделения
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LL-52	ВКПМ В-8557	Цветы, растения
<i>Lactococcus: Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LLN -E2	ВКПМ В-8558	Молоко, сквашенные продукты
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 125	*	Молоко, сквашенные продукты
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> В-102	*	ЖКТ млекопитающих
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LCN-98	ВКПМ В-8559	Цветы, растения
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 36с	*	Цветы, растения
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 18АК	*	Цветы, растения
<i>Lactobacillus acidophilus</i> АСТ-41	ВКПМ В-9644	ЖКТ и вагина млекопитающих и человека
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> БГ-Г	ВКПМ В-8554	Кислое дробленое зерно (sour grain mash)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> VG-9	*	Йогурт, сметана, ЖКТ болгар
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> СТ-14	ВКПМ В-7765	Ротовая полость человека
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> СТ-160	ВКПМ В-7988	Ротовая полость человека
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> TP-20	ВКПМ В-7983	Ротовая полость человека

* Штамм из коллекции культур МГУПП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Штаммы бактерий и условия культивирования.

В работе были использованы 13 штаммов молочнокислых бактерий (МКБ) 4 родов (табл. 1). Бактерии были выделены из молока, сквашенных продуктов, кислого дробленого зерна, желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и вагины человека, ротовой полости человека, а также с поверхности цветов и листьев растений (табл. 1). Бактерии выращивали в микроаэрофильных условиях (статически, в пробирках объемом 50 мл в 20 мл среды) при 28°C в течение 24 ч в следующих средах: гидролизат молока (ГМ); мясо-пептонный бульон (МПБ); солодовое ячменное сусло 7°Б (С); капустный сок (КС). Среды готовили по традиционным прописям (Теппер, Переверзева, 2004). Для приготовления сусло-агара к пивному суслу (8°Б) добавляли агар-агар (2.5%, по весу), кипятили до расплавления, фильтровали через вату и стерилизовали при 0.5 атм. В качестве молочной среды использовали обезжиренное молоко, стерилизованное при 0.5 атм. Гидролизованное молоко готовили с использованием сухого панкреатина (“Фармстандарт”, Россия) (1 г/л) и хлороформа. Капустный сок получали с применением соковыжималки, используя листья из середины кочана; после фильтрации через слой ваты pH доводили до значения 7 ± 0.1 и стерилизовали при 0.5 атм.

Определение биогенных аминов. Биогенные амины определяли в средах и культуральной жидкости

культур МКБ стационарной фазы роста, которую получали центрифугированием выросших культур (5000 g, 20 мин). Содержание биогенных аминов определяли методом ВЭЖХ на хроматографической установке LC-304E (“ВАС”, West Lafayette, США) при разделении биогенных аминов в обращенной фазе на колонке ReproS11 – Pur (Dr. Majsch GmbH, “Элсико”, Москва) с последующей амперометрической детекцией на стекляннно-угольном электроде как описано ранее (Шендеров, 2014а).

Статистическая обработка. Все эксперименты проведены в трех биологических повторностях для каждого варианта. При определении концентраций гормонов проводили 4–6 независимых измерений. С применением программы Excell-2004 рассчитывали среднее арифметическое и среднее абсолютных значений отклонений точек данных от среднего. Последнее значение соответствует экспериментальному разбросу и не превышает 5%. Результаты представлены в виде средних арифметических значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании определяли нейроактивные амины: DA, HA и 5-HT, а также их предшественники, образующиеся в путях метаболизма L-тирозина и L-триптофана, и продукты их окислительного дезаминирования (рис. 1). Анализ их количественных превращений (в наномолях или микромолях на 1 л) дает представление о путях синтеза биоген-

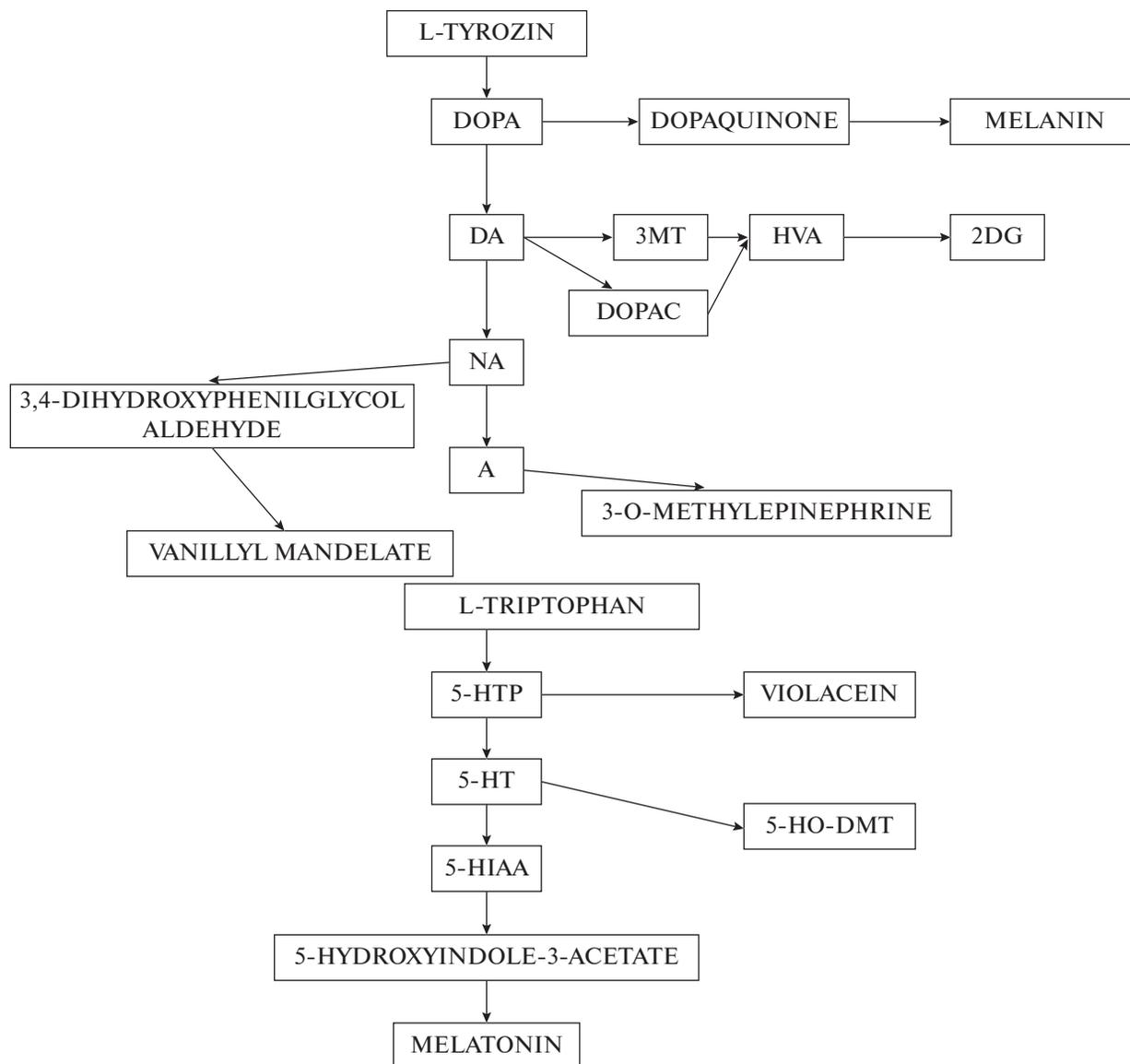


Рис. 1. Метаболические пути образования биогенных аминов молочнокислыми бактериями. Обозначения: дофамин (DA), норадrenalин (NA), адреналин (A), дигидрофенилаланин (DOPA), 3-метокситирамин (3-МТ), дигидроксифенилуксусная кислота (DOPAC), гомованилиновая кислота (HVA), серотонин (5-НТ), 5-гидроксииндолтриптофан (5-НТP), 5-гидроксииндолилуксусная кислота (5-НIAA) (по Hoffmann, 2014).

ных аминов у МКБ определенного таксономического положения (на уровне рода, вида, подвида). Дополнительную важную информацию авторы прогнозировали получить при росте МКБ на средах различного состава, отражающих (моделирующих) типы питания человека (растительная или животная пища). В качестве питательных сред были использованы гидролизат молока, мясо-пептонный бульон, ячменное солодовое сусло и сок капусты.

Концентрации биогенных аминов представлены в табл. 2–5 и обобщены на рис. 2а–2г. Изложим основные результаты по каждой из групп нейротивных продуктов.

Катехоламины являются производными аминокислоты тирозина, гидроксилирование которой дает диоксифенилаланин (DOPA) – непосредственный предшественник катехоламинов. Синтез катехоламинов (рис. 2) идет с помощью ферментов тирозингидроксилазы (1), DOPA-декарбоксилазы (2), дофамингидроксилазы (3), фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы (4).

DOPA, представляющая первое звено в катехоламинном пути, способна в организме человека проникать из кишечника в кровоток и далее из кровяного русла в головной мозг, проходя гемато-энцефалический барьер (ГЭБ). С этим связан интерес к DOPA, которая, как показано в

Таблица 2. Содержание биогенных аминов в среде роста МКБ: при выращивании на гидролизате молока

Штамм	NA	DOPA	A	DOPAC	DA	5-НПА	5-НТР	HVA	3MT	5-НТ
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LLN-E2	243.01	5.6	14.42	32.44	22.98	1.55	15.06	79.29	10.08	15.04
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 125	245.4	2.04	14.7	40.52	18.42	48.75	11.74	3.95	10.8	13.06
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> B-102	156.35	6.47	8.21	41.67	3.15	23.95	6.89	22.01	6.71	4.71
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 36с	251	6.99	13.75	39.85	21.42	0.55	21.72	8.77	11.57	12.68
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 18AK	131.61	10.31	12.75	46.49	5.789	20.47	3.49	24.11	4.94	5.4
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LL-52	165.71	20.08	12.48	32.86	6.31	0	0.06	1.52	10.21	12.69
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LCN-98	243.01	7.03	19.1	13.79	4.4	0.57	7.72	0.11	8.72	7.6
<i>S. salivarius thermophilus</i> CT 14	141.9	31.34	8.76	9.44	6.48	19.19	3.8	19.39	9.18	7.06
<i>S. salivarius thermophilus</i> CT-9	193.35	4.5	13.11	24.64	6.02	0.85	6.44	63.95	7.06	17.16
<i>S. salivarius thermophilus</i> CT 160	210.22	9.33	35.14	36.08	4.78	0.51	2.4	5.69	12.33	20.29
<i>S. salivarius thermophilus</i> TP-20	197.83	117.92	20.23	40.62	20.57	0.25	9.52	49.92	22.08	1.95
<i>L. acidophilus</i> АСТ-41	198.77	15.53	11.94	40.62	24.62	1.4	7.48	0.37	30.91	8.09
<i>L. acidophilus</i> АЕ-5	171.04	0	26.34	28.42	3.77	29.93	2.94	3.88	6.3	18.82
<i>L. acidophilus</i> АД-3	229.19	9.53	20.72	56.44	23.64	34.46	2.05	23.5	12.26	13.7
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> БГ-Г	188.56	8.23	19.03	12.37	21.82	0.18	4.89	44.66	9.59	10.61
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> VG-9	217.23	19.64	16.32	53.95	5.02	36.97	5.15	6.04	17.4	23.11
Среда ГМ (контроль)	10.3	10.0	0.00	5.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Штаммовый разброс продуктивности	130–240	0–10	12–25	5–50	3–24	1–48	3–20	20–50	10–30	10–20
Усредненный уровень накопления нейромедиаторов	170–220	5–20	12–25	10–35	5–20	1–30	4–15			

Таблица 3. Содержание биогенных аминов в среде роста МКБ: при выращивании на среде МПБ

Штамм	NA	DOPA	A	DOPAC	DA	5-НПА	5-НТР	HVA	3MT	5-НТ
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LLN-E2	40.5	2.32	145.12	26.07	17.37	0.33	39.56	39.07	78	30.31
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 125	19	0.03	73.8	29.4	3.8	0.54	25.83	24.3	101.15	38.16
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 18AK	39/09	29.59	65.98	25.47	19.51	0.79	3.25	41.25	94.85	28.22
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LL-52	121.46	38.74	41.72	14.72	17.3	6.35	3.46	7.18	94.84	36.82
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LCN-98	17.59	1.25	52.39	17.28	16.67	11.4	18.29	289.32	89.92	34.73
<i>S. salivarius thermophilus</i> СТ 14	40.34	32.18	31.24	11.98	6.92	3.52	3.77	2.87	141.62	28.31
<i>S. salivarius thermophilus</i> СТ 9	11.09	2.82	62.71	1.12	3.44	0.99	1.28	2.13	97.45	35.29
<i>S. salivarius thermophilus</i> TP-20	34.52	22.42	75.7	10.01	3.91	1.15	2.89	1.57	119.04	31.4
<i>L. acidophilus</i> АСТ-41	37.54	44.63	45.32	2.22	191.95	0.57	15.35	0.52	121.42	20.78
<i>L. acidophilus</i> АЕ-5	37.75	19.28	66.01	26.01	6.47	2.11	3.93	11.01	98.1	26.22
<i>L. acidophilus</i> АД-3	32.29	22.14	48.76	10.25	105.81	0.51	13.71	6.9	107.76	35.85
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> БГ-G	24.92	0.14	22.72	10.11	11.48	0.03	4.74	40.27	>50.17	10.76
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> VG-9	15.58	27.12	54.05	5.1	88.29	0	0	0.1	>58.48	17.86
Среда МПБ (контроль)	97.2	0.00	0.00	36.8	9.95	53.25	0.00	0.00	0.00	0.00
Штаммовый разброс уровня накопления нейромедиаторов	0	0.5–44	22–150	0	7–180	0	3–40	10–280	50–120	10–38
Усредненный уровень накопления нейромедиаторов	0	20–40	50–140	0	20–100	?	3–20	2–180	50–100	20–35

Таблица 4. Содержание биогенных аминов в среде роста МКБ: при выращивании на среде с сушлом

Штамм	NA	DOPA	A	DOPAC	DA	5-НПА	5-НТР	HVA	3MT	5-НТ
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL.N-E2	298,4	0	618,9	101,54	3988,22	719,21		47362,85	0	1275,05
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 125	0	0	854,69	113,27	3692,67	971,52		50717,91	0	1075,57
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> B-102	175,28	0	625,57	219,28	4445,88	755		53160,37	0	1413,42
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 36с	0	0	266,75	12,38	2552,2	957,79		40421,07	0	770,85
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 18AK	0	0	451,8	115,66	2670,82	1011,83		45413	0	1019,41
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LL-52	249,04	0	0	327,77	4202,44	474,62		228,14	76,2	1473,72
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LCN-98	0	0	410,38	134,07	389,32	585,97		196,9	118,05	1459,22
<i>S. salivarius thermophilus</i> СТ 14	397,83	0	432,57	62,44	3511,49	680,43		48781,55	0	1269,9
<i>S. salivarius thermophilus</i> СТ 160	55,23	0	543,45	88,2	3736,15	581,9		162,86	32,83	1504,0
<i>S. salivarius thermophilus</i> TP-20	508,03	0	296,74	15,12	3834,12	637,66		350	9,27	1239,66
<i>L. acidophilus</i> АСТ-41	0	0	0	52,33	1908,16	1684,67		601,78	0	1279,44
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> БГ-G	180,25	0	180,25	403,39	4483,62	459,8		200,75	82,93	1581,81
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> VG-9	0	0	715,7	198,24	4856,47	805,61		60170,05	0	1594,6
Среда С (контроль)	0,00	0,00	0,00	0,00	3570,15	329,24	0,00	236,48	88,0	915,29
Штаммовый разброс уровня накопления нейромедиаторов	55–500		180–800	15–400	200–1000	150–1300		100–59000	0–118	100–600
Усредненный уровень накопления нейромедиаторов	180–400		300–700	50–200	200–800	300–1000		300–45000	0–70	300–600

Таблица 5. Содержание биогенных аминов в среде роста МКБ: при выращивании на капустном соке

Штамм	NA	DOPA	A	DOPAC	DA	5-НША	5-НТР	HVA	3MT	5-НТ
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LLN-E2	253.81	0	1911.08	1077.86	1350.36	497.75		11742.12	0	1092.04
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 125	227.21	0	789.36	0	1123.91	442		15628.45	0	364.07
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> B-102	0	0	2885.3	2213.19	1977.54	722.81		15743.62	0	466.17
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 36с	407.79	0	573.02	741.62	984.89	1011.83		1251.09	0	242.72
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 18AK	160.69	0	2034.18	1214.42	1040.39	473.55		14980.68	0	237.32
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LL-52	294.45	0	1955.7	1327.61	1564.99	470.98		11407.5	0	692.09
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LCN-98	110.21	0	21.95	1220.98	1135.25	427.28		12590.7	0	170.65
<i>S. salivarius thermophilus</i> СТ 14	152.97	0	2633.91	1227.11	1581.64	557.28		13653.15	0	286.13
<i>S. salivarius thermophilus</i> СТ 160	235.49	0	1382.36	571.62	1184.61	382.18		9378.46	0	200.48
<i>S. salivarius thermophilus</i> TP-20	268.2	0	1036.87	106.99	718.48	246.22		6783.23	0	222.44
<i>L. acidophilus</i> АСТ-41	0	0	0	597.89	28.35	708.21		12551.36	0	10.75
<i>L. acidophilus</i> АЕ-5	0	0	235.81	511.78	1436.78	122.09		240.79	0	0
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> БГ-G	245.15	0	245.15	363.65	1226.49	380.75		13286.65	41.13	183.17
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> VG-9	202.91	0	1195.36	970.69	1072.27	323.41		8342.61	0	180.73
Среда КС (контроль)	164.24	0.00	2403.01	692.20	2039.09	315.29		16400.63	18.07	353.9
Штаммовый разброс уровня накопления нейромедиаторов	40–240		20–200	150–1500	0	60–800		0	0	100–800
Усредненный уровень накопления нейромедиаторов	40–80		0–10	300–600	0	100–300				

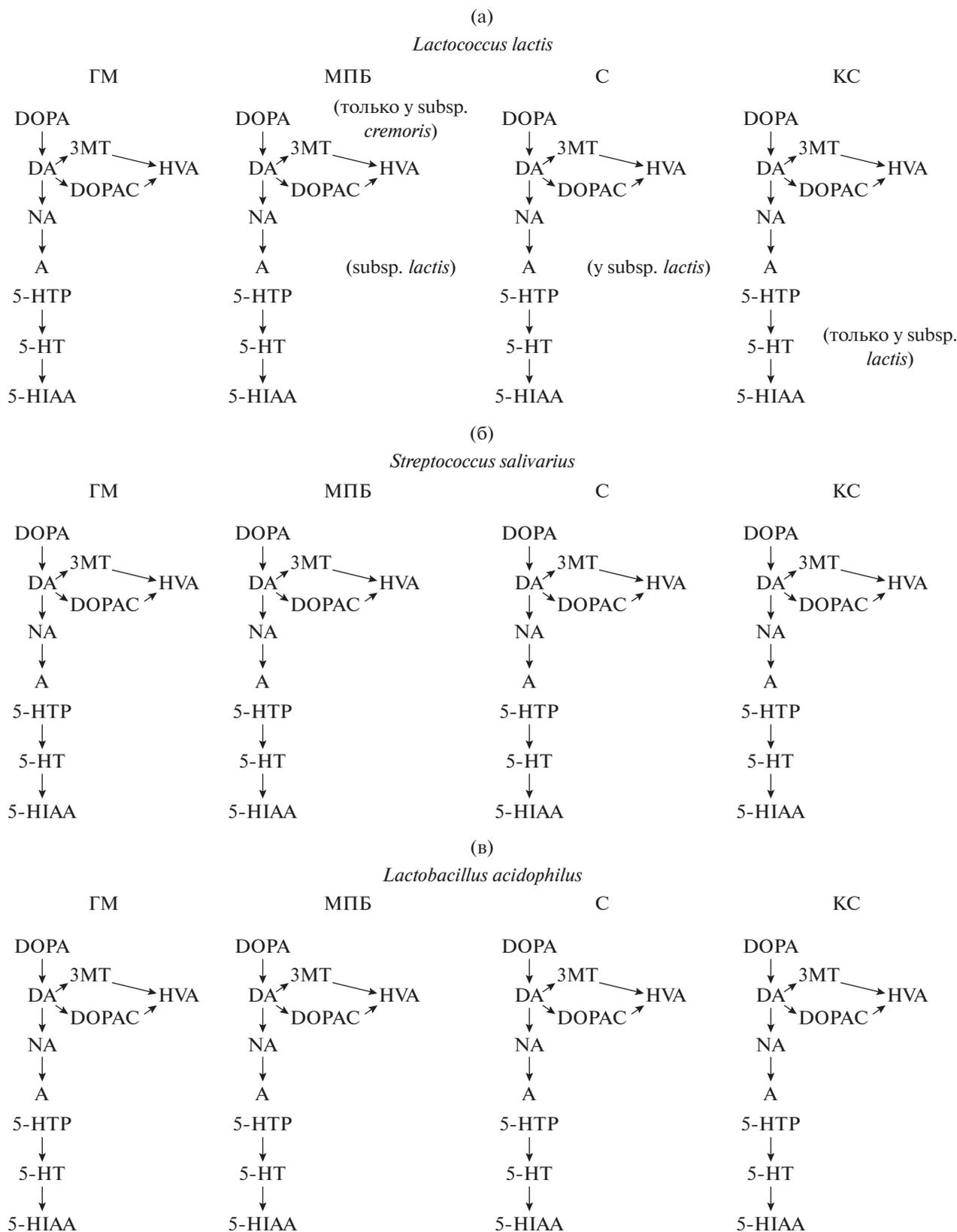


Рис. 2. Уточненные по итогам настоящей работы метаболические пути образования биогенных аминов молочнокислыми бактериями: (а) *Lactococcus lactis*; (б) *Streptococcus salivarius*; (в) *Lactobacillus acidophilus*; (г) *Lactobacillus delbueckii*. Обозначения: дофамин (DA), нордреналин (NA), адреналин (A), ди-гидрофенилаланин (DOPA), 3-метокситирамин (3-МТ), ди-гидроксифенилуксусная кислота (DOPAC), гомованилиновая кислота (HVA), серотонин (5-НТ), 5-гидрокси-симетилтриптофан (5-НТП), 5-гидроксииндолилуксусная кислота (5-НИАА).

предшествующих работах, синтезируется и выделяется в среду культивирования в микромолярных концентрациях *Escherichia coli* K-12 (Шишов и соавт., 2009), *Bacillus cereus* (Шишов, 2010) и, что представляется особенно важным в контексте настоящей работы, молочнокислыми бактериями тестированных штаммов видов *Lactobacillus helveticus* (причем, наиболее продуктивный штамм НК-1 выделяет до 3.7 мкМ DOPA на среде с гидролизатом молока), *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Oleskin et al., 2014; Олескин и соавт., 2014), а также *L. lactis* subsp. *lactis* (штаммами K-205, F-119 и F-116) (Vodolazov et al., 2018) – в субмикромольных количествах (0.15–0.21 мкМ).

В настоящей работе методом ВЭЖХ с амперометрической детекцией DOPA в концентрации около 10 нМ обнаружена в среде на основе гидролизата молока (ГМ). На этом средовом фоне явно проявились штаммовые различия: в культурах штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL-52, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* СТ14, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* VG-9 наблюдалось некоторое накопление DOPA, хотя не в такой мере, как в тестированных ранее штаммах *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Oleskin et al., 2014; Олескин и соавт., 2014). Наибольшая концентрация DOPA (31.3 нМ) достигнута в культуре *S. salivarius* subsp. *thermophilus* СТ14. В то же время в культурах штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* 125 и *L. acidophilus* АСТ-41 наблюдали резкое снижение концентрации ДОФА по сравнению с уровнем в среде, т.е. поглощение DOPA с вероятной конверсией в дофамин по вышеприведенной схеме.

Мясо-пептонный бульон (МПБ) отличался отсутствием DOPA (до инокуляции тестируемых бактерий). На этом фоне DOPA в концентрациях порядка десятков наномолей содержалась в культурах *L. lactis* subsp. *cremoris* 18АК и LL-52, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (у двух штаммов из трех тестированных), всех штаммов *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* VG-9. Максимальная концентрация DOPA (44.6 нМ) продуцировалась *L. acidophilus* АСТ-41.

Две также использованных в настоящей работе питательных среды (солодовое сусло и капустный сок) не содержали DOPA изначально, и ни один из тестируемых штаммов не выделял DOPA на этих средах.

Дофамин (DA) отсутствовал до инокуляции бактерий в гидролизате молока (ГМ). Он на данной среде выделялся всеми штаммами. Относительно более эффективными продуцентами (выделявшими около 20 нМ DA) были: 1) *L. lactis* subsp. *lactis* (2 штамма из 3), отметим выработку DA другими штаммами того же вида в работе (Vodolazov et al., 2018), причем штамм *L. lactis* subsp. *lactis* 729 также выделял 20 нМ DA в среду; 2) *L. acidophilus* (2 штамма из трех); 3) *L. lactis* subsp. *cremoris* 36с;

4) *S. salivarius* (только штамм TP-20); 5) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* штамм БГ-Г, отметим продукцию примерно таких же концентраций DA (30 нМ) штаммом того же вида при культивации на молоке в работе (Oleskin et al., 2014).

МПБ содержал примерно 10 нМ DA до культивации бактерий. Только три штамма существенно (до уровней примерно 0.1–0.2 мкМ) обогащали среду DA: два штамма *L. acidophilus* (которые выделяли и предшественник DA – DOPA, см. выше) и штамм VG-9 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Наиболее эффективным продуцентом DA на МПБ был штамм АСТ-41 *L. acidophilus*. В то же время, все штаммы *S. salivarius* subsp. *thermophilus* поглощали DA из среды, особенно штаммы СТ 9 и TP 20-, снижавшие уровень DA в среде до 3–4 нМ. Это находит свое возможное объяснение в постоянном соприкосновении данного представителя оральной микробиоты с содержащимися в слюне нейромедиаторами, включая дофамин (Oleskin и соавт., 2020). До уровня 3.8 нМ поглощал из среды DA также штамм 125 *L. lactis* subsp. *lactis*.

Сусло содержало высокие концентрации DA (3.6 мкМ) до инокуляции, и в этих условиях дополнительного синтеза не наблюдалось, более того, 4 из тестированных штаммов активно поглощали DA из среды (своего рода пример принципа Ле Шателье в случае как недостатка – ГМ и МПБ, так и избытка DA), особенно штамм *L. lactis* subsp. *cremoris* LCN-98, снижавший концентрацию DA в среде до 0.39 мкМ.

Капустный сок также изначально содержал высокие концентрации DA (2 мкМ), и в данной среде поглощение DA осуществлялась всеми штаммами, причем наиболее активно штаммом *L. acidophilus* АСТ-41, снижавший уровень DA в среде до 28 нМ.

Норадrenalин (NA), продукт гидроксирования DA по боковой цепи, содержался в концентрации около 10 нМ в ГМ. Конверсия DOPA → DA → NA функционировала, судя по повышению уровня NA в среде до концентраций около 0.2 мкМ, у всех тестированных бактериальных штаммов. Следует отметить, что синтез субмикромольных количеств NA на гидролизате молока всеми тестированными штаммами лактобацилл, кроме *Lactobacillus casei* K₃III₂₄, показан ранее (Oleskin и соавт., 2014; Oleskin et al., 2014), но среди изученных в работе (Vodolazov et al., 2018) лактококков, статистически достоверный синтез NA (более 1 мкМ) детектирован лишь у штамма *L. lactis* subsp. *lactis* F-116.

МПБ изначально содержал более высокую (около 100 нМ) концентрацию NA, и в этих условиях принцип Ле Шателье работал в сторону поглощения NA из среды всеми штаммами, кроме

L. lactis subsp. *cremoris* LL-52, существенно не менявшего концентрацию NA.

Сусло не содержало NA, побуждая многие штаммы бактерий (кроме *L. lactis* subsp. *cremoris* 36с) реализовать отмеченный принцип в сторону повышения уровня NA до концентраций от 55 нМ (*S. salivarius thermophilus* СТ 160) до максимально 0.5 мкМ (тот же вид, штамм TP 20); этот факт наглядно демонстрирует штаммовую специфичность уровней синтеза нейроактивных соединений, которая имеет серьезные биотехнологические последствия (см. раздел “Обсуждение”).

В капустном соке, имеющем изначально субмикромольный уровень NA (0.16 мкМ), как и в МПБ, наблюдали поглощение NA только у трех штаммов (виды *L. acidophilus* и *L. lactis* subsp. *lactis*), которые снизили концентрацию NA до нуля. При этом остальные тестированные штаммы не снижали уровня NA в среде. Один штамм (*L. lactis* subsp. *cremoris* 36с) даже повысил уровень NA до 0.4 мкМ. Вероятное объяснение кроется в особых свойствах растительных соков, которые активно связывают нейромедиаторы, маскируя их для микроорганизмов и, тем самым, препятствуя запуску программ поддержания гомеостаза.

Адреналин (А) синтезировался в низких концентрациях (10–30 нМ) всеми изученными штаммами при культивировании на ГМ, который не содержал А до инокуляции; при росте на МПБ и сусле (которые также не содержали А) наблюдались более высокие концентрации А, достигавшие максимально 0.15 мкМ на МПБ и 0.85 мкМ на сусле в случае штаммов подвида *L. lactis* subsp. *lactis* (штаммы LLN-E2 и 125 соответственно).

Капустный сок содержал много А (2.4 мкМ), и, следуя принципу Ле Шателье, все штаммы, кроме *S. salivarius thermophilus* СТ 14, поглощали А из среды с разной степенью активности. В случае штамма *L. acidophilus* АСТ-41 в среде совсем не оставалось А.

Распад катехоламинов идет под действием двух типов ферментов: моноаминоксидаз (МАО) и катехол-О-метилтрансфераз (КОМТ). Превращение DA под воздействием МАО дает дигидроксифенилукусную кислоту (DOPAC), которая в концентрациях порядка десятков нМ присутствовала в культурах всех тестированных в настоящей работе штаммов при росте на ГМ, содержащем изначально 5 нМ DOPAC.

Дополнительного выделения DOPAC в среду, однако, не наблюдалось на МПБ, где уже до инокуляции содержалось несколько больше (37 нМ) DOPAC, что, возможно, также объяснимо с позиций принципа Ле Шателье.

DOPAC также представляется применимым к культурам на сусле, где в полном отсутствии среднего DOPAC наблюдался его активный синтез до концентраций в десятки или сотни нМ (“чем-

пионом” выступала культура *L. lactis* subsp. *cremoris* LL-52, выделившая 0.33 мкМ DOPAC; она также единственная из всех тестированных культур синтезировала небольшое дополнительное количество DA на фоне его 3.6 мкМ в сусле).

Наконец, на капустном соке многие штаммы дополнительно обогащали среду DOPAC, несмотря на его изначально высокую концентрацию (0.69 мкМ), особенно штамм *L. lactis* subsp. *lactis* В-102, в культуре которого содержалось 2.2 мкМ DOPAC. Как уже отмечено выше, капустный сок связывает нейромедиаторы и их метаболиты, поэтому гомеостазные механизмы бактерий могут не распознавать имеющиеся в связанном виде концентрации DOPAC. Интересно, что другой испытанный штамм вида *L. lactis* subsp. *lactis* – штамм 125 – был в числе немногих штаммов, поглощавших DOPAC, причем именно данный штамм снижал концентрацию DOPAC в среде до нуля. Эти различия штаммов одного вида показывают биотехнологический потенциал тестированных видов как биотехнологических продуцентов, “биофабрик нейромедиаторов” (см. раздел “Обсуждение”), ибо причинение незначительных изменений – на уровне штаммов одного вида – оказывается достаточным для резкого повышения выхода целевого нейромедиатора.

Отметим, что аналогичная логика на базе принципа Ле Шателье приложима к ранее полученным данным о синтезе DOPAC лактобациллами. В присутствии всех тестированных бактериальных штаммов, концентрации DOPAC возрастали в 3–5 раз на молоке. Напротив, культивация штаммов лактобацилл на панкреатическом гидролизате молока, изначально содержавшем много DOPAC (~1 мкМ), вела к снижению концентрации DOPAC в 1.5–10 раз (Oleskin et al., 2014).

Действие фермента КОМТ на DA дает 3-метилтирамин (3-МТ). Все использованные в настоящей работе штаммы, выращенные на ГМ и МПБ имели КОМТ: они обогащали лишенные 3-МТ среды примерно 10 нМ (на ГМ) или порядка 100 нМ (на МПБ) этого соединения.

Иная картина наблюдалась на сусле и капустном соке с изначальной концентрацией 3-МТ 88 и 18 нМ соответственно: все испытанные штаммы, кроме двух штаммов подвида *L. lactis* subsp. *cremoris* и штамма *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* БГ-Г на сусле и только штамма БГ-Г на капустном соке, активно поглощали 3-МТ, причем 8 штаммов снижали уровень 3-МТ до нуля на сусле и все штаммы (кроме БГ-Г) на капустном соке. Капустный сок, по-видимому, не был способен связывать 3-МТ, другие нейроактивные агенты.

Оба отмеченных метаболита дофамина – DOPAC и 3-МТ далее энзиматически превращаются в финальный продукт пути катехоламинов – го-

мованилиновую кислоту (HVA). Она отсутствовала до инокуляции в средах ГМ и МПБ. При концентрационном разбросе от 0.1 до 290 нМ она выделялась в эти среды тестируемыми бактериальными штаммами.

Трудно объяснить явление “сверхсинтеза” некоторыми штаммами HVA на сусле (236 нМ до инокуляции), где штаммы подвида *L. lactis* subsp. *lactis* и штамм *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* VG-9 продуцировали 47–60 мкМ HVA. В биотехнологическом плане это кандидаты на роль биофабрик нейромедиаторов.

Однако на капустном соке (16 мкМ до инокуляции) активно работали механизмы поглощения HVA, особенно у штамма *L. acidophilus* AE-5, снижавшего уровень HVA в среде до 0.24 мкМ.

Серотонин, его предшественник и продукт метаболизма. Серотонин (5-гидрокситриптамин), 5-НТ, относится к классу триптамина. Он образуется в животном организме из аминокислоты триптофана путем ее последовательного ферментативного 5-гидроксилирования и последующего декарбоксилирования получившегося 5-гидрокситриптофана. В растительных тканях описан альтернативный путь синтеза 5-НТ по принципу: триптофан → триптамин → 5-НТ (Рощина, 1991).

5-Гидрокситриптофан (5-НТР). В ранее проведенных исследованиях на лактобациллах и лактококках не удалось получить достоверные данные о синтезе 5-НТР этими бактериями (Oleskin et al., 2014; Vodolazov et al., 2018). В настоящей работе на средах ГМ и МПБ (не содержащих 5-НТР) наблюдали выделение в среду небольших количеств (1–40 нМ) 5-НТР всеми изученными штаммами. Возможно, бактерии синтезировали большие количества 5-НТР и частично трансформировали его в 5-НТ и далее в продукт его деградации (5-НИАА, см. ниже). Исключение представлял штамм *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* VG-9, при росте которого на МПБ не обнаружено достоверное содержание 5-НТР.

Серотонин (5-НТ), непосредственный продукт 5-НТР, у всех тестируемых культур присутствовал примерно в том же диапазоне концентраций (2–30 нМ), что его предшественник, на средах ГМ и МПБ, исходно лишенных 5-НТ.

Однако способность к синтезу пусть и невысоких количеств серотонина не универсальна в микробном мире. Предшествующие исследования говорят о штаммоспецифическом характере этой способности. Из исследованных ранее видов и штаммов лактобацилл, лишь штамм *Lactobacillus helveticus* 100аш выделял в среду 5-НТ, зато в сравнительно высоких концентрациях (0.4–0.5 мкМ) (Oleskin et al., 2014). Из длинного списка изученных методом ВЭЖХ прокариот наличие 5-НТ в биомассе было показано только у грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus*

aureus в концентрациях порядка 1 мкМ (Цавкелова и соавт., 2000).

Сусли и капустный сок до инокуляции содержали субмикромольные концентрации 5-НТ (0.92 и 0.35 мкМ соответственно). На сусле мы не детектировали достоверного изменения средовых концентраций 5-НТ при культивировании всех тестируемых штаммов. Большинство штаммов при культивировании на капустном соке также существенно не влияли на эти средовые концентрации 5-НТ, кроме штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* LLN-E2 и *L. lactis* subsp. *cremoris* LL-52, обогащавших среду субмикромольными количествами 5-НТ, а также обоих исследованных штаммов *L. acidophilus*, активно поглощавших 5-НТ из среды.

5-Гидроксииндолилуксусная кислота (5-НИАА). Ферментативное окисление серотонина с помощью MAO приводит к формированию 5-гидроксииндолилуксусной кислоты (5-НИАА). Аналогично самому 5-НТ, 5-НИАА при культивировании тестируемых в данной работе штаммов на ГМ и МПБ образуется в этих средах в низких (наномольных) концентрациях (исключение представляли штамм *L. lactis* subsp. *cremoris* LL-52 на ГМ и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* VG-9 на МПБ, вовсе не выделявшие 5-НТ в среду). При культивировании на исходно богатых 5-НИАА средах — сусле и капустном соке — мы наблюдали дальнейшее накопление 5-НИАА в них: всеми штаммами в случае сусли и большинством (кроме 4 штаммов) на капустном соке.

В целом, полученные данные свидетельствуют о функционировании у изученных бактериальных видов и штаммов “животных” путей синтеза и деградации катехоламинов и индоламина (серотонина).

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа служит продолжением ряда исследований микробного синтеза нейроактивных соединений, в частности, биогенных аминов (БА). Ранее показано, что заквасочные штаммы лактобацилл (*Lactobacillus helveticus* 100аш, *L. helveticus* NK-1, *L. casei* K3III24 и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) различались уровнем накопления нейромедиаторов: DA синтезировали только *L. helveticus* NK-1 и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; все штаммы, кроме *L. casei* K3III24, обогащали среды NA. Штаммы также образовывали DOPA. Серотонин детектирован в культуральной жидкости *L. helveticus* 100аш, но не у остальных тестируемых в цитируемых работах лактобацилл (Олескин и соавт., 2014; Oleskin et al., 2014). В литературе представлены данные о синтезе 5-НТ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363, *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403, *Lactobacillus plantarum* NCFB2392 (Özogul et al., 2012).

Значение настоящего исследования на фоне более ранних авторских и литературных данных состоит, во-первых, в том, что у 13 штаммов 5 видов прокариот, взаимодействующих с человеческим организмом в ролях симбионтов и/или пробиотиков, прослежены пути синтеза и деградации 1) катехоламинов и 2) серотонина. В целом, эти энзиматические пути соответствуют классическим путям, реализуемым в организмах животных и человека. Для катехоламинов они включают этапы синтеза: $DOPA \rightarrow DAA \rightarrow NA \rightarrow A$, а деградация DA реализуется в двух вариантах: $DA \rightarrow DOPAC \rightarrow HVA$ и $DA \rightarrow 3\text{-MT} \rightarrow HVA$ (рис. 1 и 2).

Во-вторых, в результате исследования показана зависимость уровня накопления нейроактивных соединений от состава питательной среды. В частности, на гидролизате молока, содержащем, в отличие от других сред, DA, выражены как его синтез из предшественника DOPA, так и дезаминирование с образованием DOPAC. На МПБ, напротив, выражен путь превращения DA в 3-МТ, а затем в HVA. Обогащение среды МПБ NA подавляло его синтез, в противоположность этому был очень выражен синтез NA при росте бактерий на ГМ. Выше мы уже интерпретировали этот факт как свидетельство реализации принципа Ле Шателье и стремление системы сохранить состояние гомеостаза. При этом на МПБ отмечено большее накопление A, чем на ГМ. Путь синтеза нейробиотиков из L-триптофана был более выражен при росте бактерий на МПБ, где основным продуктом был 5-НТ, тогда как на молоке отмечено его дезаминирование в 5-НИАА. Для большинства штаммов *L. lactis* subsp. *cremoris* на сусле также в значительной степени выражен путь $DA \rightarrow A$ и путь $DA \rightarrow DOPAC$, но это не всегда приводит к накоплению в среде HVA. Однако во всех случаях при росте на сусле количество образовавшихся нейромедиаторов было значительно (на порядок) больше чем при культивировании на ГМ и МПБ.

В цепи нейроактивных соединений, берущих начало от триптофана, при культивировании МКБ на сусле, также отмечен интенсивный синтез, в результате которого содержание серотонина в среде значительно превышает концентрацию этого нейромедиатора при использовании в качестве среды ГМ и МПБ. Количество серотонина и продукта его распада 5-НИАА в сусле на порядок выше, чем в ГМ и МПБ, причем это характерно для всех исследованных штаммов, за исключением одного штамма *L. lactis* subsp. *cremoris* 18AK, при культивировании которого в среде снижалось содержание 5-НИАА. При культивировании этого штамма на капустном соке, характеризующемся высоким содержанием соединений типа DA, A, HVA, 5-НТ, количество этих соединений в случае DA и HVA на два порядка превышало содержание этих соединений в ГМ и МПБ.

В-третьих, в настоящей работе рельефно выступила зависимость образующихся соединений от таксономической принадлежности МКБ. Так, для *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* наблюдался значительный прирост DA и продукта его распада DOPAC, а также накопление A в количествах, значительно превышающих его образование при выращивании на МПБ и ГМ. При культивировании *L. acidophilus* происходило поглощение DA из среды, синтез A отсутствовал. Поглощение DA сопровождалось увеличением количества продуктов его распада DOPAC и HVA. *S. salivarius* при культивировании на сусле характеризовался высокой активностью синтетических процессов в цепи $DA \rightarrow NA \rightarrow A$. Количество образовавшихся БА было значительно больше на сусле, чем при культивировании на ГМ и МПБ. *L. lactis* также проявлял значительно более высокую синтетическую активность в цепи $DA \rightarrow A$ при выращивании на сусле в сравнении с ГМ и МПБ. Также необходимо отметить выраженный путь $DA \rightarrow DOPAC \rightarrow HVA$, который приводит к накоплению в среде больших количеств HVA.

В-четвертых, в рамках понятия “таксономическая принадлежность” следует особо очертить роль штаммовых различий. Так, два штамма одного и того же вида *S. salivarius thermophilus* СТ 160 и ТР 20- отличались по выходу NA на одной и той же среде (сусле) в ~10 раз (55 и 508 нМ). При культивировании на капустном соке штаммы *L. lactis* subsp. *lactis* демонстрировали диаметрально противоположные активности – штамм В-102 повышал уровень среднего DOPAC на примерно 1.5 мкМ, а штамм 125 снижал этот уровень до нуля. Подобные факты имеют биотехнологический потенциал. Селекция на штаммовом уровне или сравнительно небольшое по объему генноинженерное вмешательство могут резко поднять эффективность синтеза интересующих нас продуктов, к числу которых, несомненно, принадлежат имеющие многочисленные применения в медицине и психиатрии нейроактивные соединения.

Понятно, что потенциально многообещающая идея превращения продуцирующих нейромедиаторы микроорганизмов в “биофабрики” нейромедиаторов (их предшественников, метаболитов, агонистов) наталкивается на проблему концентрации микробных нейромедиаторов: в большинстве случаев они слишком низки для биотехнологического производства (Олескин и соавт., 2020). В наших опытах речь идет пока лишь о микромолях или даже наномолях нейроактивных соединений. Тем не менее, современные эффективные методы селекции, в том числе с использованием генетической инженерии в современной биотехнологии, в принципе, дают нам основания ожидать создания суперпродуцентов ценных нейромедиаторов (и родственных биологически активных соединений).

Успешные примеры создания подобных супер-продуцентов касаются нейроактивных аминокислот. Так, поиски эффективных продуцентов γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и оптимизация условий их культивирования привели к созданию суперпродуцентов этой аминокислоты (Олескин и соавт., 2020; Oleskin, Shenderov, 2020). Высокопродуктивными оказались стартерные культуры лактобацилл и бифидобактерий, изолированные из ЖКТ людей, проживающих в Центральном регионе России. Штамм *Bifidobacterium adolescentis* 150 продуцировал до 5.6 г/л ГАМК, что соответствует примерно 50 мМ ГАМК (Юнес, 2017).

Среди тестированных в настоящей работе штаммов выделяются продуцирующие субмикромольные (>0.1 мкМ) концентрации нейромедиаторов на определенных средах. Например, в плане синтеза NA таковыми были все выращенные на гидролизате молока штаммы *L. lactis* subsp. *lactis* (при почти двукратных межштаммовых различиях), что полностью согласуется с ранее полученными данными для других штаммов того же подвида (где “чемпионом” был штамм F-116 с выходом 1.9 мкМ; Vodolazov et al., 2018). Два из трех исследованных в данной работе штаммы *L. acidophilus* продуцировали более 0.1 мкМ дофамина на среде МПБ. Подобные субмикромольные концентрации являются физиологически активными как для организма человека (в случае использования соответствующих МКБ как пробиотиков), так и внутри микробного сообщества.

Необходимо отметить, что многие нейромедиаторы одновременно функционируют в качестве коммуникативных сигналов у микроорганизмов. “Общение” между микробными клетками посредством нейромедиаторов носит двусторонний характер – они и продуцируют эти сигналы, и реагируют на них. Важно подчеркнуть, что они влияют на рост различных представителей симбиотической и паразитической микробиоты организма человека. Катехоламины стимулируют также рост симбиотических штаммов *E. coli* (Freestone et al., 2007; Анучин и соавт., 2008) и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Маликина и соавт., 2010; Oleskin et al., 2010).

В то же время нейромедиаторы стимулируют рост и, в некоторых системах, образование токсинов у многих патогенных микроорганизмов, например, *Yersinia enterocolitica*, энтеротоксических, энтерогеморрагических штаммов *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *B. bronchiseptica*, *Aeromonas hydrophila*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* (Олескин и соавт., 2016, 2020; Oleskin, Shenderov, 2020). Некоторые из нейромедиаторов распознаются микроорганизмами, как сигналы QS-систем. Этим объясняются механизмы стимуляторного действия катехоламинов на рост,

формирование биопленок и другие процессы у микроорганизмов, у которых обнаружены функциональные аналоги аденорецепторов, такие как киназы QseC и QseE у *E. coli* (Clarke et al., 2006; Hughes et al., 2009). Серотонин также выступает как сигнал одной из QS-систем *P. aeruginosa* (Knecht et al., 2016).

Дальнейшее рассмотрение широчайшего спектра сигнальных и регуляторных эффектов нейроактивных соединений в микробном мире лежит за пределами настоящей экспериментальной работы (Олескин и соавт., 2016, 2020; Oleskin et al., 2017; Oleskin, Shenderov, 2019, 2020).

Весьма важным аспектом микробной продукции нейроактивных соединений является воздействие производимых микробиотой нейроактивных соединений на человеческий организм, в особенности на его нервную систему. “Мы зависим от множества важнейших нейрохимических факторов, производимых микробами” (Dinan et al., 2015). Так, серотонергическая (зависимая от нейромедиатора серотонина) система головного мозга, ведающая многими аспектами эмоционального поведения, не может развиваться в полной мере при отсутствии микробиоты (Clarke et al., 2013). Из числа продуцируемых микроорганизмами нейрохимических факторов особое значение имеют те вещества, которые способны проходить через два барьера – барьер между кишечной слизистистой и кровотоком и барьер между кровотоком и мозгом (гемато-энцефалический барьер, ГЭБ).

Что касается детектированных в настоящей работе нейроактивных соединений, то способностью проникать через указанные барьеры обладает DOPA. Это представляет интерес в рамках понимания оси микробиота–кишечник–мозг, ибо вырабатывающие DOPA микроорганизмы, как пробиотические (лактобациллы), так и потенциально патогенные, включая *Bacillus cereus* (Шишов, 2010; Oleskin et al., 2010), могут вызывать у контактирующего с ними индивида состояние эйфории в результате превращения микробной DOPA в дофамин в мозге. В нашем исследовании максимальные (субмикромольные) концентрации DOPA получены в случае штамма *S. salivarius thermophilus* TP20- на гидролизате молока. Необходимо отметить, что *S. salivarius thermophilus* рассматриваются как условные патогены. При этом они являются важными пробиотиками для гигиены ротовой полости (предотвращения инфекций), а также для поддержания иммунитета против *Staphylococcus pyogenes*.

Другие, неспособные преодолеть ГЭБ, нейроактивные вещества – катехоламины, серотонин, тем не менее, могут оказывать важное локальное действие на уровне желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), если привносятся в организм с пробиотиками или вырабатываются резидентной микро-

биотой. Подчеркнем, что уже наномолярные и тем более субмикромольные концентрации NA или DA имеют физиологическое значение и сопоставимы с концентрациями нейромедиаторов в физиологических жидкостях организма. В частности, кровь человека в среднем содержит 1–10 нМ DA (в свободной форме, есть также 0.2–0.3 мкМ сульфоконъюгированного DA) и примерно 0.1 мкМ NA, а также 0.5–1.5 мкМ 5-НТ (Eldrup, 2004; McPherson, Pincus, 2011).

В кишечнике микробные нейромедиаторы прямо взаимодействуют с содержащей около 0.5 млн нервных клеток энтеральной нервной системой (ЭНС), которая взаимодействует с головным мозгом посредством блуждающего нерва (*nervus vagus*). Микробные нейромедиаторы действуют на центральную нервную систему также посредством иммунной системы, которая вырабатывает нейроактивные факторы. Иммунная система находится под непосредственным влиянием химических продуктов кишечной микробиоты, поскольку в стенке кишечника расположен ее важный отдел (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT). В частности, катехоламины способны оказывать иммуносупрессорное и противовоспалительное действие, хотя их эффекты на иммунную систему носят сложный и не до конца изученный характер (Олескин и соавт., 2020; Oleskin et al., 2017; Oleskin, Shenderov, 2020).

Подводя итог полученным в настоящей работе результатам, мы можем констатировать, что симбиотические и пробиотические штаммы, выращенные на органических средах в условиях, приближенных к физиологическим, способны продуцировать физиологически значимые концентрации важнейших нейромедиаторов, их предшественников и метаболитов. Последние должны оказывать существенное влияние на человеческий организм с его иммунной и нервной системами, а также на населяющую организм микробиоту в норме и патологии. Представленные данные имеют определенный биотехнологический потенциал, поскольку создают предпосылки для создания суперпродуцентов нейроактивных соединений (“микробных биофабрик”).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансировании по госзаданию ФИЦ Биотехнологии РАН, а также в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анучин А.М., Чувелев Д.И., Кировская Т.А., Олескин А.В. Действие нейромедиаторных моноаминов на ростовые характеристики *Escherichia coli* K-12 // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 758–765.
- Anuchin A.M., Chuvelev D.I., Kirovskaya T.A., Oleskin A.V. Effects of monoamine neuromediators on the growth-related variables of *Escherichia coli* K-12 // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 674–680.
- Жиленкова О.Г., Шендеров Б.А., Клодт П.М., Кудрин В.С., Олескин А.В. Молочные продукты как потенциальный источник соединений, модифицирующих поведение потребителей // Молочная промышленность. 2013. № 10. С. 16–19.
- Маликина К.Д., Шишов В.И., Чувелев Д.И., Кудрин В.С., Олескин А.В. Регуляторная роль нейромедиаторных аминов в клетках *Saccharomyces cerevisiae* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. С. 672–677.
- Malikina K.D., Shishov V.A., Chuvelev D.I., Kudrin V.S., Oleskin A.V. The regulatory role of monoamine neuromediators in *Saccharomyces cerevisiae* cells // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 620–626.
- Олескин А.В., Кировская Т.А., Ботвинко И.В., Лысак Л.В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференциацию микроорганизмов // Микробиология. 1998. Т. 67. С. 306–311.
- Oleskin A.V., Kirovskaya T.A., Botvinko I.V., Lysak L.V. Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine) on the growth and differentiation of microorganisms // Microbiology (Moscow). 1998. V. 67. P. 251–257.
- Олескин А.В., Жиленкова О.Г., Шендеров Б.А., Амерханова А.М., Кудрин В.С., Клодт П.М. Заквасочные культуры лактобацилл – продуценты нейромедиаторов: биогенных аминов и аминокислот // Молочная промышленность. 2014. № 9. С. 42–43.
- Олескин А.В., Эль-Регистан Г.И., Шендеров Б.А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 3–25.
- Oleskin A.V., El'-Registan G.I., Shenderov B.A. Role of neuromediators in the functioning of the human microbiota: “business talks” among microorganisms and the microbiota–host dialogue // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 1–22.
- Олескин А.В., Шендеров Б.А., Роговский В.С. Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Изд-во МГУ, 2020. 288 с.
- Рощина В.В. Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и биогенные амины. Пушино: Биологический Центр АН СССР, 1991. 192 с.

- Tenner E.Z., Pereverzeva G.I. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов вузов. 5-е изд. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
- Цавкелова Е.А., Ботвинко И.Б., Кудрин В.С., Олескин А.В. Детекция нейромедиаторных аминов у микроорганизмов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Докл. Росс. Акад. Наук. 2000. Т. 372. С. 840–842.
- Шендеров Б.А. Микробная экология и ее роль в поддержании здоровья // Метаморфозы. 2014а. № 5. С. 72–80.
- Шишов В.А., Кировская Т.А., Кудрин В.С., Олескин А.В. Нейромедиаторные амины, их предшественники и продукты окисления в биомассе и супернатанте культуры *Escherichia coli* K-12 // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. С. 550–554.
- Shishov V.A., Kirovskaya T.A., Kudrin V.S., Oleskin A.V. Amine neuromediators, their precursors, and oxidation products in the culture of *Escherichia coli* K-12 // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. P. 489–493.
- Шишов В.А. Биогенные амины в динамике роста микроорганизмов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2010.
- Юнес Р.А. Адаптивное значение для человека бактерий рода *Lactobacillus* и рода *Bifidobacterium*. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: РУДН, 2017.
- Barbara G., Stanghellini V., Brandi G., Cremon C., Nardo G., Giorgio R., Corinaldesi R. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease // Am. J. Gastroenterol. 2005. V. 100. P. 2560–2568.
- Bercik P., Park A.J., Sinclair D., Khoshdel A., Lu J., Huang X., Deng Y., Blennerhassett A., Fahnstock M., Moine D. et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication // Neurogastroenterol. Motil. 2011. V. 23. P. 1132–1139.
- Bravo J.A., Forsythe P., Chew M.V., Cryan J.F. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 16050–16055.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Carabottia M., Scirocco A., Maselli M.A., Severia C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems // Ann. Gastroenterol. 2015. V. 28. P. 203–209.
- Clarke M.B., Hughe D.T., Zhu C., Boedeker E.C., Sperandio V. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 10420–10425.
- Clarke G., Grenham S., Scully P., Fitzgerald P., Moloney R.D., Shanahan F., Dinan T.G., Cryan J.F. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner // Mol. Psychiatry. 2013. V. 18. P. 666–673.
- Dhakar R., Bajpai V.K., Baek K.H. Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review // Braz. J. Microbiol. 2012. V. 43. P. 1230–1241.
- Dinan T.G., Stilling R.M., Stanton C., Cryan J.F. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior // J. Psych. Res. 2015. V. 63. P. 1–9.
- Eldrup E. Significance and origin of DOPA, DOPAC, and dopamine sulfate in plasma tissue, and cerebrospinal fluid // Dan. Med. Bull. 2004. V. 31. P. 34–62.
- Foster J.A., McVey Neufeld K.A. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression // Trends Neurosci. 2013. V. 36. P. 305–312.
- Foster J.A., Lyte M., Meyer E., Cryan J.F. Gut microbiota and brain function: an evolving field in neuroscience // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2016. V. 19.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv114>
- Freestone P.P.E., Haigh R.D., Lyte M. Blockade of catecholamine-induced growth by adrenergic and dopaminergic receptor antagonists in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* // BMC Microbiol. 2007. V. 7.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-8>
- Gordon J.I. Honor thy gut symbionts redux // Science. 2012. V. 336. P. 1251–1253.
- Heijtz R.D., Wang S., Anuar F., Qian Y., Bjorkholm B., Samuelsson A., Hibberd M.L., Forsberg H., Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 3047–3052.
- Hoffmann F. La Roche Ltd Roche Biochemical Pathways, 4th edn. Part 1: Metabolic Pathways 01.01.2014 // <http://biochemical-pathways.com/#/map/1>
- Hughes D.T., Clarke M.B., Yamamoto K., Rasko D.A., Sperandio V. The QseC adrenergic signaling cascade in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) // PLoS Pathogen. 2009. V. 5. e1000553.
- Knecht L.D., O'Connor G.O., Mittal R., Liu X.Z., Daftarian P., Deo S.K., Daunert S. Serotonin activates bacterial quorum sensing and enhances the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the host // EBioMedicine. 2016. V. 9. P. 161–169.
- Lim H.S., Cha I.-T., Lee H., Seo M.-J. Optimization of γ -aminobutyric acid production by *Enterococcus faecium* JK29 isolated from a traditional fermented foods // Microbiol. Biotechnol. Lett. 2016. V. 44. P. 26–33.
- McPherson R.A., Pincus M.R. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011.
- Naseribafrouei A., Hestad K., Avershina E., Sekelja M., Linlokken A., Wilson R., Rudi K. Correlation between the human fecal microbiota and depression // Neurogastroenterol. Motil. 2014. V. 26. P. 1155–1162.
- Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions // Science. 2012. V. 336. P. 1262–1267.
- Oleskin A.V., Malikina K.D., Shishov V.A. Symbiotic biofilms and brain neurochemistry. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publ., 2010.
- Oleskin A.V., Zhilenkova O.G., Shenderov B.A., Amerhanova A.M., Kudrin V.S., Klodt P.M. Lactic-acid bacteria supplement fermented dairy products with human behavior-modifying neuroactive compounds // J. Pharm. Nutrit. Sci. 2014. V. 4. P. 199–206.
- Oleskin A.V., Shenderov B.A., Rogovsky V.S. Role of neurochemicals in the interaction between the microbiota and the immune and the nervous system of the host organism // Probiot. Antimicrob. Proteins. 2017. V. 9. P. 215–234.
- Oleskin A.V., Shenderov B.A. Probiotics and psychobiotics: the role of microbial neurochemicals // Probiot. Antimicrob. Proteins. 2019. V. 11. P. 1071–1085.
- Oleskin A.V., Shenderov B.A. Microbial Communication and Microbiota-Host Interactivity: Neurophysiological,

Biotechnological, and Biopolitical Implications. Hauppauge (N.Y.): Nova Science Publishers, 2020.

Özogul F. Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvii* using a rapid HPLC method // Europ. Food Res. Technol. 2004. V. 219. P. 465–469.

Özogul F., Kuley E., Özogul Y., Özogul I. The function of lactic acid bacteria on biogenic amines production by food-borne pathogens in arginine decarboxylase broth // Food Sci. Technol. Res. 2012. V. 18. P. 795–804.

Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S.K., McCulle S.L., Karlebach Sh., Gorle R., Russell J., Tacket C.C., Brotman R.M., Davis C.C., Ault K., Peralta L., Forney L. Vaginal microbiome of reproductive-age women // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. Suppl. 1. P. 4680–4687.

Siragusa S., Angelis M.D., Cagno R.D., Rizzello C.G., Coda R., Gobbetti M. Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 7283–7290.

Tsigos C., Chrousos G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress // J. Psychosom. Res. 2002. V. 53. P. 865–871.

Vodolazov I.R., Dbar S.D., Oleskin A.V., Stoyanova L.G. Exogenous and endogenous neuroactive biogenic amines // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. P. 603–610.

Zhao A., Hu X., Pan L., Wang X. Isolation and characterization of a gamma-aminobutyric acid producing strain *Lactobacillus buchneri* WPZ001 that could efficiently utilize xylose and corncob hydrolysate // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 3191–3200.

Synthesis of Biogenic Amines by Lactic Acid Bacteria on Media of Plant and Animal Origin

E. F. Shanenko¹, Yu. A. Nikolaev², *, V. I. Ganina¹, I. N. Serykh¹, A. V. Oleskin³, T. G. Mukhamedzhanova¹, N. V. Grigorieva², and G. I. El'-Registan²

¹Moscow State University for Food Industry, Moscow, 125080 Russia

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

³Department of General Ecology and Hydrobiology, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow 119234 Russia
*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Received March 14, 2022; revised March 17, 2022; accepted March 22, 2022

Abstract—The intestinal microbiota is known to perform an important role in terms of the host organism's metabolism and life-sustaining activities. One of the main mechanisms of the interactions between microbiota and the human organism is based upon biogenic amines (BAs). Therefore, BA synthesis by lactic acid bacteria (LABs) is extensively researched currently, and the BA-forming capacity is considered an essential feature of LAB probiotics. The present work is concerned with BA production by 13 strains of three LAB species that were isolated from various habitats. They perform diverse ecophysiological functions and were grown on four different media. The media were characterized by different initial BA concentrations. It was established that the LABs could both consume BAs present in the medium and synthesize them *de novo* during their growth. The data should be taken into account while developing new probiotics. Based on the results of this work, a modified version of BA biosynthesis pathways by LABs was suggested. This work also deals with the implications of the data obtained in terms of the involvement of microbially produced neuroactive compounds in the functioning of the microbial consortium of the human organism and the operation of human nervous and the immune systems. Prospects for developing “neurotransmitters-producing biofactories” on the basis of the tested symbiotic and probiotic microorganisms are discussed.

Keywords: lactic acid bacteria, biogenic amines, probiotics, medium-dependent synthesis, metabolic pathways

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИМОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
СИСТЕМЫ КОНЬЮГАЦИИ ПЛАЗМИДЫ pBS72 ПРИРОДНЫХ
БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*© 2022 г. А. С. Гуринович^а, М. А. Титок^а, *^аКафедра микробиологии, биологический факультет, Белорусский государственный университет,
Минск, 220030 Республика Беларусь

*e-mail: m_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 14.02.2022 г.

После доработки 22.03.2022 г.

Принята к публикации 27.03.2022 г.

Конъюгационная система плазмиды pBS72, широко распространенная среди внехромосомных генетических элементов природных бактерий рода *Bacillus*, является уникальной и может быть отнесена к новому семейству. Новая систематическая группа, обозначенная как Mpf_s, имея сходство с системой конъюгации хорошо изученной плазмиды pLS20 бактерий *B. subtilis* nato, характеризовалась особенностями молекулярно-генетической организации и функциональной активности. В частности, ключевые белки конъюгации VirB4, VirB6, VirB11, VirD4 и Adg плазмид pLS20 и pBS72, сходные в области функциональных доменов, достоверно отличались между собой, образуя отдельные филогенетические группы. Гены (*rco*, *rap*, *phr*), определяющие белки регуляции конъюгации плазмиды pLS20, в плазмиде pBS72 имели иную локализацию, а сходство между аминокислотными последовательностями не превышало 40.21% для белка Rco, 24.41% для белка Rap и отсутствовало для белка Phr. В отличие от плазмиды pLS20, частота конъюгационного переноса плазмиды pBS72 и мобилизуемой плазмиды pCB16 не зависела от стадии роста и концентрации донорных клеток и определялась составом среды и генетическими особенностями бактерий реципиентов. Полученные результаты являются основой для изучения механизма распространения pBS72-подобных плазмид в природной среде обитания и создания на их основе системы генетического анализа биотехнологически значимых бактерий рода *Bacillus*.

Ключевые слова: конъюгация, маркерные белки конъюгации, частота конъюгационного переноса**DOI:** 10.31857/S0026365622300188

Распространение генов антибиотикорезистентности среди природных микроорганизмов представляет серьезную проблему. В медицинской практике данный феномен рассматривается как новый вид инфекции, осложняющий лечение бактериальных заболеваний дорогостоящими антибактериальными препаратами. Усилия многих научных лабораторий направлены на изучение путей ее распространения и механизмов возникновения. В этом плане ключевой интерес представляют гены антибиотикорезистентности, локализованные в составе плазмид, которые могут попадать в клетки природных микроорганизмов путем конъюгации, трансформации или трансдукции (Davies, 2010). Следует отметить, что только бактерии способны использовать системы генетического обмена для горизонтального переноса генов между неродственными видами, что обеспечивает их быструю адаптацию в изменяющихся условиях внешней среды.

Среди систем горизонтального переноса генов ключевой интерес представляет процесс конъюгации, за счет которого осуществляется эффективная передача не только конъюгативных плазмид, но и любых внехромосомных генетических элементов (передаются за счет конъюгативных плазмид или путем временного объединения двух плазмидных репликаонов в клетке донора, с последующим разъединением в клетке реципиента) (Xiaoming, 1997). В связи с этим, конъюгативные системы являются объектом пристального внимания. В частности, для них активно разрабатывается классификация, основанная на особенностях организации ключевых белков, определяющих конъюгационный перенос. Накопленные данные позволяют систематизировать знания о функциональной организации этих систем и служат основой для изучения механизмов распространения плазмид в природной среде обитания.

Структурная и функциональная организация белков, определяющих конъюгационный перенос,

наиболее полно изучена для Ti-плазмиды бактерий *Agrobacterium tumefaciens*. Для остальных плазмид проводят анализ отдельных белков в сравнении с таковыми плазмиды Ti, позволяющий судить об их функциональной активности. В результате такого подхода были выявлены наиболее консервативные белки, которые используются в качестве маркерных для классификации внехромосомных генетических элементов. В первую очередь, это релаксаза (Mob-белок), входящая в систему всех без исключения плазмид, передающихся путем конъюгации (конъюгативные и мобилизуемые плазмиды). Она является ключевым белком конъюгации, распознающим *oriT*-сайт, локализованным в *cis*-положении на передающейся плазмиде, и катализирует начальное расщепление плазмидной ДНК в *oriT*-сайте в клетке донора и восстановление передаваемой плазмиды в клетке реципиента. На основании сходства релаксаз, конъюгативные и мобилизуемые плазмиды отнесены к семи классификационным группам или семействам (MOBF, MOBH, MOBQ, MOVC, MOVP, MOVV и MOBL) (Ramachandran, 2017). Следует отметить, что релаксазы семейства MOBL характерны только для конъюгативных плазмид грамположительных бактерий группы *Firmicutes*.

Поскольку перенос ДНК из клетки донора в клетку реципиента требует энергетических затрат, все конъюгативные плазмиды кодируют белки с АТФ-азной активностью. Ключевыми АТФ-азами являются белок VirB4, входящий в Mpf-систему секреции IV типа и определяющий перенос ДНК через цитоплазматическую мембрану (для плазмид грамотрицательных бактерий дополнительно определяет синтез половых пилей), и белок VirD4 (coupling protein – связывающий белок T4CP), играющий роль связывающего белка между Mpf-системой и релаксасомой (Tra-система). На основании сходства белков VirB4 выделено восемь классификационных групп (MPF_T, MPF_F, MPF_G, MPF_C, MPF_B, MPF_{FA}, MPF_{FATA}, MPF_I) (Guglielmini et al., 2014).

Следует отметить, что ограниченный круг внехромосомных генетических элементов (плазмиды семейств MPF_T и MPF_I) кодируют синтез еще одной АТФ-азы VirB11, взаимодействующей с белком VirB4 и выполняющей сходные с ним функции. Во время переноса данных плазмид одна цепь ДНК последовательно контактирует со связывающим белком VirD4, а затем с АТФ-азой VirB11 и белками внутренней мембраны VirB6 и VirB8 и, наконец, с белковым комплексом, образующим переплазматический канал для переноса (VirB7, VirB9 и VirB10) (Cascales, 2003). Системы конъюгации грамположительных бактерий не содержат генов, кодирующих белки, обеспечивающие образование пилей (VirB5 и VirB2) и перенос ДНК через периплазму

(VirB7, VirB9 и VirB10) (Alvarez-Rodriguez, 2020). Контакт между конъюгирующими клетками обеспечивается адгезинами (Grohmann, 2017).

Конъюгативные и мобилизуемые плазмиды грамположительных бактерий группы *Firmicutes* представляют большой научный и практический интерес, поскольку эти повсеместно распространенные микроорганизмы являются патогенами для человека и животных (например, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и др.), входят в состав нормальной микробиоты человека (например, *Lactobacillus*) и широко используются в промышленном производстве в качестве продуцентов биологически активных соединений, ферментов, антибиотиков, стимуляторов роста растений и животных (Harwood, 2018). Ряд представителей этой обширной группы (например, *B. subtilis*) отнесены к абсолютно безопасным для человека микроорганизмам (имеют статус GRAS). Отсутствие принципиальных генетических барьеров между представителями *Firmicutes* предполагает возможность горизонтального переноса генов с помощью конъюгативных плазмид. Известно, что многие неконоъюгативные плазмиды, в том числе и антибиотикорезистентные патогенных бактерий (например, *Staphylococcus* и *Streptococcus*), имеющие разные системы репликации, способны стабильно поддерживаться в клетках *B. subtilis* (Grohmann, 2003). Следовательно, данные повсеместно распространенные и безопасные микроорганизмы при наличии в их клетках конъюгативных плазмид могут играть ключевую роль в распространении генов, в том числе антибиотикорезистентности, среди бактерий разных систематических групп. В настоящее время для бактерий *B. subtilis* описано лишь две конъюгативные плазмиды (pLS20 и pBS72) (Meijer, 1995; Titok, 2003). Установлено, что плазмиды, содержащие идентичные плазмиде pBS72 системы репликации, содержатся в клетках бактерий *B. subtilis*, циркулирующих на территории Беларуси, Пакистана и Нидерландов (Гуринович, 2020). Присутствие плазмиды pBS72 повышает устойчивость содержащих ее природных и коллекционных бактерий *B. subtilis* к стрессовым факторам среды (высокая осмолярность, низкие и высокие значения pH среды, УФ-облучение) (Гуринович, 2020). Для одной из плазмид подобных pBS72 (p19) показана способность эффективно передаваться в клетки близкородственных бактерий и мобилизовать перенос плазмид, содержащих релаксазу семейства MOVV (Poluektova, 2004). Вышеперечисленные свойства плазмиды pBS72 позволяют рассматривать ее в качестве модельного объекта для изучения особенностей организации системы конъюгации.

Целью настоящей работы являлся сравнительный молекулярно-генетический и функциональный анализ системы конъюгации плазмиды pBS72 природных бактерий *B. subtilis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали природные бактерии *B. subtilis* 16, *B. licheniformis* FD9, *B. vezelensis* 7IA3 и *B. subtilis* 72 из коллекции кафедры микробиологии БГУ, коллекционный штамм *B. subtilis* 168 (Anagnostopoulos, 1961) и его рифампицинрезистентный вариант (Гуринович, 2020), а также плазида pBS72, маркированная геном эритромицинрезистентности (Гуринович, 2020), и плазида pCB16, определяющая устойчивость к тетрациклину (Bernhard, 1978). Бактерии выращивали в полноценной среде LB (Миллер, 1976) или минимальной среде Spizizen (Anagnostopoulos, 1961) при 37°C с аэрацией (240 об./мин). Для роста бактерий *B. subtilis* 168 на среде Spizizen добавляли триптофан в концентрации 50 мкг/мл. Агаризованные среды содержали 1.5% агара, источником углерода служила глюкоза в концентрации 0.5%. В работе использовали коммерческие препараты тетрациклина, эритромицина, стрептомицина и рифампицина в концентрациях 10, 20, 25 и 100 мкг/мл соответственно.

Тотальную ДНК выделяли саркозидовым методом (te Riele, 1986).

Скрещивание бактерий. В качестве донорных использовали бактерии *B. subtilis* 72, содержащие маркированную геном эритромицинрезистентности плазмиду pBS72, и *B. subtilis* 168, содержащие маркированную геном эритромицинрезистентности плазмиду pBS72 и вектор pCB16, детерминирующий устойчивость к тетрациклину. В качестве реципиентов использовали штамм *B. subtilis* 168 устойчивый к рифампицину (спонтанный мутант) и природные штаммы *B. subtilis* 16, *B. licheniformis* FD9 и *B. vezelensis* 7IA3, устойчивые стрептомицину (устойчивость природного происхождения). Для скрещивания в жидкой среде ночную культуру бактерий, выращенную в среде LB или Spizizen, разводили в 10 раз, соответственно, в свежей среде LB или Spizizen и выращивали с аэрацией в течение 3 или 24 ч. Для скрещивания на плотной среде ночные культуры донора и реципиента в соотношении 1 : 1 наносили на мембранные фильтры, помещенные на поверхность агаризованной среды LB или Spizizen, и культивировали в течении 3 или 24 ч. По истечении 3 или 24 ч скрещивания клетки высевали на селективные среды определенного состава. При переносе плазмиды pBS72 в клетки бактерии *B. subtilis* 168 трансконъюганты отбирали на полноценной агаризованной среде LB, содержащей в качестве селективного и контрselectивного маркеров, соответственно, эритромицин и рифампицин в концентрации 10 и 100 мкг/мл. При переносе плазмиды pCB16 в природные бактерии *B. subtilis* 16, *B. licheniformis* FD9 и *B. vezelensis* 7IA3 трансконъюганты отбирали на минимальной среде Spizizen, не содержащей триптофан, с добавлением стрептоми-

цина в концентрации 25 мкг/мл (контрselectивные маркеры) и тетрациклина в концентрации 20 мкг/мл (селективный маркер) с последующим анализом отобранных клонов на наличие маркера эритромицинрезистентности, кодируемого плазмидой pBS72. Частоту переноса определяли отношением числа трансконъюгантов к количеству клеток реципиента. Присутствие в клетках трансконъюгантов плазмид дополнительно устанавливали с использованием ПЦР-анализа.

Для амплификации использовали HF ДНК-полимеразу производства “Thermo Scientific” (ЕС) и праймеры производства ОДО “Праймтех” (Беларусь). Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ, 0.3 мкмоль/л каждого праймера, 2.5 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер.

Для рестрикционного анализа использовали ферменты рестрикции при режимах, рекомендуемых фирмой изготовителем (“Thermo Scientific”, ЕС).

Для идентификации плазмиды pBS72 амплифицировали фрагмент размером 685 п.н. с использованием праймеров F2 (5'-ТАА АТС GCT ТСС СТС СТТ С-3') и R2 (5'-GTT ТСС АСТ GTC CAG GAG-3') при режиме амплификации: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 42 с (25 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл).

Для идентификации плазмиды pCB16 амплифицировали фрагмент размером 1861 п.н. с праймерами Fmob (5'-GCG СГА ТТG СТG ААТ ААА АГА ТАС-3') и Rmob (5'-САС ТТC ААC GСA ССТ ТТC АG-3') при режиме амплификации: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 1 мин 52 с (25 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл).

Для локализации регуляторных генов *rap* и *phr* амплифицировали фрагмент плазмиды pBS72 размером 3269 п.н. с праймерами Frap (5'-AGA GAA АТG GTT САА ТGС СAG-3') и Rrap (5'-ACG GTT АGГ АGА АСТ СGА С-3') при режиме амплификации: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 с, 52°C – 30 с, 72°C – 3 мин 20 с (25 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл) с последующим рестрикционным анализом ферментом рестрикции *SacI*, *Eco53k1*, *AfIII*.

Для локализации гена *rco* амплифицировали фрагмент плазмиды pBS72 размером 2428 п.н. с праймерами Frco (5'-ТТC ССТ ТТC СТС GTC АТC G-3') и Rrco (5'-TCG СТС АСТ АСG АСТ ТТТ АG-3') при режиме амплификации: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 с, 52°C – 30 с, 72°C – 2 мин 25 с (25 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл) с последующим рестрикционным анализом ферментом рестрикции *EcoRV*, *XhoII*, *NdeI*.

Для анализа генов и детерминируемых ими белков, входящих в состав плазмиды pBS72 (регистрационный номер в ГенБанке NCBI – KX711616) и плазмиды pLS20 (регистрационный номер в Ген-

Банке NCBI – AB615352), использовали программу BLASTN2.10.0 (сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Построение филогенетических деревьев полноразмерных аминокислотных последовательностей осуществляли методом ближайших соседей (1000 бутстрепов) в программе MEGA7 (Kumar, 2016).

Поиск гомологичных плазмиде рBS72 белков конъюгации осуществляли в базе данных NCBI с использованием программы psi-blast. Для сравнения использовали типовые аминокислотные последовательности белков плазмид pTiBo542 (MPF_T), R64 (MPF_I), R27 (MPF_F), ICEhin1056 (MPF_G), pCW3 (MPF_{FA}), pGO1 (MPF_{FATA}), pCC7120alpha (MPF_C) и транспозона CtnDOT (MPF_B). С помощью программы USEARCH (версия 11.0.667_i86linux32) для построения филогенетических деревьев использовали аминокислотные последовательности, отличающиеся между собой более чем на 50% (Edgar, 2010).

Аминокислотные последовательности гомологичных белков выравнивали с помощью программы Clustal Omega (сайт <https://www.ebi.ac.uk/Tools/common/tools/help/index.html?tool=clustalo>), для графического изображения которых использовали программу JalView.

Поиск функциональных доменов проводили с помощью программ TMHMM v2.0, MOTIF Search и Phyre2 сервера Hhpred и баз данных NCBI и Uni-prot.

Для сравнительного анализа структурных и регуляторных генов, определяющих белки конъюгации, использовали депонированные в ГенБанк NCBI нуклеотидные последовательности бактерий *B. subtilis* MB378 (MBPE01000006), *B. subtilis* MB415 (MQSR01000011), *B. subtilis* DH12 (NZ_RQRH01000007), *B. subtilis* EH11 (NZ_RPHE01000007), *B. subtilis* 18-3 (NZ_NJRE01000013), *B. subtilis* B4071 (NZ_JXHN01000026, NZ_JXHN01000027, NZ_JXHN01000031), *B. rugosus* SPB7 (NZ_JABUXO010000030), *B. licheniformis* YNP5-SUWRT508 (MEDD01000008), *B. licheniformis* YNP1-TSU (MIGE01000004), *B. paralicheniformis* G-1 (NZ_AZSK01000003, NZ_AZSK01000013), *Bacillus* sp. CX-120 (NZ_NCTZ01000020) и полные нуклеотидные последовательности плазмиды SX01705-1 бактерий *B. subtilis* (CP022288) и плазмиды 1 бактерий *B. licheniformis* (CP035229).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие полной нуклеотидной последовательности плазмиды рBS72 позволило провести сравнительный анализ генов и детерминируемых ими белков конъюгации с известными. Плазмида рBS72, размером 102254 п.н., является самым крупным внехромосомным генетическим эле-

ментом, выявленным в клетках бактерий *B. subtilis*. В состав ее генома входит 142 открытые рамки считывания, из которых 49 кодируют белки с определенными функциональными свойствами, остальные (93) определяют синтез гипотетических полипептидов. Около 30% плазмидного репликона представлено генами, предположительно определяющими белки конъюгации (*orf14–orf51*), среди которых выявленные белки VirB4 (*orf31*), VirB11 (*orf26*), Mob (*orf37*) и VirD4 (*orf24*) являются ключевыми и используются для характеристики и классификации систем конъюгации внехромосомных генетических элементов грамположительных и грамотрицательных бактерий (Guglielmini et al., 2014; Ramachandran, 2017).

На первом этапе осуществляли поиск рBS72-подобных плазмид на основании сходства белков VirB4, VirB11 и VirD4 с известными. В результате данные белки, идентичные на 98–100% таковым плазмиде рBS72, были выявлены у природных бактерий *B. subtilis*, выделенных из загрязненной нефтью почвы на территории Пакистана (штаммы MB378 и MB415), из луговой почвы в Нидерландах (штаммы EH11 и DH12), из кари супа в Нидерландах (штамм B4071), коммерческого штамма *B. subtilis*, используемого в качестве пробиотического препарата для животных в Китае (штамм 18-3), природных бактерий *B. rugosus*, изолированных из морской воды на территории Индии (штамм SPB7). Гомологи VirB4, VirB11 и VirD4, идентичные на 60–80% плазмиде рBS72, обнаружены у бактерий *Bacillus* sp., выделенных из компоста в Китае (штамм CX-120), *B. licheniformis*, изолированных из травы в парках США (штаммы YNP5-SUWRT508 и YNP1-TSU), *B. paralicheniformis*, выделенных из сухого молока в Австралии (штамм G-1), а также плазмиды SX01705-1 бактерий *B. subtilis*, изолированных из субстрата для выращивания грибов в Китае и плазмиды 1 бактерий *B. licheniformis*, выделенных из пищевого продукта в Южной Корее. Ранее для ряда вышеперечисленных геномов выявлены *rep*- и *mob*-гены, кодирующие, соответственно, белки инициации репликации и релаксазы, идентичные плазмиде рBS72 на 99–100 или 62% (Гуринович, 2020). Полученные данные однозначно свидетельствовали о присутствии в клетках внехромосомных генетических элементов. Следует отметить, что геномы всех вышеперечисленных бактерий депонированы в ГенБанк NCBI в виде отдельных контигов, анализ которых позволил установить, что некоторые из них можно представить в виде кольцевых молекул ДНК (фрагменты одной и той же рамки считывания присутствовали на 5'- и 3'-концах) и, следовательно, определить размер плазмидных репликонов. В частности, в клетках бактерий *B. subtilis* MB378 и *B. subtilis* MB415, выделенных на территории Пакистана, присутствовали плазмиды размером 88605 и 94937 п.н. соответственно, а в клетках

бактерий *B. subtilis* EH11 и *B. subtilis* DH12, выделенных на территории Нидерландов – плазмиды более крупного размера – 122937 и 117972 п.н. соответственно. Для остальных бактерий размер внехромосомных генетических элементов установить не представлялось возможным, поскольку их контиги не перекрывались. Среди обнаруженных плазмидсодержащих штаммов определенный интерес представляли бактерии *B. rugosus*, изолированные из морской воды на территории Индии, поскольку все детерминанты, кодирующие белки инициации репликации и конъюгации, были идентичны таковым плазмиде pBS72 на 100%.

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что бактерии рода *Bacillus*, содержащие pBS72-подобные плазмиды, широко распространены по всему миру (Беларусь, Нидерланды, Китай, Индия, Пакистан, Южная Корея, США, Австралия). При этом, наиболее сходные плазмиде pBS72 репликоны выявлены в клетках *B. subtilis* (исключение составил штамм, идентифицированный как *B. rugosus*). Данный факт является весьма примечательным и обосновывает детальный анализ систем конъюгации данных внехромосомных генетических элементов.

Как указывалось выше, консервативные белки VirB4, MOB и VirD4 являются маркерными и используются для классификации конъюгативных плазмид. Ранее был проведен анализ функциональных доменов релаксазы плазмиды pBS72 и установлено, что они имеют наибольшее сходство с таковыми плазмиды pLS20 группы MOB_L, но полная аминокислотная последовательность белка достоверно отличалась от релаксазы pLS20 (сходство составляло 34.93%) и представлена отдельной филогенетической группой (Гуринович, 2020).

В ходе настоящей работы был проведен сравнительный молекулярно-генетический и филогенетический анализ белков VirB4, VirB11, VirD4, VirB6 плазмиды pBS72. Предполагали, что детальный анализ достаточно большой выборки белковых молекул позволит более точно охарактеризовать систему конъюгации плазмид, подобных pBS72, и определить их место в существующей системе классификации.

Анализ белка VirB4 (*orf31*) плазмиды pBS72 позволил выявить в N- и C-концевой части молекулы консервативные аминокислотные последовательности, определяющие характерную для данных белков АТФ-азную активность (Walker A и Walker B, Мотив D и E). В то же время отсутствовали характерные для данного типа белков трансмембранные домены, что могло свидетельствовать о неспособности белка VirB4 плазмиды pBS72 непосредственно взаимодействовать с белками, входящими в состав секреторного канала, через который передается одонитевая молекула ДНК

(Sgro, 2019). Возможно, подобно некоторым другим системам конъюгации данный белок обеспечивал связывание с внутренней мембраной посредством взаимодействий с другими компонентами системы секреции IV-типа (Green, 2016). Сравнительный анализ функциональных доменов белков VirB4 с АТФ-азной активностью, кодируемых конъюгативными плазмидами разных систематических групп, позволил установить, что они характеризуются полиморфностью и содержат ряд несинонимических замен (рис. 1).

Филогенетический анализ белков VirB4 позволил установить, что наиболее сходные полипептиды кодируются плазмидой pLS20. Однако, несмотря на 95% покрытие, данные белки достоверно отличались друг от друга (сходство составляло 35.32%) и входили в разные филогенетические группы. Филогенетически близкими данным полипептидам являлись белки VirB4 конъюгативных плазмид семейства MPF_{FATA}, присутствующих в клетках, удаленных в таксономическом отношении микроорганизмов (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Tenericutes* и *Archaea*) (рис. 2).

Особый интерес представлял белок VirB11 плазмиды pBS72, кодируемый *orf26*, являющийся достаточно уникальным и характерным для 20% известных Mpf-систем. Только внехромосомные генетические элементы семейств MPF_T (Ti-плазида) и MPF_I (плазида R64) детерминировали синтез данных полипептидов. Он не обнаружен в системах секреции IV-типа, кодируемых F-плазмидой *E. coli* и плазмидами грамположительных бактерий и архей (Christie, 2017). Белки VirB11 являются членами AAA-суперсемейства АТФ-аз. Локализуясь в цитоплазме клеток, они способны временно взаимодействовать с белками секреции в ответ на связывание субстрата или другой сигнал (Sexton, 2004). Анализ аминокислотной последовательности белка VirB11 плазмиды pBS72 выявил наличие консервативных доменов с АТФ-азной активностью (Walker A, Walker B), а также Asp- и His-доменов, определяющих связывание молекул ДНК (Sagulenko, 2001). Кроме плазмиды Ti и RP4, гомологичный белок VirB11 с неполным покрытием (74%) и сходством, не превышающим 36%, характерен для плазмиды pLS20 (код доступа BAJ76915.1 в ГенБанке NCBI). Сравнительный анализ функциональных доменов белков VirB11 плазмиды pBS72 и pLS20 выявил наличие несинонимических замен во всех функционально значимых участках. При этом наиболее консервативным являлся His-домен, в котором выявлялись только функционально незначимые аминокислотные замены. Все остальные домены содержали значимые для функциональной активности изменения. Наиболее выраженным полиморфизмом характеризовались междоменные локусы (рис. 3). Филогенетический анализ позволил установить,

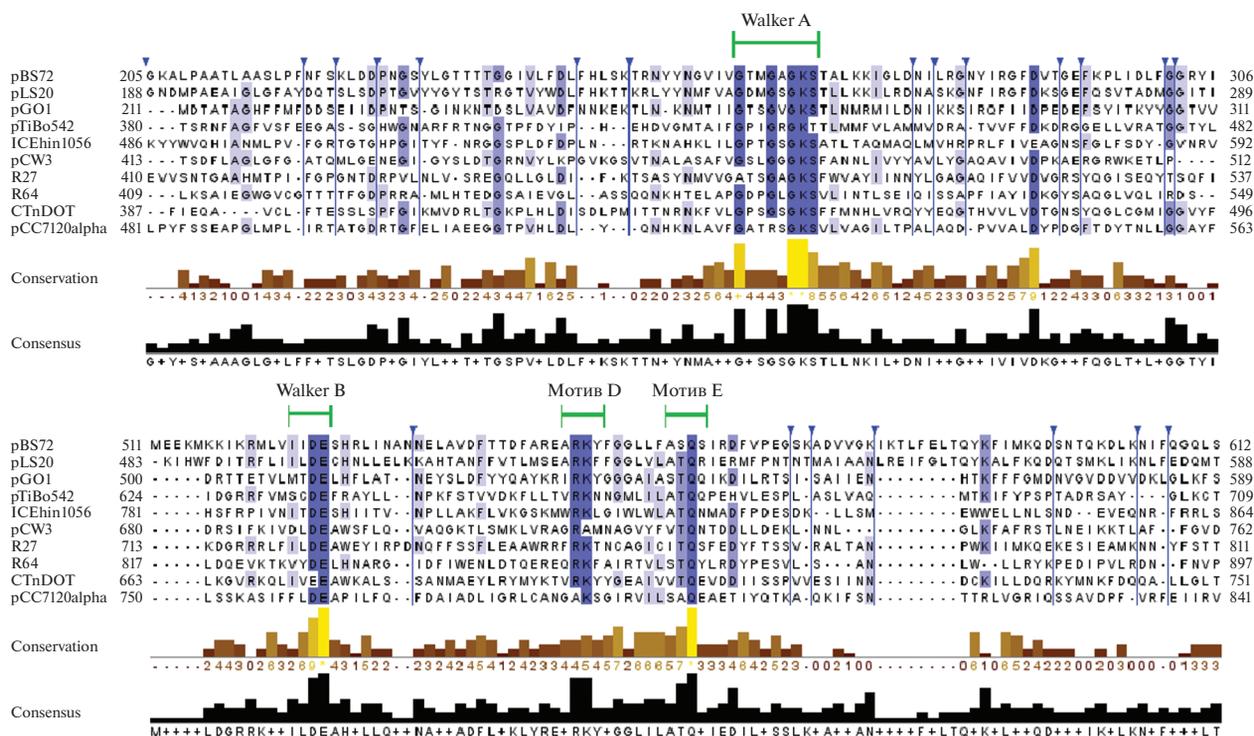


Рис. 1. Сравнительный анализ функциональных доменов белков VirB4 плазмиды pBS72 и pLS20 с известными представителями классификационных групп MPFT (плазмида pTiBo542), MPFI (плазмида R64), MPFF (плазмида R27), MPFG (плазмида ICEhin1056 MPFFATA), MPFFA (плазмида pCW3), MPFFATA (плазмида pGO1), MPFFATA (плазмида pCC7120alpha), MPFB (транспозон CtnDOT). Стрелками на рисунке обозначены отсутствующие локусы с множественными делециями. Цветом выделены идентичные и консервативные аминокислоты.

что белок VirB11, кодируемый плазмидой pBS72, представлен отдельной филогенетической группой, достоверно отличающейся от гомологичных белков, кодируемых плазмидой pLS20 и внехромосомными генетическими элементами семейств MPFT и MPFI (рис. 4).

Анализ белка VirD4 (*orf24*) обнаружил типичное строение, характерное для белков T4CP. В N-концевой последовательности данного белка локализовались два трансмембранных домена (NTD) из 34 аминокислот, способных формировать периплазматическую петлю, обеспечивающую взаимодействие с секреторными белками. Центральная часть белка включала нуклеотид-связывающий домен (NBD) и мотивы Walker A и Walker B, обладающие АТФ-азной активностью. С-концевая последовательность белка содержала нуклеотид-связывающий домен (NBD) и варибельный альфа-домен (AAD), обеспечивающий связывание субстратов (Li, 2018) (рис. 5). Анализ белка VirD4 плазмиды pBS72 позволил установить, что наибольшее сходство в области функционально значимых участков данный белок проявлял с гомологичным полипептидом плазмиды pLS20. Однако их полные аминокислотные последовательности достоверно отличались друг от друга (покрытие составило 79%, сходство не превышало 33.89%) и вхо-

дили в разные филогенетические группы. Следует отметить, что белки VirD4 плазмид pBS72 и pLS20 имели наибольшее филогенетическое сходство с гомологичными белками плазмид семейств MPFT и MPFFATA (рис. 6).

Таким образом, сравнительный анализ консервативных белков конъюгации VirB4 и VirD4, кодируемых плазмидой pBS72, позволил установить, что они наиболее сходны с плазмидой pLS20 и внехромосомными генетическими элементами классификационной группы MPFFATA или MPFI и MPFT соответственно. В то же время гомологичный белок VirB11 имел наибольшее сходство только с плазмидами, подобными pLS20 (рис. 3). В связи с этим, анализ других белков проводили в сравнении с таковыми плазмиды pLS20. Для этого анализировали белки, связанные с поверхностными структурами, которые, как известно, являются крайне специфическими, и наличие сходства между ними может однозначно свидетельствовать в пользу филогенетического родства.

Поиск белков, образующих секреторный канал, позволил обнаружить полипептид, кодируемый открытой рамкой считывания *orf28* плазмиды pBS72, способный выполнять данные функции. В пределах N-концевой последовательности этого

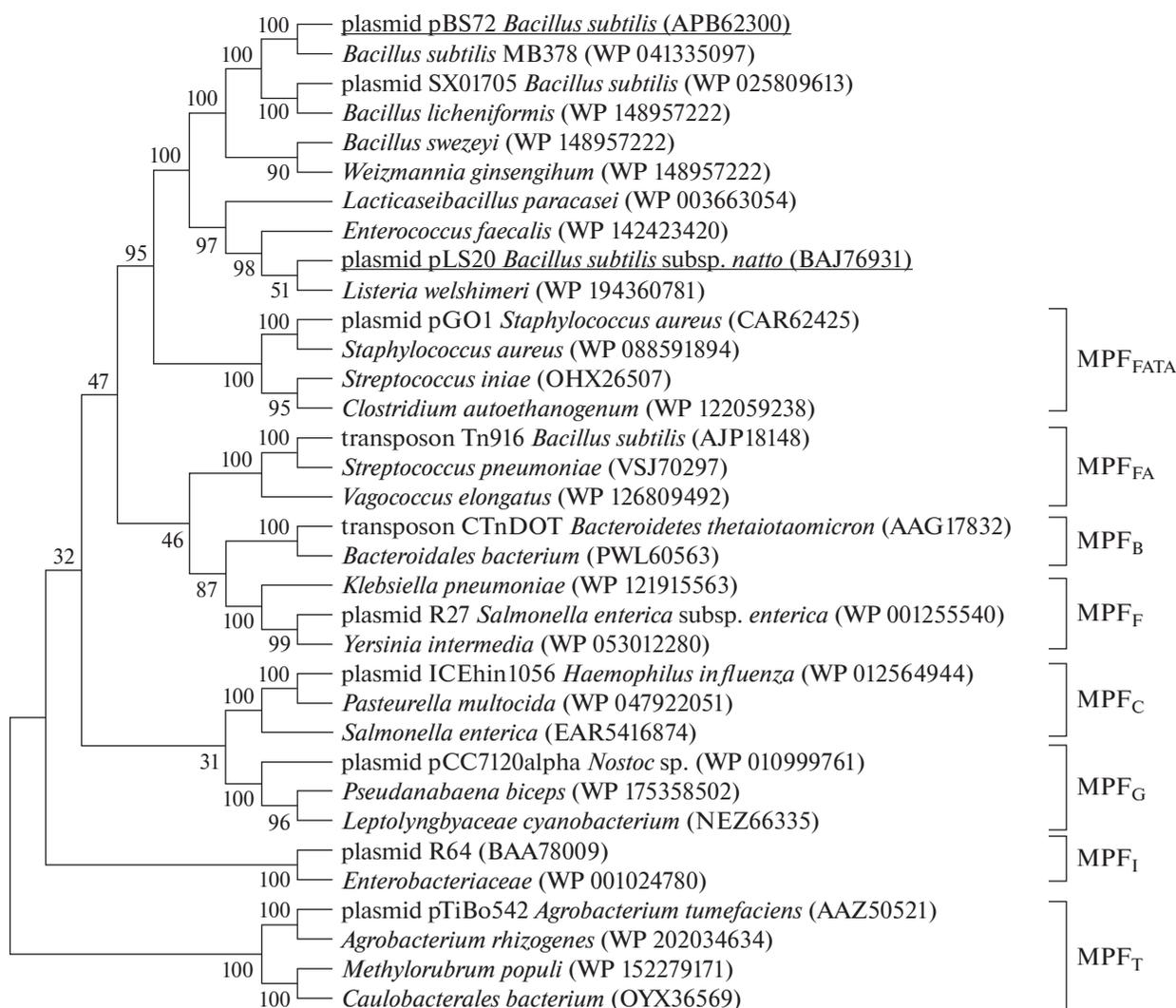


Рис. 2. Филогенетическое дерево белков VirB4 (для плазмид pBS72 и pLS20 выделены подчеркиванием).

достаточно крупного белка было выявлено 7 транс-мембранных доменов, характерных для белка VirB6 системы секреции IV типа. Гомологичный белок, имеющий сходные функционально значимые аминокислотные последовательности (шесть транс-мембранных доменов), выявлен для плазмиды pLS20 (*orf28*). При этом данные белки в значительной степени отличались друг от друга (покрытие составило 43%, сходство не превышало 30.28%), и сходство обнаруживалось только в области транс-мембранных доменов.

Для плазмиды pLS20 было показано, что ген *orf11* детерминирует белок адгезии (Adg), обеспечивающий контакт между донорскими и реципиентными клетками (Gago-Córdoba, 2021). Поиск гомологичного белка для плазмиды pBS72 позволил установить, что полипептид, обладающий сходными свойствами, кодируется открытой рамкой считывания *orf14*. В N-концевой части данного белка был вы-

явлен трансмембранный домен (между 12 и 29 аминокислотой) и сигнальная последовательность, содержащая между 37 и 38 аминокислотными остатками сайт VEA-AS, способный расщепляться пептидазой 1. Наличие данных последовательностей свидетельствовало о выведении данного белка за пределы клетки (Sec-зависимый путь секреции). Однако функционально значимые аминокислотные последовательности, характерные для поверхностных белков адгезии, имели крайне низкое сходство с таковыми плазмиды pLS20. Сходство MucBP-, Spa- и LPXTG-доменов составило 33, 20 и 28% соответственно.

Таким образом, на основании филогенетического и сравнительного анализа функциональных доменов белков VirB4, VirB11, VirB6, VirD4 и Adg с белками внехромосомных генетических элементов известных классификационных групп можно утверждать, что система конъюгации плазмид,

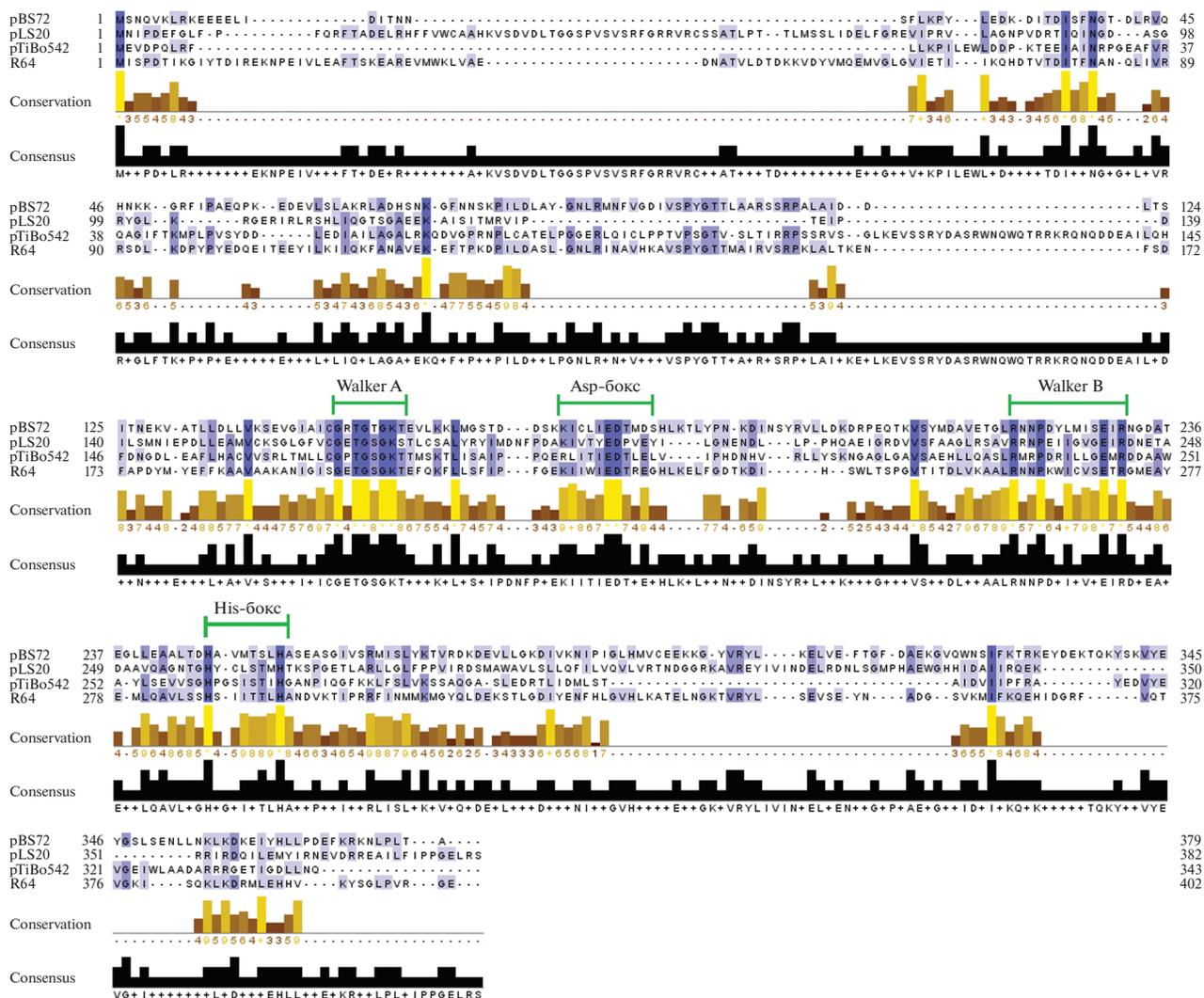


Рис. 3. Сравнительный анализ функциональных доменов белков VirB11 плазмид рBS72, рLS20 и представителей семейств MPFT и MPFI, MPFI. Цветом выделены идентичные и консервативные аминокислоты.

подобных рBS72, наиболее близка по организации плазмиде рLS20. Однако присутствие несинонимических замен в функционально значимых последовательностях и практически отсутствие сходства между полными аминокислотными последовательностями исследуемых белков, приводящих к достоверным филогенетическим отличиям, позволяют считать, что конъюгационная система плазмиды рBS72 относится к отдельной систематической группе (обозначена как Mpf_S). Отличительной особенностью конъюгационной системы плазмид, подобных рBS72, является ее сходство с таковыми плазмид бактерий группы Firmicutes (подобных рLS20 и Mpf_{FATA}), что представляется весьма логичным и может свидетельствовать об их едином происхождении. Наличие значимых изменений в белках конъюгации, свидетельствует о процессах дивергенции, которые

могли быть обусловлены, в том числе, особенностями их копирования в бактериальных клетках. Следует отметить, что плазмиды рLS20 и рBS72 имеют разные системы инициации репликации (Titok et al., 2003).

Ранее было установлено, что плаزمида р19, содержащая абсолютно идентичную плазмиде рBS72 систему конъюгации (регистрационный номер в ГенБанке NCBI FJ434456), передавалась в жидкой среде LB с частотой 10⁻³ в бактерии *B. subtilis* 168 и с такой же частотой обеспечивала мобилизационный перенос плазмиды рUB110, содержащей релаксазу mobV-типа. При этом частота переноса плазмиды р19 увеличивалась на два порядка при отсутствии в клетках реципиента системы рестрикции–модификации. В то же время частота мобилизации плазмиды рUB110 сохранялась на прежнем уровне (10⁻³). Однако в изогенной системе

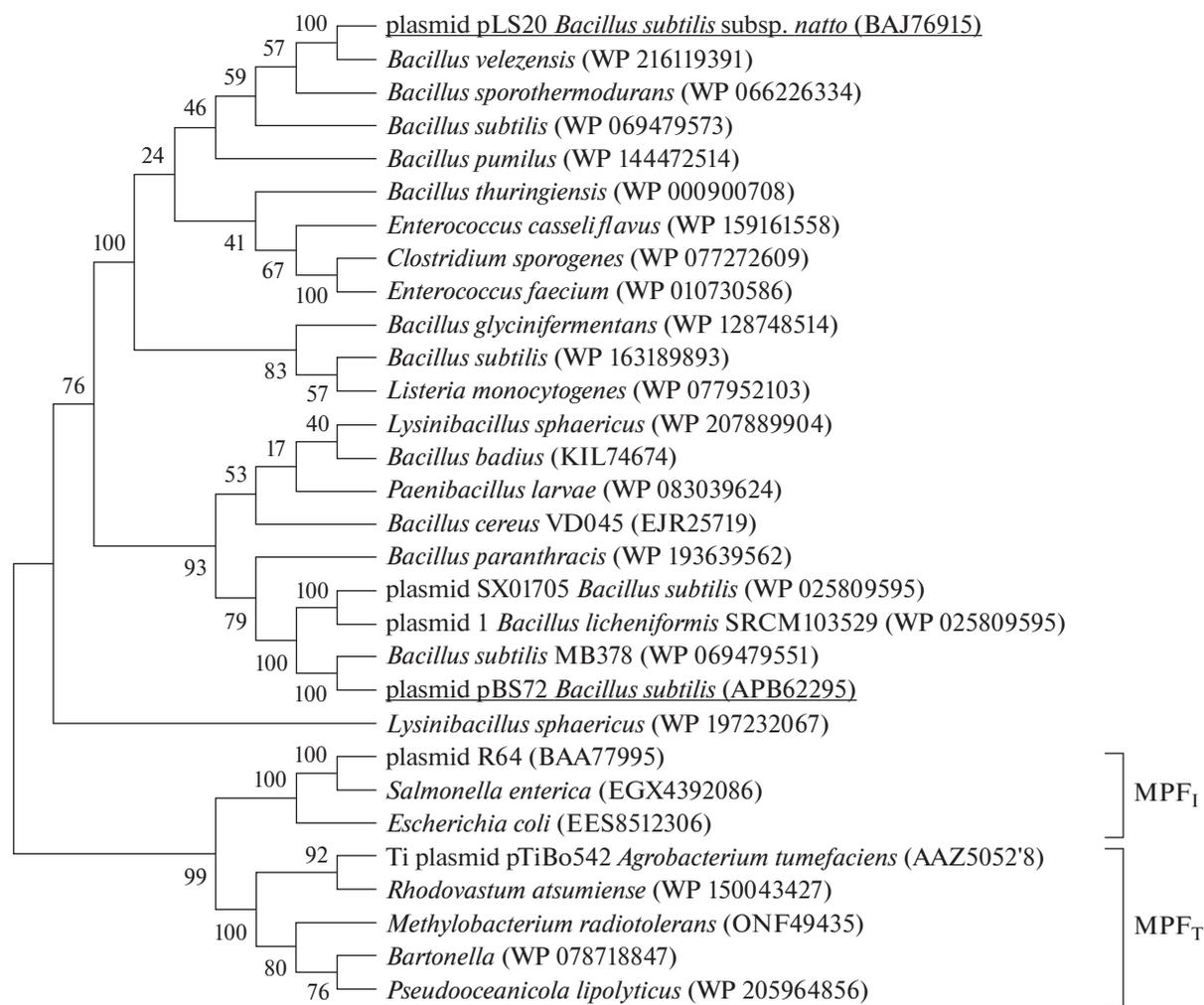


Рис. 4. Филогенетическое дерево белков VirB11 (для плазмид pBS72 и pLS20 выделены подчеркиванием).

скрещивания (между природным плазмидсодержащим штаммом и его бесплазмидным вариантом) частота переноса плазмиды p19 возросла до 10^{-1} , а частота мобилизации плазмиды pUB110 по-прежнему сохранялась на уровне 10^{-3} . Во всех скрещиваниях максимальную частоту фиксировали через 3 ч, когда скрещиваемые бактерии находились в логарифмической фазе роста (Poluektova, 2004). Несколько иная картина наблюдалась при изучении кинетики переноса плазмиды pLS20. В изогенной системе скрещивания (между *B. subtilis natto*) она передавалась с максимальной частотой 10^{-3} – 10^{-4} в узком временном диапазоне. После 3 ч скрещивания в жидкой среде LB частота переноса плазмиды pLS20 снижалась до значений 10^{-7} – 10^{-8} и возрастала до 10^{-2} в отсутствие белков репрессоров Rco и Phg, а также при увеличенной экспрессии белка Rap (Singh, 2013). На основании функционального анализа генов *rap*, *phr* и *rco* была предложена модель регуляции конъюгации плазмиды pLS20 (Meijer, 2021). Согласно данной мо-

дели, конъюгационный перенос плазмиды pLS20 негативно регулировался продуктом гена *rco*. Репрессия снималась белком Rap путем его взаимодействия с белком Rco. Однако через 3 ч скрещивания в результате увеличения концентрации белка Phg происходила инактивация позитивного регулятора Rap и, как следствие, частота конъюгационного переноса снижалась до предельно низких значений 10^{-7} – 10^{-8} . Приведенные данные могут свидетельствовать в пользу разной функциональной активности систем конъюгации плазмид pLS20 и pBS72. Для проверки этого предположения был проведен сравнительный анализ регуляторных белков, кодируемых генами *rco*, *rap* и *phr*, а также определены частоты переноса плазмиды pBS72 и ее способность мобилизовать перенос плазмиды pBC16 в средах разного состава в зависимости от времени.

В результате было установлено, что в геноме плазмид pLS20 и pBS72 регуляторные гены *rco*, *rap* и *phr* имеют разную локализацию. Все эти регуля-

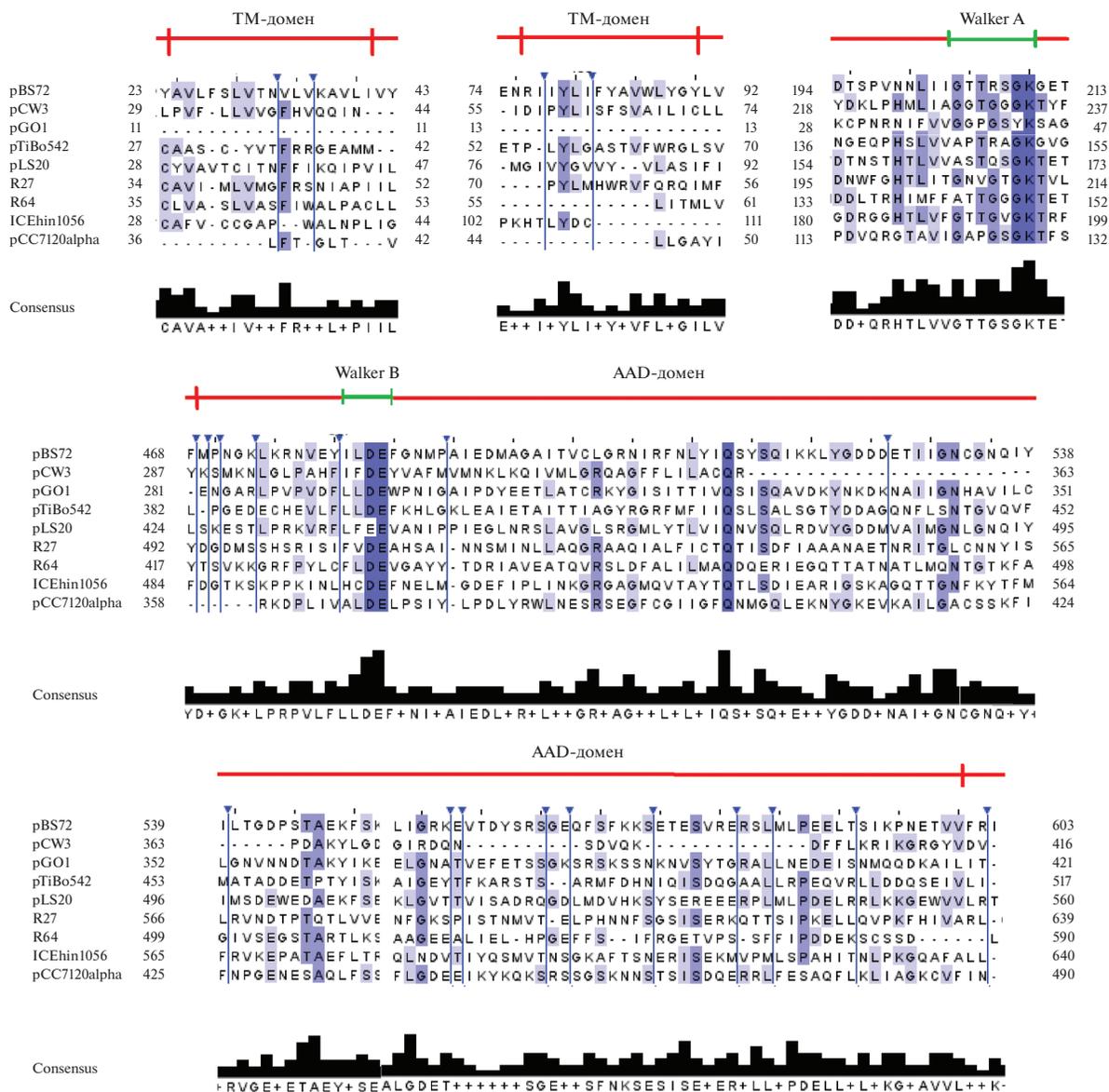


Рис. 5. Сравнительный анализ функциональных доменов белков VirD4 системы секреции IV типа плазмид разных систематических групп. Стрелками на рисунке обозначены отсутствующие локусы с множественными делециями. Цветом выделены идентичные и консервативные аминокислоты.

торные детерминанты в плазмиде pLS20 локализованы в непосредственной близости от *tra*-оперона. В частности, промотор негативного регулятора *rco* перекрывался с промотором первого гена системы *tra*, а противоположно ему транскрибируемые с одного промотора гены *rap* и *phr* локализовались непосредственно выше по течению. В плазмиде pBS72 данные детерминанты присутствовали в разных частях генома. При этом гомология между регуляторными белками плазмид pLS20 и pBS72 составила 40.21% для белка Rco (покрытие 86%) и 24.41% для белка Rap (покрытие 98%), а сходство между белками Phg отсутствовало. Для подтверждения локализации регуляторных генов и исклю-

чения ошибки при сборке полной нуклеотидной последовательности плазмиды pBS72 с использованием полимеразной цепной реакции были амплифицированы фрагменты плазмиды pBS72, в пределах которых находились гены *rap* (*orf130*), *phr* (*orf132*) и *rco* (*orf3*). В результате были получены ампликоны искомого размера, рестрикционный анализ которых позволил подтвердить локализацию исследуемых локусов, соответствующую аннотированной нуклеотидной последовательности, депонированной в ГенБанк NCBI. Дополнительным доказательством выявленных отличий являлась одинаковая локализация регуляторных генов *rap*, *phr* и *rco* в составе pBS72-подобных плазмид бак-

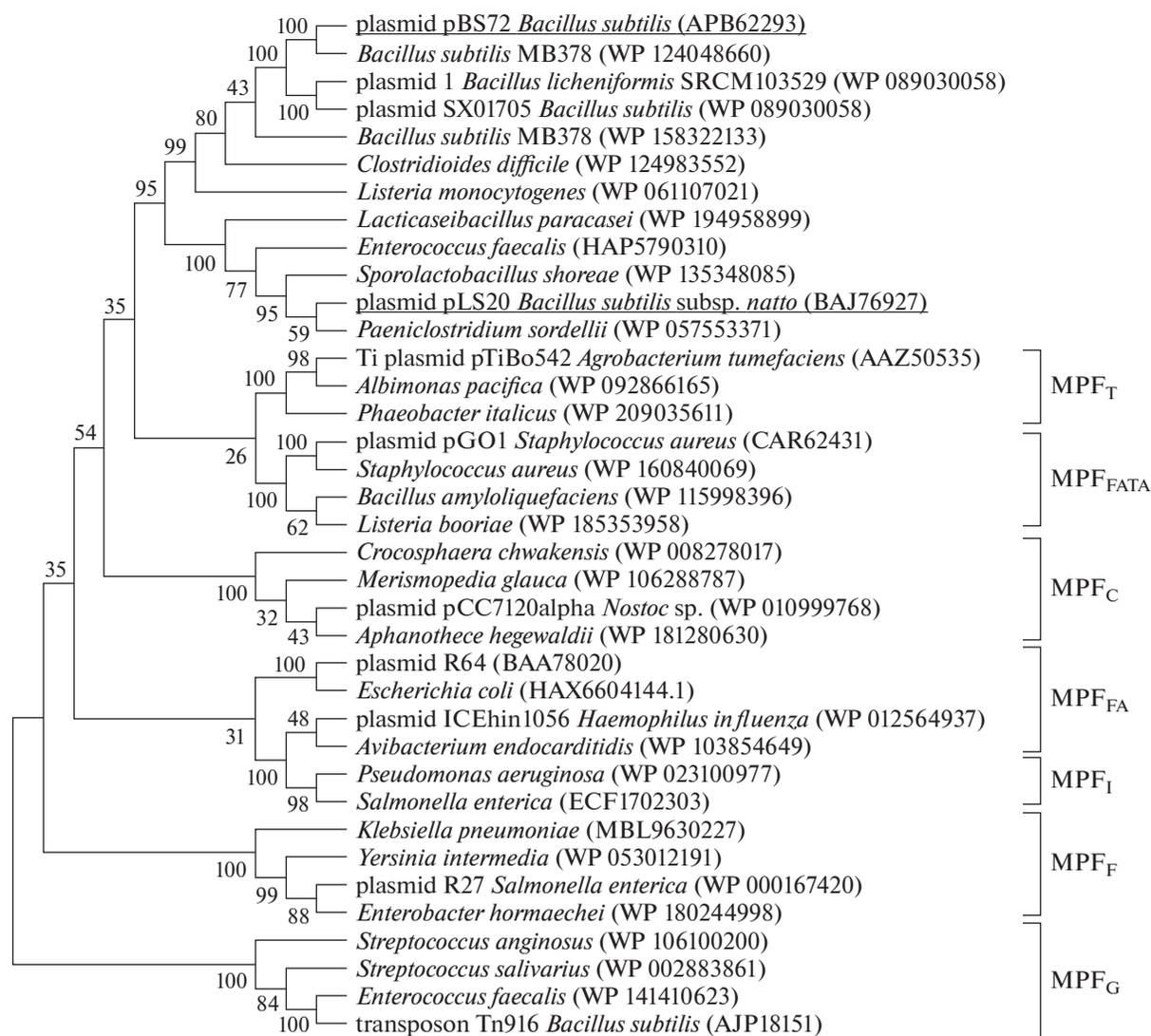


Рис. 6. Филогенетическое дерево белков VirD4 (белок VirD4 плазмиды pBS72 и плазмиды pLS20 выделены подчеркиванием).

терий *B. subtilis* MB378, MB415, EH11, DH12 и *B. rugosus* SPB7, а также плазмиды SX01705-1 бактерий *B. subtilis* и плазмиды 1 бактерий *B. licheniformis* (рис. 7). Следует отметить, что в составе плазмиды pBS72 между регуляторными генами *rap*, *phr* и генами *tra*, помимо дополнительных открытых рамок считывания, выявлено 14 повторов СТАС (размером 46 п.н.), расположенных в межгенной области между генами *orf136* и *orf137*. Такие же повторы присутствовали в составе pBS72-подобных плазмид. Наличие повторяющихся последовательностей является примечательным фактом, который требует дальнейшего изучения.

Поскольку разное расположение регуляторных генов в составе плазмид pLS20 и pBS72 не может являться прямым доказательством разной функциональной активности их систем конъюгации, была изучена кинетика конъюгационного и

мобилизационного переноса, детерминированного плазмидой pBS72. При этом ставилась задача определить способность pBS72 передаваться в бактерии *B. subtilis* 168 и обеспечивать перенос плазмиды pBC16 в бактерии рода *Bacillus* при разных условиях (плотная полноценная и минимальная среды или жидкая полноценная и минимальная среды) в зависимости от продолжительности скрещивания (3 и 24 ч соответственно). Предполагали, что в случае функционального сходства систем конъюгации плазмид pBS72 и pLS20, частота конъюгационного переноса должна снижаться при увеличении времени скрещивания вне зависимости от состава среды. При этом наибольшее снижение частоты переноса ожидали при достижении донорными и реципиентными бактериями стационарной фазы роста (через 24 ч скрещивания в жидкой среде или через 3–24 ч скрещивания на

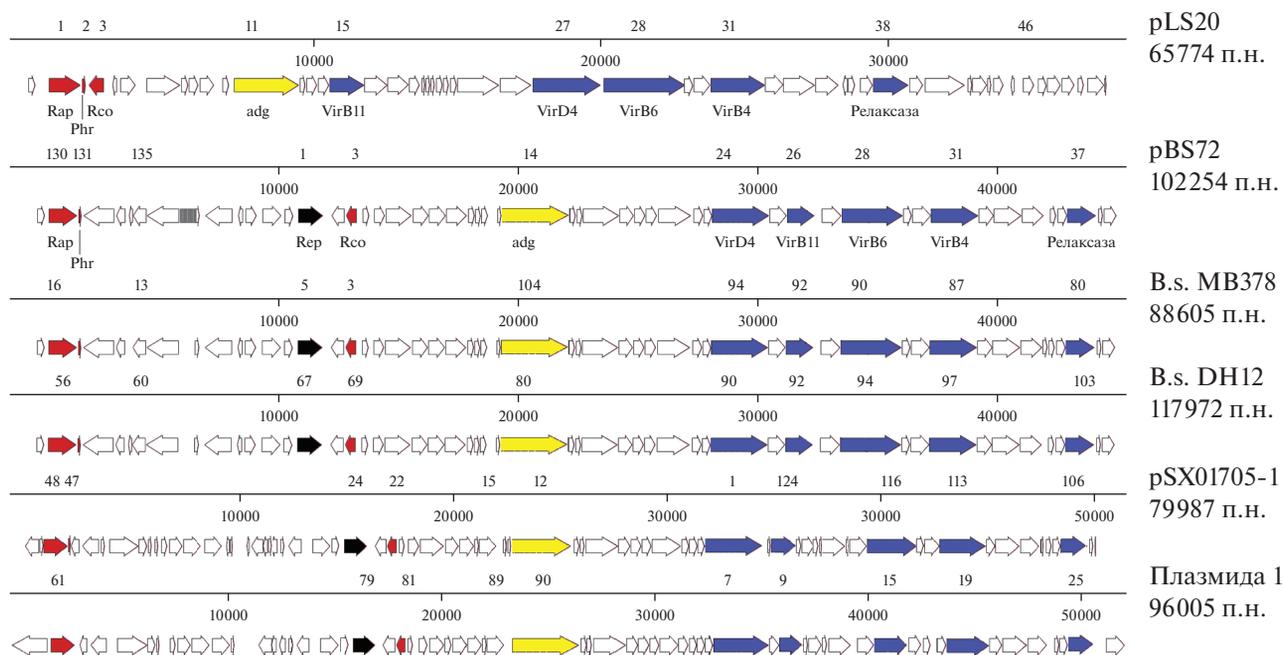


Рис. 7. Схема генетической организации локусов, содержащих гены, определяющие белки регуляции конъюгации Rco, Rap, Phr (выделены красным цветом), конъюгационного переноса VirB4, VirB11, VirB6, VirD4, релаксазы (выделены синим цветом), адгезии (выделены желтым цветом) и инициации репликации Rep (выделены черным цветом). Номерами обозначены открытые рамки считывания.

плотной среде). Предполагали, что при таких условиях в клетках донора должны накапливаться регуляторные белки, ключевым из которых, согласно предложенной модели регуляции конъюгации плазмиды pLS20, являлся белок Phr, увеличение концентрации которого приводило к ингибированию конъюгационного переноса (Singh, 2013; Meijer, 2021).

В результате проведенных скрещиваний было установлено, что частота переноса исходной плазмиды pBS72 в клетки бактерий *B. subtilis* 168 в жидкой и на плотной среде LB через 24 ч снижалась в 100 раз (через 3 ч, соответственно, составляла 2.6×10^{-3} и 3.5×10^{-4} , а через 24 ч – 2.6×10^{-5} и

6.3×10^{-6}). Однако при скрещивании в жидкой и на плотной минимальной среде Spizizen частота переноса pBS72 через 24 ч увеличивалась в 5–10 раз (через 3 ч, соответственно, составляла 2.0×10^{-6} и 6.88×10^{-5} , а через 24 ч – 2.1×10^{-5} и 1.7×10^{-4}) (табл. 1). Полученные данные свидетельствовали в пользу того, что частота переноса в большей степени зависела не от времени скрещивания, а от состава среды.

Для анализа частоты мобилизационного переноса в качестве донора использовали штамм *B. subtilis* 168, содержащий, соответственно, конъюгативную и мобилизуемую плазмиды pBS72 и pBC16. В качестве реципиентов использовали природные

Таблица 1. Частота переноса плазмиды pBS72 в клетки бактерий *B. subtilis* 168 при разных условиях скрещивания

Донор	Условия скрещивания		Частота переноса плазмиды pBS72	
	среда	время скрещивания, ч	в жидкой среде	на плотной среде
<i>B. subtilis</i> 72	Spizizen	3	1.8×10^{-5}	9.8×10^{-5}
		24	2.1×10^{-5}	1.7×10^{-4}
	LB	3	2.6×10^{-3}	3.5×10^{-4}
		24	2.6×10^{-5}	6.3×10^{-6}

Примечание. В конъюгационных скрещиваниях в качестве донора использовали природный штамм *B. subtilis*, содержащий конъюгативную плазмиду pBS72, маркированную геном эритромицинрезистентности; частота переноса определялась относительно количества клеток реципиента.

Таблица 2. Частота мобилизационного переноса плазмиды pBC16 в клетки бактерий *B. subtilis* d16, *B. velezensis* 713A и *B. licheniformes* FD9 при разных условиях скрещивания

Штамм реципиент	Условия скрещивания		Частота переноса плазмиды pBC16	
	среда	время скрещивания, ч	в жидкой среде	на плотной среде
<i>B. subtilis</i> d16	Spizizen	3	5.0×10^{-7}	0
		24	9.9×10^{-7}	7.5×10^{-6}
	LB	3	6.3×10^{-6}	1.8×10^{-7}
		24	6.1×10^{-6}	4.0×10^{-6}
<i>B. licheniformes</i> FD9	Spizizen	3	9.6×10^{-6}	1.3×10^{-6}
		24	2.4×10^{-6}	1.2×10^{-4}
	LB	3	1.1×10^{-4}	6.8×10^{-5}
		24	2.5×10^{-4}	2.6×10^{-3}
<i>B. velezensis</i> 713A	Spizizen	3	5.5×10^{-7}	0
		24	2.5×10^{-6}	2.9×10^{-5}
	LB	3	4.2×10^{-6}	0
		24	4.7×10^{-4}	1.8×10^{-4}

Примечание. В конъюгационных скрещиваниях в качестве донора использовали типовой штамм *B. subtilis* 168, содержащий конъюгативную плазмиду pBS72 и мобилизуемую плазмиду pBC16; частота переноса определялась относительно количества клеток реципиента. Трансконъюганты, отобранные на среде, содержащей тетрациклин, дополнительно проверялись на присутствие мобилизующей плазмиды pBS72 и мобилизуемой плазмиды pBC16. В результате установлено, что все они содержали плазмиду pBC16 (в реакции ПЦР с использованием специфических праймеров, обеспечивающих амплификацию гена *mob*, регистрировали образование ампликона искомого размера 1861 п.н.) и не содержали плазмиду pBS72 (чувствительны к эритромицину, в реакции ПЦР не регистрировали образование специфических продуктов амплификации размером 685 п.н. при использовании праймеров, комплементарно связывающихся в области плазмиды pBS72 между генами *orf138* и *orf139*).

бактерии рода *Bacillus*, активно синтезирующие антимикробные и поверхностно-активные соединения (*B. subtilis* 16, *B. licheniformis* FD9, *B. amyloliquefaciens* 71A3). Частоту переноса плазмиды pBC16 определяли при разных условиях и продолжительности скрещивания. В результате было установлено, что при увеличении времени скрещивания в жидкой среде LB и Spizizen частота переноса плазмиды pBC16 через 24 ч скрещивания либо не менялась, либо возрастала в 10–100 раз. При скрещивании на плотной среде, вне зависимости от ее состава, перенос плазмиды pBC16 через 3 ч либо не регистрировался, либо происходил с гораздо более низкой частотой (частота переноса через 24 ч увеличивалась в 10–100 раз) (табл. 2). На основании полученных данных можно заключить, что частота мобилизационного переноса плазмиды pBC16 зависела от условий скрещивания (плотность и состав среды) и видовой принадлежности бактерий реципиентов.

На основании приведенных данных можно утверждать, что генетическая организация и функциональная активность системы конъюгации плазмиды pBS72 является уникальной для грамположи-

тельных бактерий. Подтверждением этому являются результаты, полученные для pBS72-подобной плазмиды p19, которая в изогенной системе скрещивания передавалась с частотой 10^{-1} (Poluektova, 2004). Только для плазмид с дерепрессированной системой конъюгации (например, F-плазида) характерна такая высокая частота переноса.

Таким образом, в результате проведенного анализа было установлено, что генетическая организация и функциональная активность системы конъюгационного переноса плазмиды pBS72 является уникальной. Несмотря на сходство с ключевыми структурными и регуляторными белками конъюгации плазмиды pLS20 в области функционально значимых доменов, она характеризовалась рядом отличий. Во-первых, сходство ключевых белков конъюгации ограничивалось областью функциональных доменов, в остальном белки имели значительные отличия (гомология не превышала 40%). Во-вторых, гены, детерминирующие предположительно регуляторные белки (Rco, Rap, Phr), имели разную локализацию в плазмиде pLS20 и pBS72 (соответственно, находились в непосредственной близости от *tra*-оперона, либо в разных локусах генома). В-третьих, у плазмид pBS72 и

pLS20 отсутствовало сходство между регуляторными белками Phr. И, наконец, в отличие от плазмиды pLS20 функциональная активность конъюгационной системы плазмиды pBS72 не зависела напрямую от времени скрещивания, а определялась составом среды и генетическими особенностями бактерий реципиентов. Проведенный анализ позволяет отнести систему конъюгации плазмиды pBS72 к новому семейству (обозначено как Mpf_S) и является основой для изучения механизма распространения pBS72-подобных плазмид в природной среде обитания и создания на их основе системы генетического анализа биотехнологически значимых бактерий рода *Bacillus*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б21-142).

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

- Гуринович А.С., Титок М.А. Молекулярно-генетический и функциональный анализ плазмиды pBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 646–657.
- Gurinovich A.S., Titok M.A. Molecular genetic and functional analysis of the pBS72 plasmid from *Bacillus subtilis* environmental isolates // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 660–669.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Пер. с англ.: Зограф Ю.Н. и др.. Под ред. и с предисл. Алиханяна С.И. М.: Мир, 1976. 436 с.
- Alvarez-Rodriguez I., Arana L., Ugarte-Urbe B., Gomez-Rubio E., Martin-Santamaria S., Garbisu C., Alkorta I. Type IV coupling proteins as potential targets to control the dissemination of antibiotic resistance // Front. Mol. Biosci. 2020. V. 7. P. 201. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00201>
- Anagnostopoulos C., Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1961. V. 81. P. 741–746.
- Bernhard K., Schrempf H., Goebel W. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1978. V. 133. P. 897–903.
- Cascales E., Christie P.J. The versatile bacterial type IV secretion systems // Nat. Rev. Microbiol. 2003. V. 1. P. 137–149.
- Christie P.J., Gomez V.L., Buchrieser C. Biological diversity and evolution of type IV secretion systems // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2017. V. 413. P. 1–30.
- Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010. V. 74. P. 417–433.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinform. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Gago-Cordoba C., Val-Calvo J., Abia D., Diaz-Talavera A., Miguel-Arribas A., Aguilar Suarez R., van Dijk J.M., Wu L.J., Meijer W.J.J. A conserved class II type thioester domain-containing adhesin is required for efficient conjugation in *Bacillus subtilis* // mBio. 2021. V. 12. e00104-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00104-21>
- Green E.R., Mecsas J. Bacterial secretion systems: an overview // Microbiol. Spectr. 2016. V. 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
- Grohmann E., Keller W., Muth G. Mechanisms of conjugative transfer and Type IV secretion-mediated effector transport in gram-positive bacteria // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2017. V. 413. P. 115–141.
- Grohmann E., Muth G., Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 277–301.
- Guglielmini J., Neron B., Abby S.S., Garcillan-Barcia M.P., de la Cruz F., Rocha E.P. Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. 5715–5727.
- Harwood C.R., Mouillon J.M., Pohl S., Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. P. 721–738.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. EV. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Li Y.G., Christie P.J. The *Agrobacterium* VirB/VirD4 T4SS: mechanism and architecture defined through *in vivo* mutagenesis and chimeric systems // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2018. V. 418. P. 233–260.
- Meijer W.J., de Boer A.J., van Tongeren S., Venema G., Bron S. Characterization of the replication region of the *Bacillus subtilis* plasmid pLS20: a novel type of replicon // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. P. 3214–3223.
- Meijer W.J.J., Boer D.R., Ares S., Alfonso C., Rojo F., Luque-Ortega J.R., Wu L.J. Multiple layered control of the conjugation process of the *Bacillus subtilis* plasmid pLS20 // Front. Mol. Biosci. 2021. V. 8. P. 648468. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.648468>
- Poluektova E.U., Fedorina E.A., Lotareva O.V., Prozorov A.A. Plasmid transfer in bacilli by a self-transmissible plasmid p19 from a *Bacillus subtilis* soil strain // Plasmid. 2004. V. 52. P. 212–217.
- Ramachandran G., Miguel-Arribas A., Abia D., Singh P.K., Crespo I., Gago-Córdoba C., Hao J.A., Luque-Ortega J.R., Alfonso C., Wu L.J., Boer D.R., Meijer W.J. Discovery of a new family of relaxases in *Firmicutes* bacteria // PLoS Genet. 2017. V. 13. e10065.
- Sagulenko E., Sagulenko V., Chen J., Christie P.J. Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 5813–5825.

Sexton J.A., Pinkner J.S., Roth R., Heuser J.E., Hultgren S.J., Vogel J.P. The *Legionella pneumophila* PilT homologue DotB exhibits ATPase activity that is critical for intracellular growth // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 1658–1666.

Sgro G.G., Oka G.U., Souza D.P., Cenens W., Bayer-Santos E., Matsuyama B.Y., Bueno N.F., Dos Santos T.R., Alvarez-Martinez C.E., Salinas R.K., Farah C.S. Bacteria-killing type IV secretion systems // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1078. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01078>

Singh P.K., Ramachandran G., Ramos-Ruiz R., Peiro-Pastor R., Abia D., Wu L.J., Meijer W.J. Mobility of the native *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercel-

lular signaling // PLoS Genet. 2013. V. 9. e1003892. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003892>

te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545.

Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich A.V., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Jannièrè L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector // Plasmid. 2003. V. 49. P. 53–62.

Yin X., Stotzky G. Gene transfer among bacteria in natural environments // Adv. Appl. Microbiol. 1997. V. 45. P. 153–212.

Molecular Genetic and Functional Analysis of the Conjugation System of the pBS72 Plasmid from *Bacillus subtilis* Environmental Isolates

A. S. Gurinovich¹ and M. A. Titok¹, *

¹Department of Microbiology, Biological Faculty, Belarussian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Received February 14, 2022; revised March 22, 2022; accepted March 27, 2022

Abstract—The conjugation system of the pBS72 plasmid, which is widespread among the extrachromosomal genetic elements of environmental *Bacillus* strains, is unique and may be assigned to a new family. The new systematic group, designates as Mpf₅, while exhibiting similarity to the conjugation system of the well-studied pLS20 plasmid of *B. subtilis* strain *nato*, was characterized by specific features of molecular genetic organization and functional activity. Thus, the key conjugation proteins VirB4, VirB6, VirB11, VirD4, and Adg of the plasmids pLS20 and pBS72, while similar in the regions of their functional domains, were reliably different, forming separate phylogenetic group. The genes encoding the conjugation regulation proteins (*rco*, *rap*, *phr*) in the plasmid pLS20, had different localization in the plasmid pBS72, and the similarity between amino acid sequences did not exceed 40.21% for the Rco protein, 24.41% for the Rap protein, and was absent for the Phr protein. Unlike the pLS20 plasmid, the conjugation transfer frequency of the plasmid pBS72 and of the mobilized plasmid pBC16 did not depend on the growth phase and donor cell concentration and depended on the medium composition and genetic properties of recipient bacteria. These results will serve as a basis for investigation of the mechanism of propagation of pBS72-like plasmids in natural environments and for development of a system of genetic analysis for biotechnologically important members of the genus *Bacillus*.

Keywords: conjugation, conjugation marker proteins, conjugation transfer frequency

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИКАРОТИНОИДЫ В КОМПЛЕКСАХ LH2 ИЗ *ALLOCHROMATIUM VINOSUM*
СПОСОБНЫ ПРИ ОСВЕЩЕНИИ ГЕНЕРИРОВАТЬ СИНГЛЕТНЫЙ
КИСЛОРОД, КОТОРЫЙ ОКИСЛЯЕТ БХл850© 2022 г. З. К. Махнева^а, А. А. Москаленко^а, *^аИнститут фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: andrey-moskalenko@rambler.ru

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.

После доработки 21.02.2022 г.

Принята к публикации 22.02.2022 г.

Исследовали взаимодействие синглетного кислорода с бактериохлорофиллом (БХл) в мембранах, светособирающих комплексах LH2 и экстрактах пигментов из штамма *Allochrochromatium (Alc.) vinosum* МГУ (старое название *Alc. minutissimum*). Подтверждена способность каротиноидов при освещении светом в пределах их области поглощения генерировать синглетный кислород, который окисляет БХл, при этом сам БХл в данном процессе не активен и является мишенью для синглетного кислорода. Резкое снижение количества окисленного БХл в комплексе LH2 при освещении в каротиноидной области отмечено только при соотношении каротиноид/комплекс около 0.1, то есть когда на 10 комплексов LH2 приходится менее 1 молекулы каротиноида. Предполагается, что каротиноиды из ранних этапов биосинтеза (нейроспорин, ζ-каротин) более активны в выделении синглетного кислорода под действием света, чем более зрелые каротиноиды. Процесс фотоокисления БХл в комплексах LH2 происходит только в присутствии кислорода. Уменьшение концентрации кислорода в 7 и более раз приводит к замедлению процесса или полной его остановке. В модельных системах (экстракт пигментов комплекса LH2, сохраняющий соотношение БХл/каротиноиды) БХл при освещении становится и основным генератором синглетного кислорода, и мишенью для действия последнего. Каротиноиды в этих условиях не защищают БХл от окисления. Способность БХл850 в комплексе LH2 окисляться синглетным кислородом предполагает, что он может быть использован как природный сенсор этого агента.

Ключевые слова: фотосинтезирующие бактерии, фотосинтез, каротиноиды, комплекс LH2, синглетный кислород, 3-ацетил-хлорофилл

DOI: 10.31857/S0026365622300218

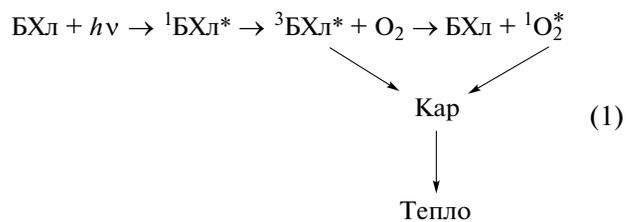
У фотосинтезирующих бактерий процессы поглощения солнечной энергии и ее передача с помощью энергии электронных возбужденных состояний протекают при участии пигментов в бактериальных пигмент-белковых комплексах. Обычно выделяют три типа комплексов: периферийный светособирающий комплекс LH2, светособирающий прицентровый комплекс LH1, образующий с реакционным центром (РЦ) ансамбль LH1-RC, и РЦ, в котором происходит первичное разделение зарядов. Основным из этих комплексов (по количеству копий в клетке и содержанию пигментов) является комплекс LH2. Схематично он представляет собой полый внутри цилиндр,

который построен из двух типов гидрофобных полипептидов (α и β), с которыми нековалентно связаны молекулы бактериохлорофилла (БХл) и каротиноидов. Обычно в этом комплексе в каждой субъединице на два полипептида приходится 3 молекулы БХл и один каротиноид. БХл в комплексе LH2 имеет полосы поглощения с максимумами при ~385 нм (полоса Core), ~590 нм (Q_x переход), а также при ~800 и ~850 нм в ближней ИК-области (Q_y переходы БХл), а каротиноиды – в области ~400–550 нм. Молекула каротиноида расположена между α - и β -полипептидами в так называемом “каротиноидном кармане”, так что его полиеновая цепь приобретает S-образную форму, проходит перпендикулярно мембране и взаимодействует как с молекулами БХл в соответствующих агрегатах (БХл800, БХл850), так и с аминокислотными остатками обоих полипептидов (Freer et al., 1996;

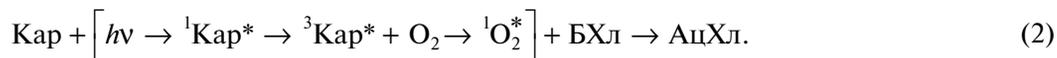
Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл, LH – светособирающий, РЦ – реакционный центр, *Alc.* – *Allochrochromatium*, АцХл – 3-ацетил-хлорофилл, ДФА – дифениламин.

Prince et al., 1997, 2003; Papiz et al., 2003; Gabrielsen et al., 2009; Löhner et al., 2015). Таким образом, пигменты пурпурных фотосинтезирующих бактерий (БХл и каротиноиды) имеют свои обособленные области поглощения, что делает возможным исследовать некоторые характеристики этих пигментов *in vivo* простыми спектральными методами.

Каротиноиды фотосинтезирующих пурпурных бактерий называются дополнительными пигментами и выполняют ряд функций *in vivo*, из которых, в данном случае, выделим защитную функцию. Она заключается в том, что система сопряженных двойных связей молекулы пигмента способна тушить триплеты БХл и рассеивать полученную энергию в виде тепла, препятствуя, таким образом, его взаимодействию с кислородом и образованию синглетного кислорода. Если при взаимодействии кислорода с триплетами БХл синглетный кислород все-таки образуется, то каротиноиды тушат и его (схема 1). Впервые гипотеза о подобной функции каротиноидов *in vivo* была предложена в работе (Griffiths et al., 1955) и в настоящее время является общепринятой (Cogdell, Frank, 1987; Frank, Cogdell, 1996; Cogdell et al., 2000; Britton, 2008; Polivka, Frank, 2010; Uragami et al., 2020).



Разные аспекты взаимодействия БХл с каротиноидами изучены достаточно хорошо, однако данных о генерации и дезактивации синглетного кислорода недостаточно. Согласно схеме 1 синглетный кислород должен образовываться при взаимодействии триплетов БХл и кислорода. Пока единственным прямым доказательством этого является способность бактериальных РЦ к выделению синглетного кислорода с квантовым выходом 0.03 ± 0.005 (Arellano et al., 2007; Uchoa et al., 2008). Для светособирающих комплексов таких измерений до сих пор не проведено, хотя, согласно общепринятой теории, синглетный кислород должен выделяться в бескаротиноидных образцах. Отметим, что существует и альтернативная гипотеза выделения синглетного кислорода, которая противоречит общепринятому мнению. Согласно этой гипотезе, каротиноиды в комплексах LH2 способны к генерации синглетного кислорода (схема 2) с последующим окислением БХл до 3-ацетил-хлорофилла (АцХл).



Эта гипотеза выдвинута нами на основании сравнительных данных по действию внешнего синглетного кислорода на БХл светособирающих комплексов LH2, по фотоокислению БХл850 в этих же комплексах при освещении светом, поглощаемым каротиноидами, а также по ингибированию указанных процессов ловушками синглетного кислорода (Махнева и соавт., 2019а, 2020; Makhneva et al., 2021).

В данной работе проведено дополнительное изучение взаимодействия синглетного кислорода с БХл как в светособирающих комплексах LH2 из *Allochrodatum (Alc.) vinosum* штамм МГУ, так и в экстрактах пигментов. Полученные данные подтверждают нашу гипотезу о возможности выделения синглетного кислорода каротиноидами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В качестве объекта исследования использовали мембраны и комплексы LH2, выделенные из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. vinosum* штамм МГУ (старое название *Alc. minutissimum*, получен из коллекции кафедры микробиологии МГУ, выделен проф. Е.Н. Кондра-

тьевой). Методы выделения мембран и комплексов подробно описаны ранее (Moskalenko et al., 2005; Makhneva et al., 2008; Moskalenko, Makhneva, 2012). Для получения комплексов со сниженным содержанием каротиноидов использовали выращивание клеток в присутствии дифениламина (ДФА), как указано в работах (Moskalenko et al., 2005; Makhneva et al., 2008; Moskalenko, Makhneva, 2012; Ashikhmin et al., 2014).

Освещение образцов. Все эксперименты с освещением образцов проводились при температуре 24°C в термостатируемой ячейке и осветителем ЛЭТИ с лампой КГМ 500 (500 Вт). Освещение комплексов во всей каротиноидной области проводили сине-зеленым светом (425–580 нм, комбинация светофильтров СЗС-22 + ЖС-12), а в более узких диапазонах с помощью интерференционных фильтров (рис. 1). Источником внешнего синглетного кислорода был бенгальский розовый (БР). Образцы с БР освещали желто-зеленым светом с помощью комбинации светофильтров (СЗС-23 + ОС-13), которые выделяли узкую область ~545–590 нм на длинноволновом склоне полосы поглощения БР и практически не затрагивали область поглощения каротиноидов (рис. 2). Интенсивность света измеряли с помощью пиро-

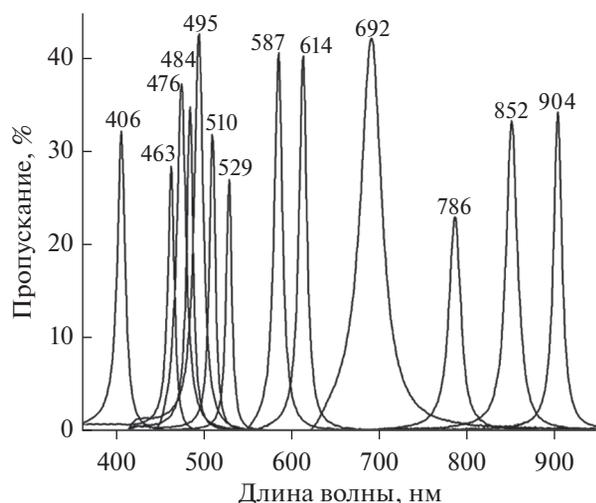


Рис. 1. Спектры пропускания интерференционных светофильтров. Цифрами указаны максимумы полос пропускания.

метра, которая составляла для сине-зеленого света – 50 Вт/м², желто-зеленого света – 7 Вт/м², а при использовании интерференционных светофильтров варьировала в пределах 2–6 Вт/м², Ошибка измерения во всех опытах не превышала 5–10%.

Биохимические и спектральные методы. Для удаления кислорода воздуха из образца использовали модификацию трубки Тунберга с 1-см кюветой, которую подключали к водоструйному насосу. Измерение концентрации кислорода в образце проводили с помощью электрода Кларка сразу после освещения и регистрации спектров поглощения. Получение пигментных экстрактов и ВЭЖХ-анализ описаны ранее (Ashikhmin et al., 2014). Пигментный анализ мембран, пигмент-белковых комплексов и изолированных каротиноидов проводили с помощью ВЭЖХ системы Shimadzu (“Shimadzu”, Япония), используя колонку с обращенной фазой Agilent Zorbax SB-C18 5 мкм 4.6 × 250 мм (“Agilent”, США). Каротиноиды, БХл и его продукты окисления идентифицировали по времени удержания на колонке и по спектру поглощения с помощью программного обеспечения LC solution (“Shimadzu”). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 50 (“Agilent Technology”, США) (Ashikhmin et al., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения в спектре поглощения мембран *Alc. vinosum* при освещении с помощью интерференционных светофильтров, пропускающих в области основных полос поглощения каротиноидов (485 нм) и БХл (852 нм) показаны на рис. 3а. При освещении в каротиноидную область происходит уменьшение (окисление) полосы БХл850, а поло-

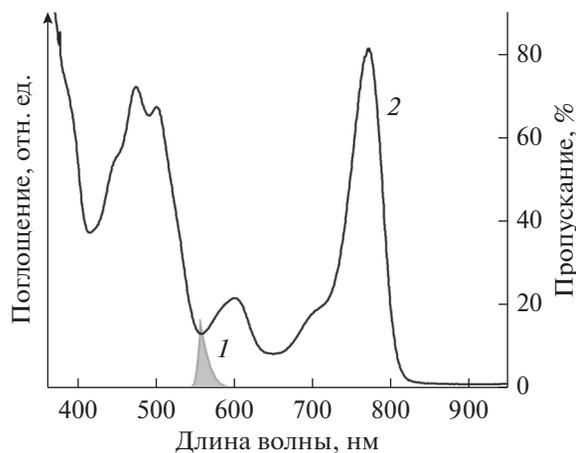


Рис. 2. Суммарный спектр пропускания светофильтров СЗС-23 и ОС13 (1) и спектр поглощения общего экстракта пигментов из комплекса LH2 *Alc. vinosum* МГУ (2).

са БХл800 несколько увеличивается за счет смещения первой полосы в коротковолновую область. Одновременно появляется полоса в районе 700 нм, которая принадлежит продукту окисления БХл – АцХл (рис. 3а). Такие же изменения в спектре поглощения комплекса LH2 были ранее обнаружены при освещении сине-зеленым светом (СЗС22-ЖС12), зеленым светом (лазер 532 нм) или с помощью полосовых светофильтров, а также при химическом окислении БХл (Махнева и соавт., 2016, 2020; Leiger et al., 2019; Makhneva et al., 2021). На свету с максимумом излучения при 852 нм зафиксировано только небольшое уменьшение полосы БХл850. Общая картина выцветания (окисления) БХл850 в контрольных мембранах *Alc. vinosum* при освещении светом с разной длиной волны (интерференционные светофильтры) представлена на рис. 3б. Хорошо видна активность каротиноидов (область 406–530 нм) в окислении БХл850, а БХл в этом процессе не участвует. Отметим, что подобные изменения отражают цепочку событий, которая указана на схеме 2. Ранее мы показали, что данный эффект ингибируется ловушками синглетного кислорода типа троллокса и аскорбата Na и предположили, что он связан с генерацией синглетного кислорода каротиноидами (Махнева и соавт., 2019б, 2020). Полученные результаты подтверждают это предположение. Основными каротиноидами в комплексе LH2 являются родопин (~66%), спириллоксантин (~17%) и 3,4-дидегидрородопин (~14%), а также в небольших количествах присутствуют ликопин и родовибрин (~2–3%). Понятно, что при таком гетерогенном составе оценить, какой из каротиноидов является наиболее активным в окислении БХл850 (выделении синглетного кислорода), не представляется возможным, и требуется проведе-

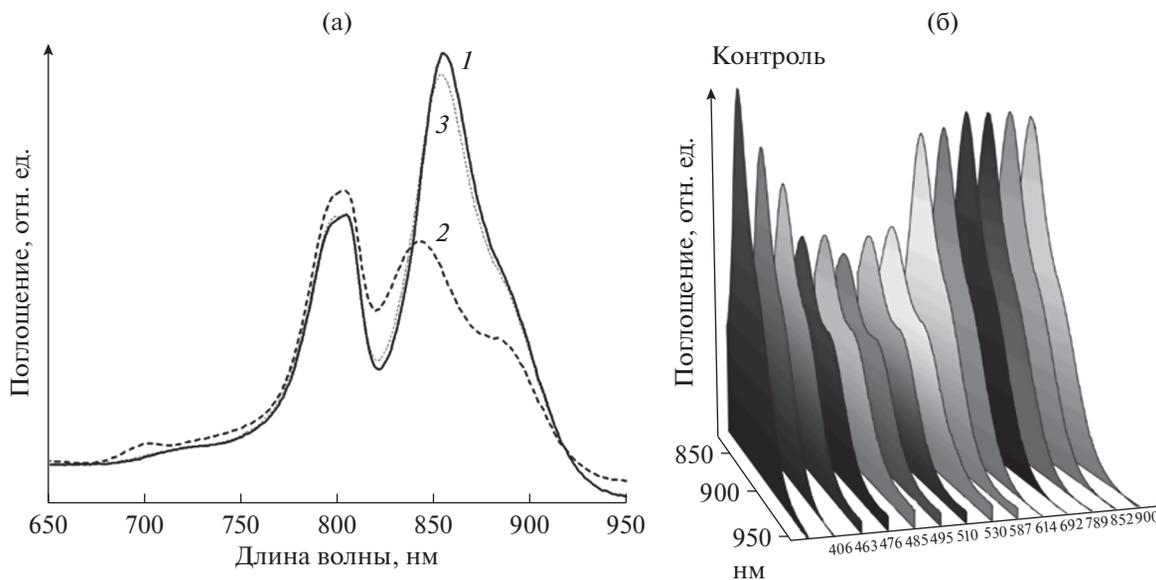


Рис. 3. а – Спектр поглощения контрольных мембран из *Alc. vinosum* до (1) и после освещения 30 мин с помощью интерференционных фильтров 485 нм (2) и 852 нм (3); б – трехмерный спектр поглощения контрольных мембран из *Alc. vinosum* до (контроль) и после освещения 30 мин с помощью соответствующих интерференционных фильтров. Максимум пропускания используемого фильтра указан в основании соответствующего спектра поглощения.

ние дополнительных экспериментов с отдельными каротиноидами, что является целью дальнейшей работы.

До настоящего времени было не совсем ясно, какое минимальное количество каротиноидов в комплексе LH2 из *Alc. vinosum* способно инициировать процесс окисления БХл850. Точные принципы организации этого комплекса были установлены относительно недавно, и было показано, что он состоит не из 8–9 пар α/β полипептидов (гетеродимеров), как у несерных бактерий, а из 12 гетерогенных пар α/β полипептидов (Löhner, 2015). Это означает, что контрольный комплекс содержит 12 каротиноидов. Известно, что получить мутанты с пониженным содержанием каротиноидов в комплексе LH2 (1–5% от контроля) методами генетики на сегодняшний день не представляется возможным. Известны только мутанты из несерных бактерий с измененным составом каротиноидов, при этом мутация прерывает синтез каротиноидов. Последний каротиноид в цепочке биосинтеза, ген которого не затронут мутацией, накапливается в клетках в полном объеме и его содержание составляет 100%. В бескаротиноидных мутантах пурпурных несерных бактерий (мутация по генам *CrtI* и *CrtA*) комплекс LH2 не собирается (Hunter, 1995). Наш подход с использованием ингибитора ДФА позволяет получить клетки (мембраны) серных фотосинтезирующих бактерий с разным содержанием каротиноидов (в пределах ≈ 0.05 –0.5% и более), но с сохранением обоих светособирающих комплексов (Makhneva et al., 2008;

Moskalenko, Makhneva, 2012). В данной работе были использованы комплексы LH2 из *Alc. vinosum*, которые содержали 12 (100%), ≈ 0.4 (≈ 3 –5%) и ≈ 0.1 (≤ 1 –0.5%) молекулы каротиноида на 1 комплекс (по нашим примерным оценкам). Они обозначены, соответственно, как контроль, ДФА1 и ДФА2. Это означает, что из расчета на 10 комплексов LH2 в образце ДФА1 на 6 комплексов без каротиноидов приходится 4 с одной молекулой пигмента, а в образце ДФА2 – это отношение равно 9/1. Спектр поглощения образцов ДФА2 представлен на рис. 4а (спектр 1), а спектры поглощения образцов ДФА1 и ДФА2 в каротиноидной области – на рис. 4а (вставка). Следует отметить, что при ингибировании биосинтеза каротиноидов в клетках *Alc. vinosum* очень легко можно получить образцы типа ДФА1 (содержание каротиноидов около 3–8%), а полного ингибирования каротиноидов ($\leq 0.5\%$) добиться достаточно сложно. По качественному составу каротиноидов указанные образцы (ДФА1 и ДФА2) достаточно близки: в них содержатся нейроспорин и ζ -каротин, а также их гидрокси-производные и в небольшом количестве – родопин, фитофлуин и фитоин (рис. 5). Два последних, которые иногда называют предшественниками каротиноидов, поглощают в ближней УФ-области. В данной работе мы использовали освещение в видимой и ближней ИК-области, и поэтому их участие в исследуемом процессе не принималось во внимание. В образцах в небольшом количестве также обнаружен АцХл (окисленный БХл). Он также присутствует в мембранах и его наличие может быть связано с окис-

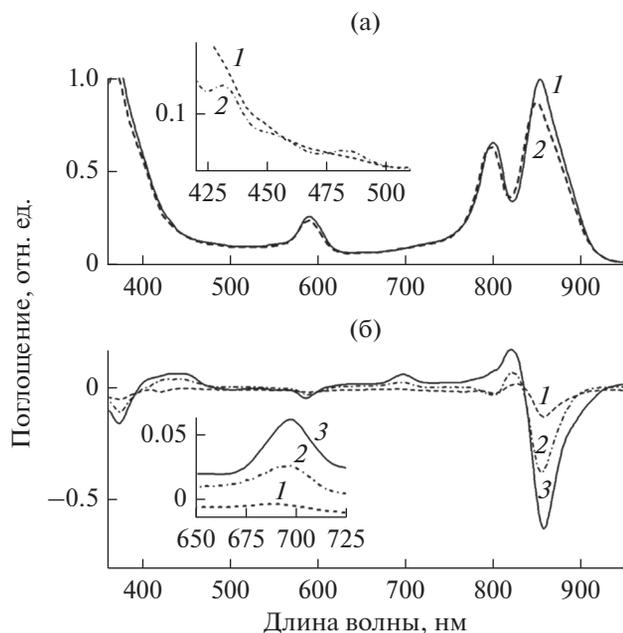


Рис. 4. а – Спектр поглощения бескаротиноидного комплекса LH2 ДФА2 из *Alc. vinosum* до (1) и после освещения 30 мин (2) синие-зеленым светом. Вставка: спектры поглощения бескаротиноидного комплекса LH2 ДФА2 (1) и комплекса LH2 ДФА1 с содержанием каротиноидов около 5% (2) в области 420–520 нм, характерной для каротиноидов ранних этапов биосинтеза. б – Разностные спектры поглощения “30 мин синие-зеленым светом минус контроль” комплекса LH2 из *Alc. vinosum*: (1) – бескаротиноидный комплекс LH2 ДФА2; (2) – комплекс LH2 ДФА1 с содержанием каротиноидов около 5%; (3) – контрольный комплекс LH2. Вставка: спектры поглощения продукта окисления БХл – АцХл, обозначения спектров такие же, как на рис. 4б.

лением небольшой части БХл в процессе разрушения клеток или естественными причинами. В любом случае его количество крайне незначительно и не определяется спектрально.

При изучении влияния количества каротиноидов в комплексах LH2 из *Alc. vinosum* на фотоокисление в них БХл при освещении синие-зеленым светом установлено, что в контрольных комплексах LH2 окисление БХл проходило в ≈ 1.7 раза эффективнее, чем в комплексе LH2 ДФА1 (рис. 4б), хотя разница в содержании каротиноидов в образцах отличалась в ≈ 20 раз. Это может свидетельствовать о том, что каротиноиды из ранних стадий биосинтеза (нейроспорин и ζ -каротин) более эффективны в процессе образования синглетного кислорода и, как следствие, в окислении БХл, чем зрелые каротиноиды. Недавно при изучении мутанта *Rb. sphaeroides* с ζ -каротином было высказано предположение, что он способен генерировать синглетный кислород, так как уровень его триплета расположен выше триплета кислорода (Niedzwiedzki et al., 2020). Это

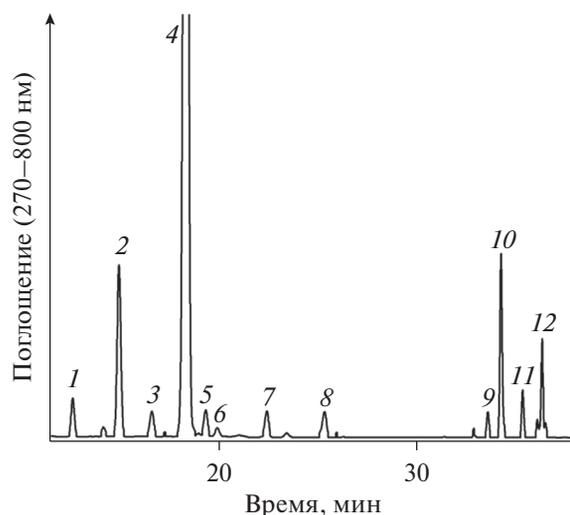


Рис. 5. ВЭЖХ анализ пигментов комплекса LH2 ДФА. Идентификация пиков: (1–4) – БХл и его производные; (5) – АцХл; (6) – родопин; (7) – ОН-нейроспорин; (8) – ОН- ζ -каротин; (9) – нейроспорин; (10) – ζ -каротин; (11) – фитофлуин; (12) – фитоин.

предположение коррелирует с полученными нами результатами. При дальнейшем уменьшении количества каротиноидов в комплексе (образец ДФА2) резко снижается выцветание БХл и практически отсутствует полоса поглощения АцХл (рис. 4б, вставка). Таким образом, каротиноиды типа нейроспорина или ζ -каротина при содержании 1 каротиноид на один или два комплекса LH2 могут достаточно эффективно генерировать синглетный кислород под действием света и, как следствие, вызывать окисление БХл в этом комплексе.

Ранее мы показали, что тушители синглетного кислорода останавливают процесс окисления БХл в комплексах LH2 на синие-зеленом свете (Махнева и соавт., 2019б). Однако было не ясно, как этот процесс зависит от концентрации кислорода в образце. Результаты подобного эксперимента представлены на рис. 6, из которого следует, что окисление БХл уменьшается одновременно со снижением концентрации кислорода. Вопрос о том, почему при полном удалении кислорода из образца появляются положительные максимумы на разностном спектре комплекса LH2, остается открытым. Возможно, что этот эффект связан с разрушением (растворением) небольших агрегатов комплекса (они могли образоваться при его концентрировании) за счет эффекта кавитации при удалении кислорода. Из результатов этого опыта следует, что процесс окисления БХл у фотосинтезирующих бактерий при низких концентрациях кислорода (2–4%) мог стимулировать процесс эволюции бактерий в сторону появления защиты от синглетного кислорода. У несерных фотосинтезирующих бакте-

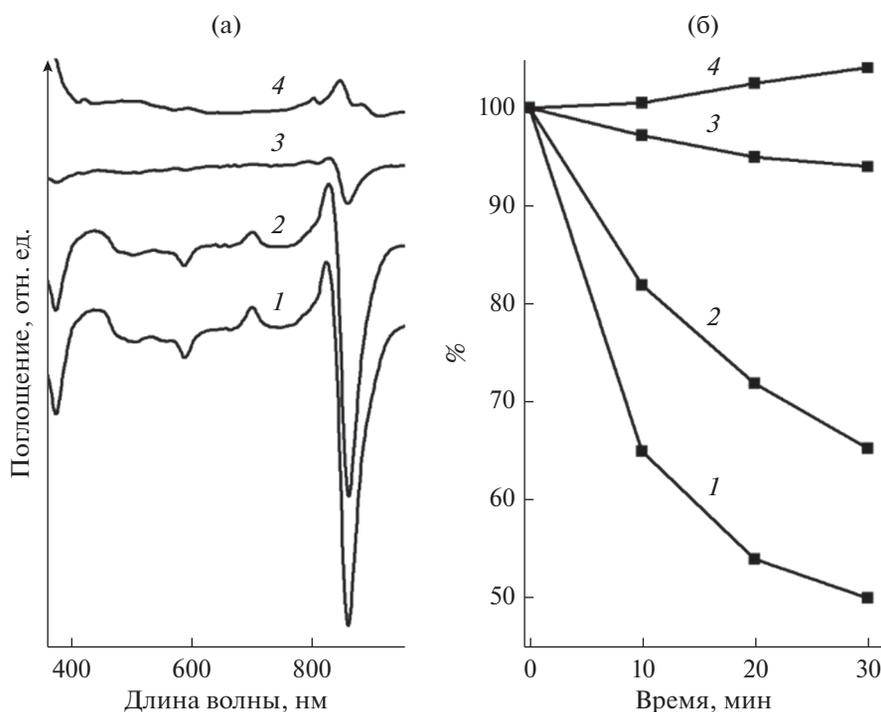


Рис. 6. а – Разностные спектры поглощения “30 мин сине-зеленым светом минус контроль” контрольного комплекса LH2 из *Alc. vinosum* в присутствии 100% атмосферного кислорода (1), ≈50% (2), ≈14% (3) и ≥0% (4). Для лучшего восприятия спектры разнесены по шкале ординат относительно друг друга. б – Кривые выцветания БХл850 в контрольном комплексе LH2 из *Alc. vinosum* в присутствии разных концентраций атмосферного кислорода (см. рис. 6а).

рий эта проблема в ходе эволюции была успешно решена, и они способны к росту в фото/гетеротрофных условиях в присутствии кислорода.

Следует отметить, что способность БХл850 в комплексе LH2 из *Alc. vinosum* к окислению синглетным кислородом делает его природным сенсором этого агента. В качестве подобного сенсора его можно использовать с образцами, которые поглощают в области 650–750 нм, где поглощение БХл очень низкое. Очевидно, что к таким образцам могут быть отнесены все хлорофилл-содержащие объекты из растений и водорослей, которые содержат РЦ фотосистемы 2.

Естественно, что возникает вопрос о механизме взаимодействия каротиноидов и кислорода. Выбор вариантов здесь не очень большой: после поглощения кванта света молекула пигмента переходит на синглетный короткоживущий уровень ($^1\text{Кар}^*$) и потом следует быстрый переход на долгоживущий триплетный уровень ($^3\text{Кар}^*$). Последний является базовым для взаимодействия с другими молекулами. Однако проблема состоит в том, что этот уровень у большинства каротиноидов, за исключением ζ -каротина и, возможно, нейроспорина, ниже, чем у кислорода, и такое взаимодействие весьма проблематично. Однако эффект фотоокисления БХл на свету, поглощаемом

каротиноидами, имеет место быть, и он связан с образованием синглетного кислорода, который окисляет БХл. Квантовый выход этого процесса небольшой, и требуются дополнительные эксперименты для выяснения его точного механизма.

На заключительном этапе работы была проведена проверка действия синглетного кислорода на экстракт пигментов штамма *Alc. vinosum* МГУ. При освещении экстракта желто-зеленым светом наблюдается быстрое выцветание БХл (рис. 7). Также отмечено некоторое увеличение поглощения при 400–550 нм, что связано с появлением продуктов окисления БХл, поглощающих в этой области. Известно, что в модельных системах БХл легко окисляется с образованием десятка окисленных продуктов, основными из которых являются хлорины (Limantara et al., 2006). Интересно отметить, что каротиноиды в этом опыте не выцветают (окисляются). Они, согласно схеме 1, должны тушить триплеты БХл или синглетный кислород и предотвращать окисление БХл, однако в данной ситуации каротиноиды не способны остановить указанный процесс. Возможная генерация каротиноидами синглетного кислорода имеет низкий квантовый выход и не принималась во внимание. Добавление в среду БР, как дополнительного продуцента синглетного кислорода,

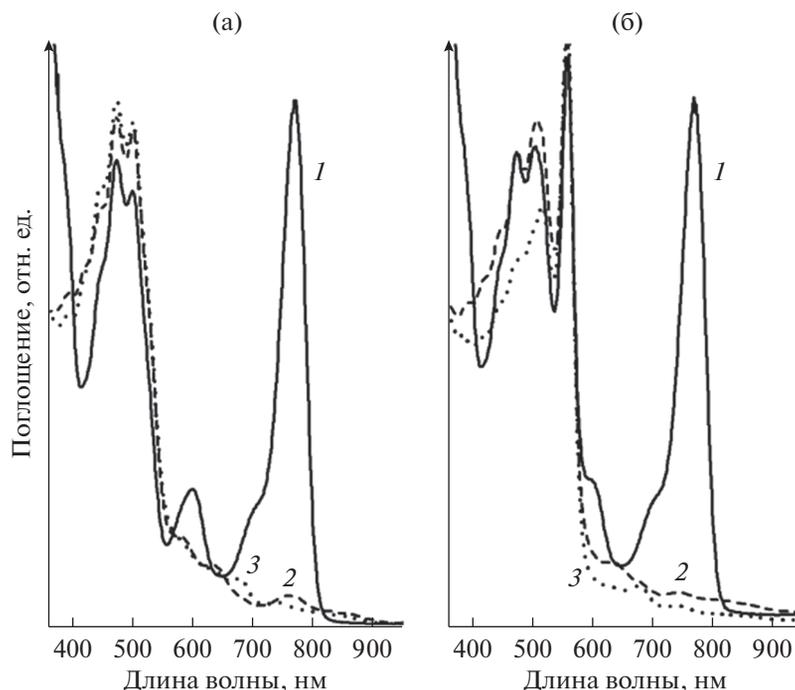


Рис. 7. (а) – Спектр поглощения общего экстракта пигментов из *Alc. vinosum* МГУ в смеси ацетон–метанол (7 : 2) до (1) и после освещения 5 мин (2) или 20 мин (3) желто-зеленым светом. (б) – Спектр поглощения общего экстракта пигментов из *Alc. vinosum* МГУ до (1) и после освещения 5 мин (2) или 20 мин (3) желто-зеленым светом в присутствии БР (конечная концентрация 10 мкМ).

существенно меняет процесс окисления (рис. 7б). Регистрируется уменьшение поглощения в каротиноидной области, которое, с одной стороны, свидетельствует об окислении самих каротиноидов, а с другой – о более глубоком окислении БХл.

Понятно, что при переходе от комплексов к экстрактам у нас нарушается пространственная организация пигментов, но сохраняется их соотношение (БХл/каротиноиды), и, в отдельных случаях, проявляются новые свойства пигментов. В частности, это касается БХл, который *in vitro* является эффективным фотосенсибилизатором синглетного кислорода (Redmond, Gamlin, 1999). Последний, в свою очередь, вызывает быстрое окисление самого БХл и уменьшение его концентрации, так что количество синглетного кислорода тоже падает. В этой связи остается непонятным поведение каротиноидов. Известно, что в модельных системах каротиноиды тушат синглетный кислород с эффективностью 90–100% (Schmidt, 2004; Tamura, Ishikita, 2020). Тушение триплетов БХл это чисто физический процесс, который должен сохраняться *in vitro*. Очевидно, что в данных (модельных) условиях оба эти процесса работают неэффективно, и каротиноиды не способны защитить БХл от окисления синглетным кислородом, который он сам генерирует.

В данной работе, проведенной на мембранах и комплексах LH2 из штамма *Alc. vinosum* МГУ, было установлено, что каротиноиды под действием света могут генерировать синглетный кислород, который окисляет БХл. БХл в указанном процессе не активен и взаимодействует с синглетным кислородом, окисляясь до АцХл. Резкое снижение образования АцХл в образце отмечено только при соотношении каротиноид/комплекс около 0.1 (>1 каротиноида на комплекс). В модельных системах (экстракт пигментов комплекса LH2, сохраняющий соотношение БХл/каротиноиды) БХл при освещении становится и основным генератором синглетного кислорода и мишенью для действия последнего. Каротиноиды в этих условиях не защищают БХл от окисления. Способность БХл850 в комплексе LH2 окисляться синглетным кислородом предполагает, что он может быть использован как природный сенсор этого агента.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность З.А. Журавлевой (ИФПБ РАН) за помощь в выращивании культуры штамма *Alc. vinosum* МГУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта “Уникальная способность бактериальных каротиноидов генерировать синглетный кислород на свету” по госзаданию ИФПБ РАН FMRM-2022-0013.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Взаимодействие бактериохлорофилла с синглетным кислородом в мембранах пурпурных фотосинтезирующих бактерий: существует ли защитная функция каротиноидов? // ДАН. 2019а. Т. 486. С. 504–508.
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524864504-508>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Bacteriochlorophyll interaction with singlet oxygen in membranes of purple photosynthetic bacteria: does the protective function of carotenoids exist? // Proceed. RAS. 2019. V. 486. P. 504–508.
<https://doi.org/10.31857/S0869-56524864504-508>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Защита БХЛ850 от действия синглетного кислорода в мембранах серной фотосинтезирующей бактерии *Allochrochromatium vinosum* с помощью тушителей // Микробиология. 2019б. Т. 88. С. 91–99.
<https://doi.org/10.1134/S0026365619010129>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Quenchers protect BChl850 from action of singlet oxygen in the membranes of a sulfur photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum* strain MSU // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 79–86.
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Выделение синглетного кислорода мембранами пурпурных фотосинтезирующих бактерий при облучении светом происходит при возможном участии каротиноидов // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 169–179.
<https://doi.org/10.31857/S0026365620010097>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Carotenoids are probably involved in singlet oxygen generation in the membranes of purple photosynthetic bacteria under light irradiation // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 164–173.
<https://doi.org/10.1134/S0026261720010099>
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Образование 3-ацетил-хлорофилла в светособирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 282–294.
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. 3-Acetyl-chlorophyll formation in light-harvesting complexes of purple bacteria by chemical oxidation // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 176–186.
- Arellano J.B., Yousef Y.A., Melo T.B., Mahamad S.B.B., Cogdell R.J., Naqvi K.R. Formation and geminate quenching of singlet oxygen in purple bacterial reaction center // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2007. V. 87. P. 105–112.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.03.004>
- Ashikhmin A.A., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A. The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis // Phot. Res. 2014. V. 119. P. 291–303.
<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9947-6>
- Britton G. Functions of intact carotenoids // Carotenoids. Natural Functions / Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Birkhauser Verlag, Switzerland, 2008. P. 265–308.
- Cogdell R., Frank H. How carotenoids function in photosynthetic bacteria // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 895. P. 63–79.
- Cogdell R.J., Howard T.D., Bittl R., Schlodder E., Geisenheimer I., Lubitz W. How carotenoids protect bacterial photosynthesis // Philosoph. Trans. Royal Soc. B: Biol. Sci. 2000. V. 355. P. 1345–1349.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0696>
- Frank H., Cogdell R. Carotenoids in photosynthesis // Photochem. Photobiol. 1996. V. 63. P. 257–264.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022.x>
- Freer A., Prince S., Sauer K., Papiz M., Hawthornthwaite-Lawless A., McDermott G., Cogdell R., Isaacs N. Pigment-pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila* // Structure. 1996. V. 4. P. 449–462.
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00050-0)
- Gabrielsen M., Gardiner A., Cogdell R. Peripheral complexes of purple bacteria // Advances in Photosynthesis and Respiration. The Purple Phototrophic Bacteria / Eds. Hunter C.N., Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T. Dordrecht: Springer, 2009. V. 28. P. 135–153.
- Griffiths M., Sistrom W., Cohen-Bazire G., Stanier R. Functions of carotenoids in photosynthesis // Nature. 1955. V. 176. P. 1211–1215.
<https://doi.org/10.1038/1761211a0>
- Hunter C.N. Genetic manipulation of antenna complexes of purple bacteria // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria / Eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Dordrecht, Netherlands: Kluwer, 1995. P. 473–501.
- Leiger K., Linnanto J.M., Rätsep M., Timpmann K., Ashikhmin A.A., Moskalenko A.A., Fufina T., Gabdulkhakov A., Freiberg A. Controlling photosynthetic excitons by selective pigment photooxidation // J. Phys. Chem. B. 2019. V. 123. P. 29–38.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b08083>
- Limantara L., Koehler P., Wilhelm B., Porra R.J., Scheer H. Photostability of bacteriochlorophyll *a* and derivatives: potential sensitizers for photodynamic tumor therapy // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 770–780.
<https://doi.org/10.1562/2005-09-07-RA-676>
- Löhner A., Carey A.M., Hacking K., Picken N., Kelly S., Cogdell R., Kohler J. The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum* // Photosynth. Res. 2015. V. 123. P. 23–31.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.07.022>
- Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Heterogeneity of carotenoid content and composition in LH2 of the sulphur purple bacterium *Allochrochromatium minutissimum* grown under carotenoid-biosynthesis inhibition // Phot. Res. 2008. V. 98. P. 633–641.
<https://doi.org/10.1007/s11120-008-9384-0>
- Moskalenko A.A., Makhneva Z.K. Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochrochromatium minutissi-*

- mum* assembled without carotenoids // J. Photochem. Photobiol. 2012. V. 108. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.11.006>
- Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 5120.
<https://doi.org/10.3390/molecules26175120>
- Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Heterogeneity of carotenoid content and composition in LH2 of the sulphur purple bacterium *Allochrochromatium minutissimum* grown under carotenoid-biosynthesis inhibition // *Phot. Res.* 2008. V. 98. P. 633–641.
<https://doi.org/10.1007/s11120-008-9384-0>
- Moskalenko A.A., Makhneva Z.K., Fiedor L., Scheer H. Effects of carotenoid inhibition on the photosynthetic RC–LH1 complex in purple sulphur bacterium *Thiorhodospira sibirica* // *Phot. Res.* 2005. V. 86. P. 71–80.
<https://doi.org/10.1007/s11120-005-4473-9>
- Niedzwiedzki D.M., Swainsbury D.J.K., Canniffe D.P., Hunter C.N., Hitchcock A.A. Photosynthetic antenna complex foregoes unity carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer efficiency to ensure photoprotection // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. P. 6502–6508.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1920923117>
- Papiz M., Prince S., Howard T., Cogdell R., Isaacs N. The structure and thermal motion of the B800–850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å resolution and 100 K: new structural features and functionally relevant motions // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 1523–1538.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00024-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00024-x)
- Polivka T., Frank H. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids // *Acc. Chem. Res.* 2010. V. 43. P. 1125–1134.
<https://doi.org/10.1021/ar100030m>
- Prince S., Howard T., Myles D., Wilkinson C., Papiz M., Freer A., Cogdell R., Isaacs N. Detergent structure in crystals of the integral membrane light-harvesting complex LH2 from *Rhodospseudomonas acidophila* Strain 10050 // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 307–315.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01361-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01361-x)
- Prince S., Papiz M., Freer A., McDermott G., Hawthornthwaite-Lawless A., Cogdell R., Isaacs N. Apoprotein structure in the LH2 complex from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050: modular assembly and protein pigment interactions // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 268. P. 412–423.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0966>
- Redmond R.W., Gamlin J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 70. P. 391–475.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08240.x>
- Schmidt R. Deactivation of O₂(¹Δ_g) singlet oxygen by carotenoids: internal conversion of excited encounter complexes // *J. Phys. Chem. A*. 2004. V. 108. P. 5509–5513.
<https://doi.org/10.1021/jp048958u>
- Tamura H., Ishikita H. Quenching of singlet oxygen by carotenoids via ultrafast super-exchange dynamics // *J. Phys. Chem. A*. 2020. V. 124. P. 5081–5088.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c02228>
- Uchoa A.F., Knox P.P., Turchielle R., Seifullina N.Kh., Baptistista S.M. Singlet oxygen generation in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* // *Eur. Biophys. J.* 2008. V. 37. P. 843–850.
<https://doi.org/10.1007/s00249-008-0287-y>
- Uragami C., Sato H., Yukihira N., Fujiwara M., Kosumi D., Gardiner A., Cogdell R., Hashimoto H. Photoprotective mechanisms in the core LH1 antenna pigment-protein complex from the purple photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* // *J. Photoch. Photobiol. A: Chemistry*. 2020. V. 400. Art. 112628.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112628>

Carotenoids in LH2 Complexes from *Allochrochromatium vinosum* under Illumination Are Able to Generate Singlet Oxygen Which Oxidizes BChl850

Z. K. Makhneva¹ and A. A. Moskalenko^{1, *}

¹Pushchino Scientific Center for Biological Research of Russian Academy of Sciences, Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: andrey-moskalenko@rambler.ru

Received February 4, 2022; revised February 21, 2022; accepted February 22, 2022

Abstract—The interaction of singlet oxygen with bacteriochlorophyll (BChl) in the membranes, LH2 light-harvesting complexes, and pigment extracts from *Allochrochromatium (Alc.) vinosum* strain MSU (previously *Alc. minutissimum*) was studied. The ability of carotenoids illuminated with light within their absorption region to generate singlet oxygen, which oxidizes BChl, was confirmed; BChl itself was not active in this process and acted a target for singlet oxygen. A sharp decrease in the amount of oxidized BChl in the LH2 complex under illumination in the carotenoid region was noted only at the carotenoid/complex ratio of about 0.1, i.e., when there is less than 1 carotenoid molecule per 10 LH2 complexes. It is assumed that carotenoids from the early stages of biosynthesis (neurosporene, ζ-carotene) are more active in the generation of singlet oxygen under illumination than more mature carotenoids. BChl photooxidation in LH2 complexes occurred only in the presence of oxygen. A decrease in oxygen concentration by 7 or more times resulted in a slowdown of the process or its complete stop. In model systems (pigment extract of the LH2 complex retaining the BChl/carotenoids ratio), BChl under illumination becomes both the main generator of singlet oxygen and a target for the action of the latter. Under these conditions, carotenoids do not protect BChl from oxidation. The ability of BChl850 in the LH2 complex to be oxidized by singlet oxygen suggests that it can be used as a natural sensor for this agent.

Keywords: photosynthetic bacteria, photosynthesis, carotenoids, LH2 complex, singlet oxygen, 3-acetylchlorophyll

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИФИЛОГЕНИЯ И РЕКЛАССИФИКАЦИЯ *RHODOTORULA PINALIS*
КАК *FELLOZYMA PINALIS* COMB. NOV.© 2022 г. А. В. Качалкин^{a, b, *}^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия^bИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290 Россия*e-mail: kachalkin_a@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2022 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принята к публикации 05.03.2022 г.

Дана генетическая характеристика и проведен филогенетический анализ голотипа вида *Rhodotorula pinalis*, штамм ВКМ У-2963. Полученные данные для ITS региона и D1/D2 доменов LSU размещены в генбанке NCBI (OM666053). Выявлена конспецифичность подмосковных штаммов *Fellozyma* sp. КБП 3851 со сфагновых мхов и *Rh. pinalis* ВКМ У-2963 с хвойного опада. Полученные данные по филогении показали, что вид *Rh. pinalis* должен быть отнесен к роду *Fellozyma*. В данной работе публикуется новая комбинация *Fellozyma pinalis* comb. nov., зарегистрированная в базе MucosBank MB842988.

Ключевые слова: дрожжи, таксономия, *Rhodotorula*, *Fellozyma*, *Chysozymaceae*, *Pucciniomycotina***DOI:** 10.31857/S0026365622100081

В настоящее время насчитывается около 2000 видов дрожжей, которые относятся к аскомицетовым и базидиомицетовым одноклеточным или диморфным грибам (Boekhout et al., 2021a). Систематика дрожжевых грибов, впрочем, как и любой другой группы микроорганизмов, к настоящему времени прошла сложный путь преобразований со сменой основных критериев и подходов к таксономии, и ведущая роль в таксономических исследованиях теперь отводится молекулярному филогенетическому анализу (Boekhout et al., 2021b). В 2012 году внутренний транскрибируемый спейсер (ITS регион) рРНК был предложен в качестве универсального генетического маркера для грибов (Schoch et al., 2012). Однако еще ранее для многих типовых штаммов дрожжей были сделаны сиквенсы рибосомальных генов и проведены первые масштабные филогенетические исследования (Kurtzman, Robnett, 1998; Fell et al., 2000; Scorzetti et al., 2002). С этого же периода ведущие микробиологические журналы не принимали статьи с описаниями новых видов дрожжей без филогенетических данных по рибосомальным генам.

Текущие таксономические исследования многих групп мицелиальных грибов и дрожжей связаны с анализом генов рРНК (например, Liu et al., 2015a; Wang et al., 2015a; Kachalkin et al., 2019) и с мультигенным подходом для систематики высших таксонов (например, Liu et al., 2015b; Wang et al., 2015b; Li et al., 2020). Данные по ITS регионам широко используются для метабаркодинга гриб-

ного населения природных и антропогенных субстратов (например, Tedersoo et al., 2014; Kuznetsova et al., 2021). При метабаркодинге сравнение полученных данных с информацией о референсных штаммах не только дает представление о составе грибных группировок, но и помогают лучше понять разнообразие всего царства грибов, среди которого нам известно не более 5–10% видов (Boekhout et al., 2021a).

Однако ранее при исследовании многих групп дрожжей, по тем или иным причинам, основной упор был сделан на данные о нуклеотидной последовательности гена большой субъединицы (LSU) рРНК. Особенно это касается аскомицетовых дрожжей, для ряда описанных видов нуклеотидные последовательности ITS региона неизвестны (данные YeastIP, <http://genome.jouy.inra.fr/yeastip/>). Поэтому в настоящее время требуется дополнительная генетическая характеристика коллекционных штаммов. Например, такая характеристика была сделана для дрожжей из коллекции CBS (Vu et al., 2016). Отсутствие данных о хотя бы одном генетическом маркере в настоящее время делает невозможным ни таксономические исследования, ни современную генетическую характеристику сообществ с помощью метабаркодинга.

Среди дрожжей видом с отсутствующими данными о генетических маркерах является *Rhodotorula pinalis* (Голубев, 2010), описание которого было сделано на изолятах с хвойного опада *Pinus sylvestris*. Цель данного исследования – генетическая харак-

теристика и филогенетический анализ голотипа *Rh. pinalis* ВКМ Y-2963.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования был использован голотип *Rh. pinalis*, штамм ВКМ Y-2963. Выделение ДНК проводили с применением стеклянной дробы (диаметром 300–500 мкм) и лизирующего буфера (TrisBase 50 мМ, NaCl 250 мМ, ЭДТА 50 мМ, SDS 0.3%; pH 8), используя гомогенизатор TissueLyser LT (“Qiagen”, Германия) и инкубирование при температуре 65°C. Для амплификации региона гена рРНК, содержащего ITS регион и D1/D2 домены LSU, использовали праймеры ITS1f (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA) и LR5 (5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе 3130xl Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США) в ЗАО “Евроген” (Москва). Для секвенирования были использованы праймеры ITS5 и LR5. Полученная в ходе генетического исследования нуклеотидная последовательность размещена в генбанке NCBI под номером OM666053.

Выполнен филогенетический анализ для сравнения нуклеотидных последовательностей генов рРНК, полученных после секвенирования, и данные для типовых штаммов по недавним ревизиям дрожжей подотдела *Pucciniomycotina* (Wang et al., 2015a, 2015b; Li et al., 2020). Филогенетический анализ (Maximum Likelihood) на основе данных нуклеотидных последовательностей региона ITS1-5.8S-ITS2 и D1/D2 доменов LSU проводился с использованием программы MEGA v.6 (Tamura et al., 2013). GTR модель с гамма-распределением и инвариантными сайтами (G + I) использована в качестве модели нуклеотидных замен. Множественное выравнивание последовательностей выполнено в программе MAFFT v.7 (Katoh et al., 2019).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования была получена нуклеотидная последовательность размером 1388 п.н. для штамма ВКМ Y-2963, содержащая ITS регион и D1/D2 домены LSU рДНК. Используя эти данные, был проведен поиск (BLASTn) через генбанк NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базу данных MycoID (www.mycobank.org) для обнаружения схожих нуклеотидных последовательностей. Результаты поиска по генбанку NCBI показали сходство 100% с нуклеотидной последовательностью LSU региона штамма *Fellozyma* sp. КБП 3851 (= (/gh) КБП Y-6581, CBS 11782, DSM 108826), выделенным в ходе исследования дрожжевого населения сфагновых мхов в Московской области

(Качалкин и соавт., 2008). Сравнение ITS регионов штаммов КБП 3851 и ВКМ Y-2963 показало различие в 1 п.н. (сходство 99.8%). Сходство 99.8–100% ITS региона и D1/D2 доменов рДНК соответствует уровню внутривидовой варируемости для дрожжей (Vu et al., 2016). Проведенный поиск в базе данных MycoID показал отсутствие культур со сходством 99–100% по ITS региону со штаммом ВКМ Y-2963. Таким образом, полученные нами результаты указывают, что для типового штамма (голотипа) *Rh. pinalis* ВКМ Y-2963 в генбанке NCBI и базе MycoID отсутствуют данные о нуклеотидных последовательностях ITS региона и/или D1/D2 доменов LSU, но имеется информация о другом представителе этого вида дрожжей – *Fellozyma* sp. КБП 3851.

В качестве генетической характеристики вида *Rh. pinalis* при описании было указано различие по рДНК с близкородственным видом *Sporobolomyces inositolophilus* (нынешнее название *Fellozyma inositolophila*) – четыре нуклеотида в D1/D2 доменах и более 20 нуклеотидов в ITS регионах (Голубев, 2010). Полученные нами результаты показали, что различие по рДНК с типовым штаммом *F. inositolophila* CBS 7310 составляет шесть нуклеотидных замен и шесть делеций в D1/D2 доменах по данным секвенирования 2016 г. (NG_066180) и четыре нуклеотида – по данным 1999 г. (AF189987). Различие между сиквенсами D1/D2 доменов за разные годы для штамма *F. inositolophila* CBS 7310 составляет 0.80% (5 делеций). Используя данные ITS региона, различия *Rh. pinalis* ВКМ Y-2963 и *F. inositolophila* CBS 7310 составляют 18 замен и 18 делеций по данным секвенирования 2001 г. (AF444559) и 18 замен и 19 делеций – по данным 2016 г. (KY103411). Различие между ITS сиквенсами за разные годы для штамма *F. inositolophila* CBS 7310 составляет 0.16% (одна делеция). Таким образом, приведенная генетическая характеристика в описании вида *Rh. pinalis* соответствует полученным нами данным для голотипа ВКМ Y-2963. В то же время ситуация с достаточно сильно различающимися сиквенсами D1/D2 доменов для типового штамма *F. inositolophila* CBS 7310 требует прояснения в будущем. Несмотря на это, полученные результаты показывают, что вид *Rh. pinalis*, действительно, является близкородственным *F. inositolophila*. Различие между штаммами CBS 7310 и ВКМ Y-2963 соответствует межвидовому уровню по данным нуклеотидных последовательностей ITS региона и D1/D2 доменов (Vu et al., 2016).

Монотиповой род *Fellozyma* был выделен в ходе ревизии полифилетических родов базидиомицетовых дрожжей подотдела *Pucciniomycotina*: *Bensingtonia*, *Bullera*, *Rhodosporeidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* и *Sporobolomyces* и др. (Wang et al., 2015a). С внедрением принципа “Один гриб = одно имя” (McNeill et al., 2012) подобные полифилетические роды подвергаются таксономическим ревизиям.

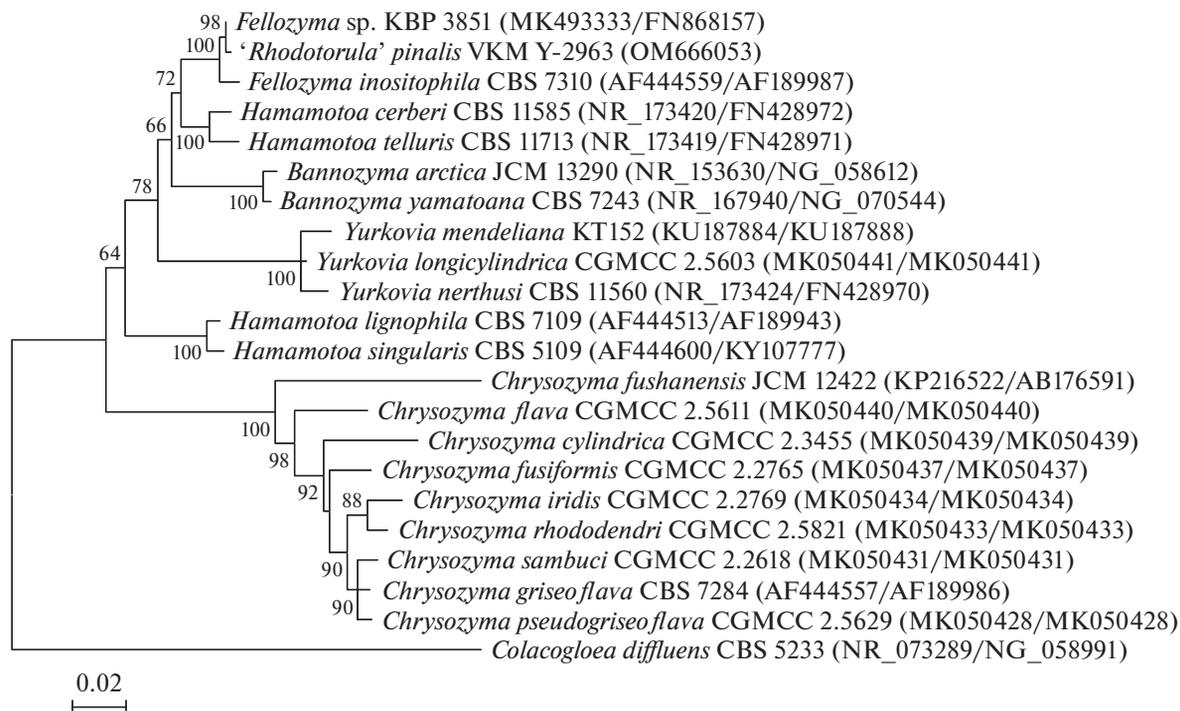


Рис. 1. Филогенетический анализ для представителей семейства *Chrysozymaceae* на основе нуклеотидных последовательностей ITS региона и D1/D2 доменов рДНК. Бутстрэп более 50% (отмечен на древе) получен для 1000 альтернативных построений. В скобках указаны номера нуклеотидных последовательностей для типовых штаммов.

Такие таксономические изменения базируются на молекулярном филогенетическом анализе (например, Liu et al., 2015a; Wang et al., 2015a), но если для того или иного описанного вида дрожжей отсутствуют данные в виде сиквенсов в публично доступном генбанке NCBI, то вид просто не включается в ревизию. Именно такая ситуация и произошла с *Rh. pinalis*, который должен был бы быть переописан вместе с видом *Sp. inositoliphilus* как род *Fellozyma* (Wang et al., 2015a).

Проведенный филогенетический анализ для представителей семейства *Chrysozymaceae*, близких родственных к *Fellozyma*, на основании нуклеотидных последовательностей ITS региона и D1/D2 доменов LSU рДНК показал достоверную поддержку клада (бутстрэп 100%), который объединяет штаммы *F. inositoliphila* CBS 7310 и *Rh. pinalis* VKM Y-2963, а также штамм *Fellozyma* sp. KBП 3851 (рис. 1). Выявленные вариации в сиквенсах *F. inositoliphila* CBS 7310 за разные периоды располагаются на начальном участке прочтения нуклеотидных последовательностей, поэтому они не учитывались при филогенетическом анализе. Полученные нами данные по филогении подтверждают, что виды *F. inositoliphila* и *Rh. pinalis* должны быть отнесены к одному роду. В данной работе публикуется новая комбинация для рода *Fellozyma*.

Новая комбинация для рода *Fellozyma* Q.M. Wang, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout.

Fellozyma pinalis (Golubev) Kachalkin, comb. nov. MycoBank MB842988.

Базиниум: *Rhodotorula pinalis* Golubev, Микология и Фитопатология 44(4):310. 2010.

Голотип: VKM Y-2963 (хранится в метаболически неактивном состоянии).

New combination for *Fellozyma* Q.M. Wang, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout.

Fellozyma pinalis (Golubev) Kachalkin, comb. nov. MycoBank MB842988.

Basionym: *Rhodotorula pinalis* Golubev, Mikologiya i Fitopatologiya 44(4):310. 2010.

Holotype: VKM Y-2963 (preserved in a metabolically inactive state).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1051.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голубев В.И. Новый вид *Rhodotorula*, ассимилирующий миоинозит // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. С. 310–313.
- Golubev V.I. A new myo-inositol-positive species of the genus *Rhodotorula* // Mikologiya i Fitopatologiya. 2010. V. 44. P. 310–314.
- Качалкин А.В., Глушакова А.М., Юрков А.М., Чернов И.Ю. Особенности дрожжевых группировок в филлосфере сфагновых мхов // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 533–541.
- Kachalkin A.V., Glushakova A.M., Yurkov A.M., Chernov I.Yu. Characterization of yeast groupings in the phyllosphere of sphagnum mosses // Microbiology. 2008. V. 77. P. 474–481.
- Lücking R., Aime M.C., Robbertse B., Miller A.N., Aoki T., Ariyawansa H.A., Cardinali G., Crous P.W., Druzhinina I.S., Geiser D.M., Hawksworth D.L., Hyde K.D., Irinyi L., Jeewon R., Johnston P.R., Kirk P.M., Malosso E., May T.W., Meyer W., Nilsson H.R., Öpik M., Robert V., Stadler M., Thines M., Vu D., Yurkov A.M., Zhang N., Schoch C.L. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature // Nat. Microbiol. 2021. V. 6. P. 540–548.
- Boekhout T., Amend A.S., El Baidouri F., Gabaldón T., Geml J., Mittelbach M., Robert V., Tan C.S., Turchetti B., Vu D., Wang Q.-M., Yurkov A. Trends in yeast diversity discovery // Fungal Diversity. 2021a. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>
- Boekhout T., Aime M.C., Begerow D., Gabaldón T., Heitman J., Kemler M., Khayhan K., Lachance M.-A., Louis E.J., Sun S., Vu D., Yurkov A. The evolving species concepts used for yeasts: from phenotypes and genomes to speciation networks // Fungal Diversity. 2021b. V. 109. P. 27–55.
- Fell J.W., Boekhout T., Fonseca A., Scorzetti G., Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1351–1371.
- Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // Brief. Bioinform. 2019. V. 20. P. 1160–1166.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V. 73. P. 331–371.
- Kuznetsova T.A., Veverskii M.V., Khayrullin D.R., Stepankov A.A., Maximova I.A., Kachalkin A.V., Ushakova N.A. Dramatic effect of black soldier fly larvae on fungal community in a compost // J. Sci. Food Agric. 2021. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11601>
- Li A.H., Yuan F.X., Groenewald M., Bensch K., Yurkov A.M., Li K., Han P.J., Guo L.D., Aime M.C., Sampaio J.P., Jindamorakot S., Turchetti B., Inacio J., Fungsin B., Wang Q.-M., Bai F.-Y. Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species // Stud. Mycol. 2020. V. 96. P. 17–140.
- Liu X.Z., Wang Q.-M., Göker M., Groenewald M., Kachalkin A.V., Lumbsch H.T., Millanes A.M., Wedin M., Yurkov A.M., Boekhout T., Bai F.-Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes* // Stud. Mycol. 2015a. V. 81. P. 85–147.
- Liu X.Z., Wang Q.-M., Theelen B., Groenewald M., Bai F.-Y., Boekhout T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses // Stud. Mycol. 2015b. V. 81. P. 1–26.
- McNeill J., Barrie F., Buck W., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D. et al. International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code). Königstein: Koeltz Scientific Books, 2012. 208 p.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 6241–6246.
- Scorzetti G., Fell J.W., Fonseca A., Statzell-Tallman A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions // FEMS Yeast Res. 2002. V. 2. P. 495–517.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Tedersoo L., Bahram M., Pölme S., Kõljalg U., Yorou N.S., Wijesundera R., Villarreal Ruiz L., Vasco-Palacios A.M., Thu P.Q., Suija A., Smith M.E., Sharp C., Saluveer E., Saitta A., Rosas M., Riit T., Ratkowsky D., Pritsch K., Pöldmaa K., Piepenbring M., Phosri C., Peterson M., Parts K., Pärtel K., Otsing E., Nouhra E., Njouonkou A.L., Nilsson R.H., Morgado L.N., Mayor J., May T.W., Majuakim L., Lodge D.J., Lee S.S., Larsson K.H., Kohout P., Hosaka K., Hiiesalu I., Henkel T.W., Harend H., Guo L.D., Greslebin A., Grelet G., Geml J., Gates G., Dunstan W., Dunk C., Drenkhan R., Dearnaley J., De Kesel A., Dang T., Chen X., Buegger F., Brearley F.Q., Bonito G., Anslan S., Abell S., Abarenkov K. Fungal biogeography. Global diversity and geography of soil fungi // Science. 2014. V. 346. Art. 1256688.
- Vu D., Groenewald M., Szöke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkleij G.J., Crous P.W., Boekhout T., Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.
- Wang Q.-M., Groenewald M., Takashima M., Theelen B., Han P.J., Liu X.Z., Boekhout T., Bai F.-Y. Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within *Pucciniomycotina* determined from multigene sequence analyses // Stud. Mycol. 2015b. V. 81. P. 27–53.
- Wang Q.-M., Yurkov A.M., Göker M., Lumbsch H.T., Leavitt S.D., Groenewald M., Theelen B., Liu X.Z., Boekhout T., Bai F.-Y. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Pucciniomycotina* // Stud. Mycol. 2015a. V. 81. P. 149–189.

Phylogeny of *Rhodotorula pinalis* and Its Reclassification as *Fellozyma pinalis* comb. nov.

A. V. Kachalkin^{1, 2, *}

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

²*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Science, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: kachalkin_a@mail.ru

Received February 14, 2022; revised March 4, 2022; accepted March 5, 2022

Abstract—The type strain *Rhodotorula pinalis* VKM Y-2963 has been characterized genetically and phylogenetically. The rDNA sequences obtained for the ITS region and D1/D2 domains of LSU have been deposited to NCBI GenBank (OM666053). Strains from the Moscow region, *Fellozyma* sp. KBP 3851 from *Sphagnum* mosses and *Rh. pinalis* VKM Y-2963 from dead conifer needles, were found to be conspecific. The results of phylogenetic analysis suggested that the species *Rh. pinalis* should be reassigned to the genus *Fellozyma*. The new combination, *Fellozyma pinalis* comb. nov., is proposed, MycoBank MB842988.

Keywords: yeasts, taxonomy, *Rhodotorula*, *Fellozyma*, *Chrysozymaceae*, *Pucciniomycotina*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДРОЖЖЕЙ
KLUYVEROMYCES LACTIS: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИИ© 2022 г. Л. В. Лютова^{a, b}, Г. И. Наумов^a, А. В. Шнырева^b, Е. С. Наумова^{a, *}^aНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
Курчатовский комплекс генетических исследований (ГосНИИгенетика), Москва, 123098 Россия^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
кафедра микологии и альгологии, Москва, 119991 Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 10.03.2022 г.

После доработки 25.03.2022 г.

Принята к публикации 26.03.2022 г.

Согласно современной классификации дрожжей, вид *Kluyveromyces lactis* включает две таксономические разновидности: культурные молочные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и не сбраживающие лактозу природные штаммы *K. lactis* var. *drosophilorum*. Основанное только на фенотипических и экологических критериях разделение на разновидности является достаточно условным и не отражает существующей гетерогенности вида *K. lactis*. С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа мы изучили генетическое родство 35 штаммов *K. lactis*, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. Сбраживающие лактозу дрожжи *K. lactis*, включая молочные штаммы, клинические и почвенные изоляты, имели идентичные молекулярные кариотипы, не отличались по нуклеотидным последовательностям ряда молекулярных маркеров и образовывали фертильные гибриды: 84–99% выживаемости аскоспор. С другой стороны, не сбраживающие лактозу дрожжи разделились на три генетически изолированные популяции: “krassilnikovii”, “drosophilorum” и “phaseolosporus”, которые отличаются по молекулярным кариотипам, имеют уникальные SNP-замены в гене *ACT1* и образуют полустерильные гибриды: 6–34% выживаемости аскоспор. Несмотря на значительный полиморфизм индивидуальных размеров хромосомных полос, дрожжи var. *lactis*, “krassilnikovii”, “drosophilorum” и “phaseolosporus”, по-видимому, имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести. Наибольший диапазон размеров хромосомных полос отмечен у штаммов “krassilnikovii” (1000–2900 т.п.н.), а наименьший – у “drosophilorum” (1600–2200 т.п.н.). Обращает на себя внимание биогеография дрожжей *K. lactis*. Сбраживающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* выделяются в различных регионах мира, дрожжи “drosophilorum” и “phaseolosporus” характерны только для Северной Америки, тогда как популяция “krassilnikovii” представлена европейскими и среднеазиатскими изолятами. Установлено, что на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* можно достоверно дифференцировать все четыре генетические популяции дрожжей *K. lactis*.

Ключевые слова: дрожжи *Kluyveromyces lactis*, генетические популяции, филогенетический и гибридологический анализы, молекулярное кариотипирование, ядерный ген *ACT1*

DOI: 10.31857/S002636562230019X

Дрожжи *Kluyveromyces lactis* – второй, после *Saccharomyces cerevisiae*, объект фундаментальных и прикладных исследований. Штаммы этих дрожжей выделяются из различных молочных продуктов (молоко, кефир, простокваша, ряженка, творог и др.) и природных источников (сокотечение и кора широколиственных деревьев, почва, насекомые и др.) в разных регионах мира. Несмотря на большое научное и прикладное значение дрожжей *K. lactis*, их систематика остается дискуссионной.

На основании экологических и физиологических критериев вид *K. lactis* был разделен на две

разновидности: сбраживающие лактозу культурные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и не утилизирующие лактозу природные изоляты *K. lactis* var. *drosophilorum* (Sidenberg, Lachance, 1983, 1986). К синонимам последней разновидности были отнесены таксономические виды *K. phaseolosporus* и *K. vanudenii*, принятые в определителе дрожжей 1970 г. (van der Walt, 1970). В список синонимов *K. lactis* var. *drosophilorum* также попали европейские дрожжи *Zygodospora krassilnikovii*, впервые описанные Кудрявцевым на изолятах из сокотечений дуба в Калуге (Kudrjawzew, 1960). Следует отметить, что разделение вида *K. lactis* на две физиологические

разновидности не отражает существующей гетерогенности *K. lactis* var. *drosophilorum*, продемонстрированной с помощью различных молекулярных методов: ПДРФ-анализа мтДНК, RAPD-ПЦР, секвенирования 5.8S-ITS-района рДНК и молекулярного кариотипирования (Ragnini, Fukuhara, 1988; Sor, Fukuhara, 1989; Molnar et al., 1996; Belloch et al., 1997, 1998a, 1998b, 2000, 2002; Naumov, Naumova, 2002). Показано, что штаммы *K. lactis* var. *lactis* имеют одинаковые мтДНК и RAPD-профили, идентичные ITS-последовательности и практически не отличаются по молекулярным кариотипам. Тогда как не утилизирующие лактозу дрожжи *K. lactis* var. *drosophilorum* разделились на четыре группы: *K. drosophilorum*, *K. phaseolosporus*, *K. vanudenii* и *K. lactis* var. *krassilnikovii* (*Zygozopora krassilnikovii*).

Молекулярные данные хорошо согласуются с результатами гибридологического анализа (Naumov, Naumova, 2002). Показано, что типовые культуры *K. drosophilorum*, *K. phaseolosporus* и *Zygozopora krassilnikovii* частично-генетически изолированы: их гибриды стерильны или полустерильны с выживаемостью аскоспор 0–34%. В то же время, *Z. krassilnikovii* образовывали фертильные гибриды с южноафриканскими дрожжами *K. vanudenii*: 72–90% выживаемости аскоспор. Принимая во внимание географическую изоляцию, а также литературные данные о дивергенции их молекулярных кариотипов и мтДНК-профилей (Sor, Fukuhara, 1989; Belloch et al., 1997, 1998a, 2002), было предложено рассматривать дрожжи *K. vanudenii* и *Zygozopora krassilnikovii* в качестве самостоятельных таксонов: видов или разновидностей (Belloch et al., 2002; Naumov, Naumova, 2002). На основании гибридологического анализа и молекулярного кариотипирования, а также литературных данных, была проведена таксономическая ревизия вида *K. lactis* и предложено 5 разновидностей: var. *lactis* (Лас⁺) и не утилизирующие лактозу var. *drosophilorum* (Северная Америка), var. *phaseolospora* (Северная Америка), var. *krassilnikovii* (Европа), var. *vanudenii* (Южная Африка) (Naumov, Naumova, 2002).

Однако предложенная ревизия не была принята в последующих монографиях, посвященных систематике дрожжей *Kluyveromyces*, и вид *K. lactis*, по-прежнему, был представлен двумя разновидностями var. *lactis* и var. *drosophilorum* (Lachance, 2007, 2011). В качестве объяснения было отмечено, что условное деление на две разновидности было оставлено для сохранения преимущества в литературе и в связи с неоднозначной дифференциацией не усваивающих лактозу дрожжей *K. lactis* на разновидности var. *drosophilorum*, var. *phaseolospora*, var. *krassilnikovii* и var. *vanudenii* (Lachance, 2007). На основании ПДРФ-анализа межгенного спейсера IGS2 нами ранее было идентифицировано еще четыре генетические популяции не утили-

зирующих лактозу дрожжей *K. lactis*: три в Северной Америке (“водная”, “pseudovanudenii” и “новая”) и одна на Дальнем Востоке (“восточная”) (Naumova et al., 2004).

Целью настоящего исследования является изучение генетического внутривидового полиморфизма дрожжей *K. lactis*, определение таксономического статуса дивергентных природных популяций и обнаружение молекулярных маркеров для их достоверной дифференциации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Использованные в работе штаммы и их происхождение представлены в табл. 1. Дрожжи культивировали на полной среде YPD (г/л): бакто-агар (“Difco”, США) – 20; глюкоза (“Merck”, Германия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”) – 10; бакто-пептон (“Difco”) – 20. Споруляцию индуцировали на агаризованной голодной среде с 3%-ной мальтозой (г/л): бакто-агар (“Difco”, США) – 20; мальтоза (“Sigma”, США) – 30. Ферментационная среда YP (г/л): лактоза (“Serva”, Германия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”) – 10; бакто-пептон (“Difco”) – 20. Способность сбрасывать лактозу определяли по выделению углекислого газа в жидкой среде YP в пробирках с поплавками. На всех средах дрожжи культивировали при 28°C.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Дрожжевую ДНК выделяли по протоколу, разработанному Løoke et al. (2011). Для амплификации 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2, использовали праймеры ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3') (White et al., 1990). Гены *ACT1* и *EF-1α* (фактор элонгации трансляции) амплифицировали с помощью пар праймеров KL1 (5'-GCCGGTGACGACGCTCCAAGAGCCG-3'), KL5R (5'-GTGAACGATGGATGGACCAGATTCGTCG-3') и EF2F (5'-GGTAAGGGTTCTTTCAAGTACGCTTGGG-3'), EF2R (5'-CGTTCTTGGAGTCAACCACAGACGTTACCTC-3'). Дизайн олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования генов *ACT1* и *EF-1α* осуществляли онлайн на сайте <https://www.yeastgenome.org>. ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ каждого дНТФ, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Heli-con”, Россия), 20–200 нг ДНК. Начальную денатурацию осуществляли при 94°C в течение 3 мин, затем 30 циклов в следующем режиме: денатурация при 94°C, 45 с; отжиг праймеров при 52°C, 30 с; синтез ДНК при 72°C, 120 с; конечная достройка при 72°C, 10 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5× TBE буфере (45 мМ Трис, 10 мМ

Таблица 1. Изученные штаммы дрожжей *Kluveromyces* и их происхождение

Штамм		Источник и место выделения	Популяция	
ВКМ	другие коллекции			
<i>var. lactis</i>				
Y-868 (Т)	CBS 683	Мягкий сыр, Великобритания	“lactis”	
	CBS 1797	Мокрота, Норвегия	“lactis”	
	CBS 5618	Мокрота, Норвегия	“lactis”	
	NRRL Y-1140	Сливки, США	“lactis”	
	NRRL Y-1118	Сливки, США	“lactis”	
	SM 48.7	Сыр Камамбер, Франция	“lactis”	
	ВКПМ Y-3737	Почва, Москва, Россия	“lactis”	
	Y-762	CBS 141	Сливки, США	“lactis”
	Y-869		Кислое молоко, Кольский п-ов, Россия	“lactis”
	Y-870		Чал (кисломолочный напиток из верблюжьего молока), Туркмения	“lactis”
Y-1186		Молоко, Киев, Украина	“lactis”	
Y-1527	CBS 4574	Мокрота, Испания	“lactis”	
Y-1333		Кислое молоко, Ставропольский край, Россия	“lactis”	
Y-1339		Сметана, Санкт-Петербург, Россия	“lactis”	
Y-1343		Молоко, Гомельская обл., Беларусь	“lactis”	
Y-1868		Чал (кисломолочный напиток из верблюжьего молока), Туркмения	“lactis”	
<i>var. drosophilarum</i>				
Y-1302 (Т)	CBS 2105	<i>Drosophila azteca</i> , Калифорния, США	“drosophilarum”	
	UWOPS 79-169	<i>Prunus virginiana</i> , Онтарио, Канада	“drosophilarum”	
	UWOPS 79-261	<i>Prunus virginiana</i> , Онтарио, Канада	“drosophilarum”	
	UWOPS 82-233	<i>Drosophila</i> sp., Онтарио, Канада	“drosophilarum”	
	UWOPS 80-45	<i>Prunus virginiana</i> , Онтарио, Канада	“новая”	
Y-1296	UWOPS 85-256.1	Дуб, Аризона, США	“новая”	
	CBS 2103	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	“phaseolosporus”	
	UCDFST 51-272	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	“phaseolosporus”	
	UCDFST 61-200	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	“phaseolosporus”	
Y-831	CBS 8883	Сокотечение дуба, Калуга, Россия	“krassilnikovii”	
Y-834	CBS 9056	Сокотечение дуба, Калуга, Россия	“krassilnikovii”	
	CBS 9057	Сокотечение дуба, Эстония	“krassilnikovii”	
	CBS 9058	Сокотечение дуба, Воронеж, Россия	“krassilnikovii”	
	СЕСТ 1122	Буровая мука, Испания	“krassilnikovii”	
	CBS 2877	Кишечник коровы, Португалия	“krassilnikovii”	
	CBS 2896	Сокотечение дуба, Калуга, Россия	“krassilnikovii”	
	Y-1535	CBS 4372	Винный подвал, ЮАР	“vanudenii”
	UCM Y-1891	Кишечник осы <i>Dolichovespula saxonica</i> , Таджикистан	“krassilnikovii”	
	UCM Y-1892	Кишечник осы <i>Dolichovespula saxonica</i> , Таджикистан	“krassilnikovii”	
<i>Kluveromyces marxianus</i>				
Y-876	CBS 712 (Т)	Неизвестно		

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино, Москва; ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва, Россия; CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды; SM – J.P. Schmidt, Institut National Agronomique, Париж-Гриньон, Франция; NRRL – USDA-ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Пеория, США; UCM – Украинская коллекция микроорганизмов, Институт микробиологии и вирусологии НАН, Киев, Украина; UCDFST – Phaff Yeast Collection, University of California, Дэвис, США; UWOPS – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario, Лондон, Онтарио, Канада; СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia, Валенсия, Испания. Соответствие штаммов различных коллекций: NRRL Y-1140 = CBS 2359, NRRL Y-1118 = CBS 6315. Т – типовая культура.

ЭДТА, 45 мМ борная кислота; рН 8.0) в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher”, США).

Для амплификации межгенного спейсера 2 (IGS2) рДНК использовали праймеры NTS2 (5'-AACGGTGCTTTCTGGTAG-3') и ETS1 (5'-TGTCTTCAACTGCTTT-3') (Nguyen et al., 2000). ПЦР (25 циклов) осуществляли в следующем режиме: денатурация ДНК при 94°C, 1 мин; отжиг праймеров при 48°C, 30 с; синтез ДНК при 72°C, 60 с. Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) осуществляли с помощью эндонуклеазы *AluI* (“Fermentas”, Литва). Разделение фрагментов рестрикции проводили в 2.5%-ном агарозном геле при 50–55 В в 0.5×ТВЕ буфере в течение 4 ч. Гель окрашивали бромистым этидием в течение 2–3 ч, затем промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция).

Секвенирование. Амплифицированные фрагменты домена 5.8S-ITS района рДНК, генов *ACT1* и *EF-1α* элюировали из геля с помощью набора Cleanup Mini (“Евроген”, Москва) согласно протоколу фирмы изготовителя. Нуклеотидные последовательности 5.8S-ITS, генов *ACT1* и *EF-1α*, были определены по двум цепям с помощью пар праймеров ITS1/ITS4, KL1/KL5R и EF2F/EF2R соответственно с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США).

Филогенетический анализ. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программы SeqMan package (“DNA Star Inc.”, США). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями проводили в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с помощью программы BLAST. Множественные выравнивания изученных нуклеотидных последовательностей проводили, используя программу BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). В качестве внешней группы использовали типовую культуру дрожжей *Kluyveromyces marxianus* CBS 712. Индексы бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, определяли для 1000 псевдореплик.

Молекулярное кариотипирование. Условия приготовления препаратов хромосомной ДНК описаны ранее (Наумова и соавт., 2005). Электрофоретическое разделение хромосомных ДНК проводили на аппарате CHEF-DR III фирмы “Bio-Rad”

(США). Для оптимального разделения хромосомных полос дрожжей использовали два различных режима кариотипирования: 1) 175 В, в течение 8 ч при времени переключения полей 40–120 с; 130 В, в течение 24 ч при времени переключения полей 120–360 с; 100 В, в течение 8 ч при времени переключения полей 360–1200 с. Использовали 0.8%-ю агарозу; 2) 65 В, в течение 50 ч при времени переключения полей 1600–2000 с; 70 В, в течение 48 ч при времени переключения полей 800–1600 с; 75 В, в течение 22 ч при времени переключения полей 120–600 с. Использовали 1.2%-ю агарозу.

В качестве буфера применяли 0.5×ТВЕ (45 мМ Трис, 45 мМ борная кислота, 10 мМ ЭДТА; рН 8.2), охлажденный до 14°C. В качестве кариотипических стандартов использовали коммерческие препараты ДНК штаммов *S. cerevisiae* YNN 295 (=ATCC 20358) и *Wickerhamomyces canadensis* (син. *Hansenula wingei*) YB-4662-VIA (=ATCC 28162) (“Bio-Rad”, США), имеющие известные размеры и порядок хромосом. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция).

Гибридологический анализ. Высокофертильные моноспоровые культуры изучаемых штаммов маркировали ауксотрофными мутациями с помощью УФ-облучения. Спонтанные ауксотрофные мутации *ura* отбирали на селективной среде, содержащей 5'-фтороротовую кислоту (5-FOA) (Voewe, 1984).

Суточные культуры штаммов с комплементарными селективными ауксотрофными маркерами наносили “крест-накрест” бархатным репликатором с полной среды на голодную среду с мальтозой, а через 1 сут инкубирования дрожжи вновь переносили бархатным репликатором на минимальную среду (г/л): азотная основа без аминокислот (“Difco”, США) – 6.7, бакто-агар (“Difco”) – 20, глюкоза (“Реахим”, Россия) – 20. Рост гибридных колоний регистрировали через 2–3 сут на пересечении штрихов. Гибриды клонировали на минимальной среде для гарантии освобождения от ауксотрофных родительских культур. Выросшие на минимальной среде клоны гибридов пересевали штрихами на YPD среду и через 1 сут переносили на мальтозную среду для спорообразования. Изоляцию спор гибридов проводили с помощью микроманипулятора. Оболочки асков разрушали ферментным препаратом из желудка виноградной улитки *Helix pomatia*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объектом исследования служили 35 штаммов *Kluyveromyces lactis*, выделенных из различных мо-

лочных продуктов и природных источников в разных регионах мира: Европе (Россия, Украина, Беларусь, Эстония, Великобритания, Франция, Норвегия, Испания, Португалия), Средней Азии (Туркмения, Таджикистан), США, Канада и ЮАР (табл. 1).

ПДРФ-анализ IGS2 района рДНК. По сходству *AluI*-профилей изученные штаммы были разделены на пять групп (рис. 1). Идентичные паттерны имели штаммы var. *lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 (дорожки 1–3 и 4). Во вторую группу вошли европейские природные изоляты популяции “krassilnikovii”, а также выделенные в Таджикистане штаммы UCM Y-1891 и UCM Y-1892 (рис. 1, дорожки 5–8 и 9, 10 соответственно). Остальные три группы образованы штаммами североамериканских популяций: “*drosophilum*”, “новая” и “*phaseolosporus*” (рис. 1, дорожки 11–13, 14, 15 и 16–18). Дальнейшее изучение внутривидового молекулярного полиморфизма дрожжей *K. lactis* проводили с помощью мультигенного филогенетического анализа и молекулярного карiotипирования.

Мультигенный филогенетический анализ. Для установления филогенетического родства 35 изученных штаммов *K. lactis* мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента рДНК, генов *EF-1 α* и *ACT1*. В анализ были включены типовые культуры *K. lactis* var. *lactis* CBS 683 и *K. lactis* var. *drosophilum* CBS 2105, а также штамм, выделенный из молока, NRRL Y-1140, у которого определена полная нуклеотидная последовательность генома.

Мы провели секвенирование 5.8S-ITS-фрагмента у 11 штаммов *K. lactis* var. *lactis* (SM 48.7, CBS 1797, ВКПМ Y-3737, NRRL Y-1118, ВКМ Y-869, ВКМ Y-870, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339, ВКМ Y-1343, ВКМ Y-1868) и трех штаммов *K. lactis* var. *drosophilum* (CBS 2877, UCM Y-1891 и UCM Y-1892). ITS-последовательности остальных изученных штаммов были взяты из компьютерной базы данных GenBank. На основании сходства нуклеотидных последовательностей изученные штаммы разделились на две группы. В первую группу вошли 26 штаммов, включая 16 штаммов var. *lactis*, 7 штаммов европейской популяции “krassilnikovii”, среднеазиатские изоляты UCM Y-1891 и UCM Y-1892, а также типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. ITS-последовательности указанных штаммов были идентичны или отличались 1–4 нуклеотидными заменами. Наибольшее количество замен имел штамм var. *lactis* ВКМ Y-870, выделенный из чала в Туркмении. Вторая группа образована 9 североамериканскими штаммами популяций “*drosophilum*”, “*phaseolosporus*” и “новая”. У всех штаммов этой группы имеется характерная транзигия С → Т в 69 позиции (согласно нумерации

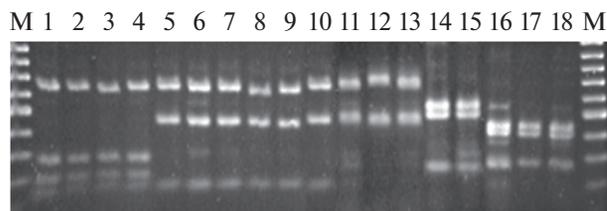


Рис. 1. ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 рДНК штаммов *Kluyveromyces lactis* с помощью эндонуклеазы *AluI*. *K. lactis* var. *lactis*: 1 – ВКМ Y-868 (Т), 2 – NRRL Y-1140, 3 – ВКПМ Y-3737; “*vanudenii*”: 4 – ВКМ Y-1535 (Т); “krassilnikovii”: 5 – ВКМ Y-831 (Т), 6 – ВКМ Y-834, 7 – СЕСТ 1122, 8 – CBS 9058; “среднеазиатская”: 9 – UCM Y-1891, 10 – UCM Y-1892; *K. lactis* var. *drosophilum*: 11 – ВКМ Y-1302 (Т), 12 – UWO(PS) 79-261, 13 – UWO(PS) 82-233; “новая”: 14 – UWO(PS) 80-45, 15 – UWO 85-256.1; “*phaseolosporus*”: 16 – ВКМ Y-1296 (Т), 17 – UCDFST 51-272, 18 – UCDFST 61-200; М – маркер молекулярных весов (п.н.) 100 bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

последовательности типовой культуры *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868).

У всех штаммов были определены нуклеотидные последовательности генов *EF-1 α* и *ACT1*. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с соответствующими последовательностями *K. lactis* var. *lactis* CBS 683, NRRL Y-1140 и *K. lactis* var. *drosophilum* CBS 2105, имеющимися в GenBank. Идентичные *EF-1 α* -последовательности имеют сбразивающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. С другой стороны, у всех европейских, среднеазиатских и североамериканских Лас⁻ штаммов имеется общая транзигия Т → С в 661 позиции (согласно нумерации последовательности типовой культуры ВКМ Y-868), а у штаммов популяции “*phaseolosporus*” (ВКМ Y-1296, UCDFST 51-272 и UCDFST 61-200) выявлены дополнительные уникальные замены С → Т в 139 и 184 позициях.

Нуклеотидные последовательности гена *ACT1* оказались более вариабельными (более 20 замен), что позволило дифференцировать разные популяции дрожжей *K. lactis* (рис. 2). Штаммы var. *lactis* имеют идентичные *ACT1*-последовательности или отличаются 1–2 нуклеотидными заменами. Типовые культуры *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868 и *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 также имеют идентичные последовательности гена *ACT1*. Все остальные не утилизирующие лактозу штаммы характеризуются тремя общими транзигиями: Т → С (121 и 484 позиции) и А → G (196 позиция). Штаммы популяции “krassilnikovii” и среднеазиатские изоляты UCM Y-1891, UCM Y-1892 имеют идентичные *ACT1*-последовательности с уникальной транзигией G → А в 394 позиции. У всех штаммов популяций “*drosophilum*” и “новая” выявлено 8 уникальных одонуклеотидных замен, SNP (от английско-

	<i>ACT1</i>																			
	1	37	67	73	121	196	247	259	325	328	394	400	424	484	505	508	616	631	661	925
1. ВКМ Y-868 (Т)	С	Т	А	С	Т	А	С	Т	С	Т	Г	С	Т	Т	С	С	С	С	Т	Т
2. ВКМ Y-1535
3. ВКМ Y-831	С	Г	.	.	.	А	.	.	С
4. UCM 1891	С	Г	.	.	.	А	.	.	С
5. ВКМ Y-1302 (Т)	.	.	Г	Т	С	Г	.	С	.	С	.	.	С	С	.	Т	Т	.	.	С
6. UWO 80-45	.	.	Г	Т	С	Г	.	С	.	С	.	.	С	С	.	Т	Т	.	.	С
7. ВКМ Y-1296	Т	А	.	.	С	Г	Т	.	Т	А	.	Т	.	С	Т	.	.	Т	С	.
8. UCDFST 61-200	Т	А	.	.	С	Г	Т	.	Т	А	.	Т	.	С	Т	.	.	Т	С	.

Рис. 2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* генетических популяций дрожжей *K. lactis*: 1 – *K. lactis* var. *lactis*, 2 – “vanudenii”, 3 – “krassilnikovii”, 4 – “среднеазиатская”, 5 – var. *drosophilum*, 6 – “новая”, 7 и 8 – “phaseolosporus”. Идентичные нуклеотидные последовательности обозначены точками. Нумерация последовательностей приводится по типовой культуре *K. lactis* var. *lactis* (ВКМ Y-868). Т – типовая культура.

го Single Nucleotide Polymorphism). Наибольшее количество SNP обнаружено в *ACT1*-последовательностях типовой культуры *K. phaseolosporus* ВКМ Y-1296 и штаммов UCDFST 51-272, UCDFST 61-200: семь транзиций и две трансверсии Т → А в 37 и 328 позициях (рис. 2).

На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента, генов *EF-1α* и *ACT1* было построено филогенетическое древо (рис. 3). В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Изученные штаммы разделились на четыре кластера. В первом кластере с 96%-ной статистической поддержкой объединились сбрасывающие лактозу штаммы var. *lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. Второй кластер сформировали среднеазиатские изоляты и штаммы европейской популяции “krassilnikovii”, имеющие идентичные ITS, *EF-1α* и *ACT1* последовательности. Только у штамма CBS 9059 имеется транзиция С → Т в 463 позиции гена *EF-1α*.

В третьем кластере (97% статистической поддержки) объединились штаммы популяций “новая” и “drosophilum”, включая типовую культуру ВКМ Y-1302. Четвертый кластер (99% статистической поддержки) образован наиболее дивергентной популяцией “phaseolosporus” (рис. 3).

Молекулярное кариотипирование. Ранее использованные Belloch et al. (1998a, 2002) условия пульс-электрофореза не позволили добиться хорошего разделения хромосомных полос. Поэтому для достижения оптимального разделения хромосомных полос дрожжей *K. lactis* мы использовали два режима кариотипирования: 40-часовой и 120-часовой, представленные в разделе “Материалы и методы исследования”. Размеры хромосом определяли по кариотипическим стандартам *S. cerevisiae* YNN 295 и *W. canadensis* YB-4662-VIA. Молекулярные кариотипы некоторых штаммов при использовании 40-часового режима представле-

ны на рис. 4. Схема молекулярных кариотипов дрожжей *K. lactis*, составленная на основании двух электрофоретических режимов, приведена на рис. 5.

При использовании 40-часового электрофоретического режима ДНК изученных штаммов разделилась на 3–5 полос размером от 1100 до 2900 т.п.н. (рис. 4). Дрожжи var. *lactis* и природные европейские штаммы популяции “krassilnikovii” имеют практически идентичные кариотипы с пятью хромосомными полосами размером от 1000 до 2600 т.п.н. (рис. 4, дорожки 3–8). Отмечен незначительный полиморфизм размеров второй и третьей (снизу геля) хромосомных полос. Согласно интенсивности свечения окрашенных бромистым этидием электрофоретических полос, третья снизу полоса, по-видимому, содержит две хромосомы.

Хромосомная ДНК типовой культуры *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 и среднеазиатских штаммов UCM Y-1891, UCM Y-1892 также разделилась на пять хромосомных полос (рис. 4, дорожки 9–11). Для указанных штаммов характерно наличие трех хромосомных полос в диапазоне 1000–1600 т.п.н., вместо двух у штаммов var. *lactis* и популяции “krassilnikovii” (рис. 4). Кариотипический профиль *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 характеризуется наличием хромосомной полосы размером ~2700 т.п.н., а в кариотипе среднеазиатских штаммов самая верхняя хромосомная полоса имеет размер ~2900 т.п.н. (рис. 4, дорожки 9, 10 и 11). С помощью 120-часового режима кариотипирования было установлено, что у штамма ВКМ Y-1535 четвертая снизу полоса содержит две хромосомы (рис. 5).

Наименьший диапазон размеров хромосомных полос характерен для кариотипа типовой культуры *K. lactis* var. *drosophilum* ВКМ Y-1302. Хромосомная ДНК этого штамма разделилась на четыре хромосомные полосы размером от 1600 до 2200 т.п.н. (рис. 4, дорожка 12). Самая верхняя и

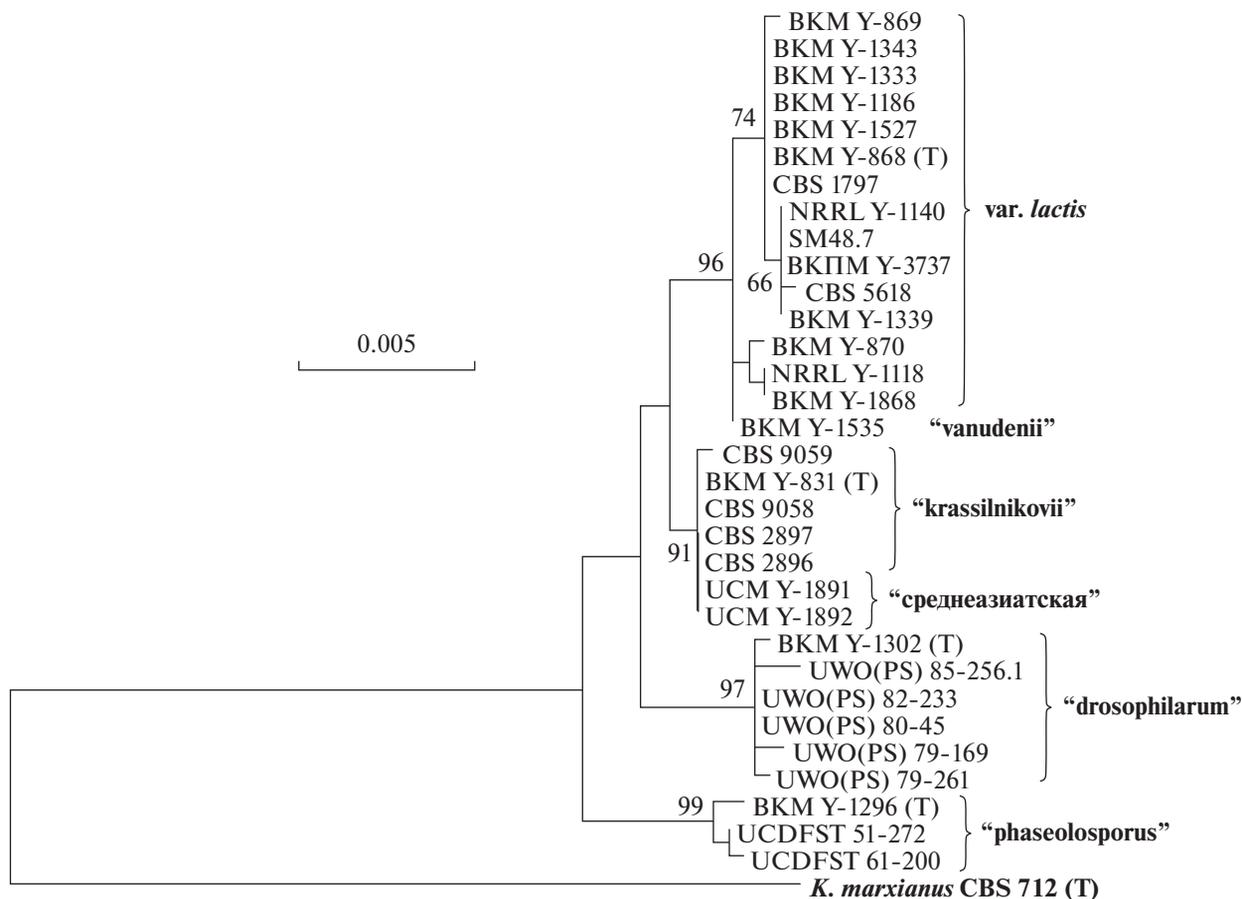


Рис. 3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-участка, фактора элонгации EF-1 α и гена *ACT1* различных популяций дрожжей *Kluyveromyces lactis*. Приводятся значения бутстрэпа >70%. Шкала соответствует 5 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Т – типовая культура.

нижняя полосы, по-видимому, двойные. Такой же кариотипический профиль имеет штамм UWOPS 80-45 из популяции “новая” (рис. 4, дорожка 14). Уникальный кариотип имеет типовая культура *K. phaseolosporus* ВКМ Y-1296 (рис. 4, дорожка 13). Хромосомная ДНК этого штамма разделилась на три полосы размером от 1100 до 2500 т.п.н. Согласно интенсивности свечения, окрашенных бромистым этидием электрофоретических полос, все три полосы, по-видимому, двойные.

Таким образом, несмотря на значительный полиморфизм индивидуальных размеров электрофоретических полос, все изученные штаммы, по-видимому, имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести.

Для определения генетического родства различных популяций и установления таксономического статуса среднеазиатских штаммов мы провели гибринологический анализ.

Гибридизационный анализ. В опытах по гибридизации использовали высокофертильные моноспоровые культуры гомоталлических штаммов ВКМ

Y-1296, ВКМ Y-1302, ВКМ Y-1535, ВКМ Y-1333, CBS 9058, UCDFST 61-200, UCM Y-1891 и моноколониальные клоны гетероталлических дрожжей NRRL Y-1118, NRRL Y-1140 и ВКМ Y-1339. Ауксотрофные мутанты получали с помощью УФ-облучения или на селективной 5-FOA-среде. Принимая во внимание гаплонтный жизненный цикл дрожжей *K. lactis*, комплементарные ауксотрофные мутанты были скрещены на голодной мальтозной среде с последующим отбором прототрофных гибридов на минимальной среде. Генетическое родство изученных штаммов определяли по жизнеспособности полового гибридного потомства (аскоспор) и рекомбинации контрольных родительских маркеров-ауксотрофностей (табл. 2). Все гибриды между штаммами var. *lactis* NRRL Y-1140, NRRL Y-1118, ВКМ Y-1333 и ВКМ Y-1339 были высокофертильны, с выживаемостью аскоспор 84–97% и регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров (табл. 2, гибриды № 1–4). Высокую выживаемость аскоспор (93%) также имел гибрид “krassilnikovii” \times var. *lactis*

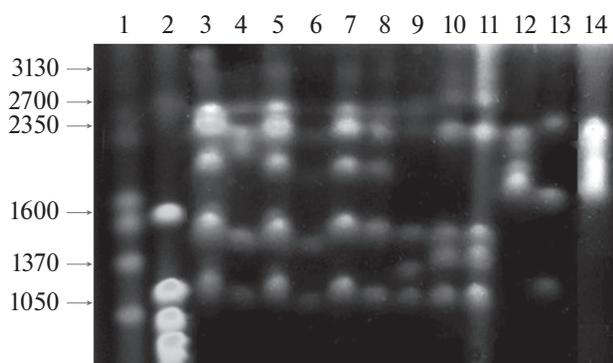


Рис. 4. Молекулярные кариотипы генетических популяций *Kluyveromyces lactis* при использовании 40-часового электрофоретического режима. Дорожки: *K. lactis* var. *lactis*: 3 – ВКМ Y-868, 4 – NRRL Y-1140; 5 – SM 48.7; 6 – ВКПМ Y-3737; “krassilnikovii”: 7 – ВКМ Y-831, 8 – CBS 9058; 9 – “vanudenii” ВКМ Y-1535; “среднеазиатская”: 10 – UCM Y-1891, 11 – UCM Y-1892; 12 – var. *drosophilarum* ВКМ Y-1302; 13 – “phaseolosporus” ВКМ Y-1296; 14 – “новая” UWOPS 80-45. Хромосомные стандарты: 1 – *Hansenula wingeei* YB-4662-VIA; 2 – *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295. Размеры хромосом (т.п.н.) приведены по стандартным штаммам.

(табл. 2, гибрид № 5). Хотя выживаемость аскоспор гибридов штамма UCM Y-1891 с var. *lactis* NRRL Y-1140 и *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 была несколько ниже (76 и 64% соответственно), также наблюдалась регулярная мейотическая сегрегация контрольных ауксотрофных маркеров (табл. 2, гибриды № 6 и 7).

Напротив, гибрид UCM Y-1891 × *K. drosophilarum* ВКМ Y-1302 имел низкую выживаемость аскоспор: 16% (табл. 2, гибрид № 8). Ранее нами было показано, что *K. drosophilarum* ВКМ Y-1302 образует со штаммами var. *lactis*, “krassilnikovii” и *K. vanudenii* полустерильные гибриды, имеющие, как правило, аномальную мейотическую сегрегацию контрольных маркеров (Naumov, Naumova, 2002).

На рис. 6 приведены суммарные результаты гибридологического анализа различных популяций дрожжей *K. lactis*, включая полученные в данной работе и ранее опубликованные данные (Naumov, Naumova, 2002). По выживаемости гибридных аскоспор изученные популяции разделились на две группы (рис. 6). Штаммы var. *lactis*, “krassilnikovii”, типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 и среднеазиатские изоляты образуют фертильные гибриды (64–96% выживаемости аскоспор) с регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров.

Во вторую группу попали штаммы североамериканских популяций “*drosophilarum*” и “*phaseolosporus*”, образующие полустерильные гибриды: 12–24% выживаемости аскоспор (рис. 6). Гибриды между “*phaseolosporus*” и популяциями первой

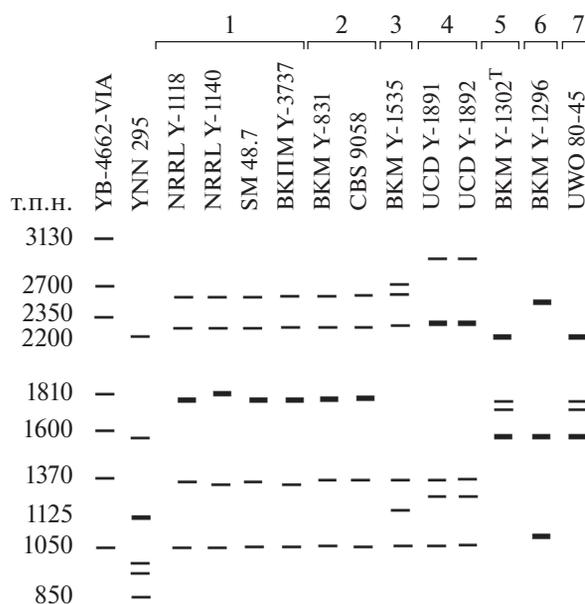


Рис. 5. Суммарная схема молекулярных кариотипов дрожжей *K. lactis*: 1 – *K. lactis* var. *lactis*, 2 – “krassilnikovii”, 3 – “vanudenii”, 4 – “среднеазиатская”, 5 – var. *drosophilarum*, 6 – “phaseolosporus”, 7 – “новая”. Размеры хромосомных полос (т.п.н.) приводятся по стандартным штаммам *S. cerevisiae* YNN 295 и *H. wingeei* YB-4662-VIA. Использовались 40- и 120-часовые режима кариотипирования.

группы были стерильны или имели очень низкую выживаемость аскоспор: 0–20%. Гибриды “*drosophilarum*” × “*vanudenii*”, “*drosophilarum*” × “*среднеазиатская*”, “*drosophilarum*” × “*krassilnikovii*” и “*drosophilarum*” × var. *lactis* также были полустерильными: 6–9, 16, 20–34 и 10–45% выживаемости аскоспор соответственно. При этом, во всех комбинациях наблюдалось нерегулярное расщепление ауксотрофных маркеров. Даже в случае сравнительно высокой выживаемости полных тетрад (45%), отмеченной в некоторых комбинациях скрещиваний “*drosophilarum*” × var. *lactis*, не наблюдалось рекомбинации родительских ауксотрофных маркеров (Naumov, Naumova, 2002). Следует отметить, что внутривидовые гибриды “*phaseolosporus*” × “*phaseolosporus*” и “*drosophilarum*” × “*drosophilarum*” имели высокую выживаемость аскоспор (63–98 и 97–100% соответственно) и характеризовались нормальной дигенной сегрегацией контрольных маркеров ауксотрофности (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное молекулярно-генетическое исследование показало сложное строение вида *K. lactis* и подтвердило правильность выделения сбразживающих лактозу штаммов в отдельную разновидность *K. lactis* var. *lactis*, предложенную на основании фи-

Таблица 2. Тетрадный анализ внутри- и межпопуляционных гибридов *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (NRRL Y-1118, NRRL Y-1140, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339), var. *drosophilarum* (ВКМ Y-1302), “phaseolosporus” (ВКМ Y-1296, UCDFST 61-200), “krassilnikovii” (CBS 9058), “vanudenii” (ВКМ Y-1535) и “среднеазиатская” (UCM Y-1891)

№ гибрида	Гибриды	Число тетрад	Жизнеспособность спор, %	Расщепление* аВ : Ab : АВ : ab	Генотипы гибридов
<i>var. lactis</i> × <i>var. lactis</i>					
1	1118 (<i>lys</i>) × 1333 (<i>met9</i>)	82	91	11P : 8N : 39T	<i>MATα lys MET9/LYS met9</i>
2	1140 (<i>his</i>) × 1333 (<i>met9</i>)	82	88	9P : 6N : 33T	<i>MATα his MET9/HIS met9</i>
3	1118 (<i>lys</i>) × 1339 (<i>met5</i>)	85	84	9P : 5N : 19T	<i>MATα lys MET5/MATα LYS met5</i>
4	1333 (<i>trp7</i>) × 1339 (<i>met5</i>)	43	97	10P : 6N : 24T	<i>trp7 MET5/MATα TRP7 met5</i>
“krassilnikovii” × <i>var. lactis</i>					
5	9058 (<i>ura6-2</i>) × 1140 (<i>his</i>)	35	93	3P : 5N : 18T	<i>ura6-2 HIS/MATα URA6-2 his</i>
“среднеазиатская” × <i>var. lactis</i>					
6	1891 (<i>ura</i>) × 1140 (<i>his</i>)	30	76	4P : 4N : 9T	<i>ura HIS/MATα URA his</i>
“среднеазиатская” × “vanudenii”					
7	1891 (<i>ura</i>) × 1535 (<i>lys</i>)	25	64	3 : 14 : 28 : 19	<i>lys URA/LYS ura</i>
“среднеазиатская” × <i>var. drosophilarum</i>					
8	1891 (<i>ura</i>) × 1302 (<i>his1</i>)	11	16	2 : 2 : 2 : 1	<i>ura HIS1/URA his1</i>
“phaseolosporus” × “phaseolosporus”					
9	1296 (<i>lys</i>) × 61–200 (<i>ura</i>)	24	63	2P : 2N : 4T	<i>lys URA/LYS ura</i>

* P, N, T – тетрады родительского, неродительского дитипов и тетратипа соответственно. a, b – аукотрофности первого (до знака скрещиваемости) и второго родителя соответственно; A, B – прототрофности.

зиологических и экологических критериев (Sidenberg, Lachance, 1983, 1986; Lachance, 2011). Штаммы *var. lactis* имеют идентичные IGS2-ПДРФ-паттерны и молекулярные кариотипы, не отличаются по нуклеотидным последовательностям ряда молекулярных маркеров и образуют фертильные гибриды: 84–99% выживаемости аскоспор. К этой разновидности относятся штаммы, выделенные из различных молочных продуктов, клинические изоляты и почвенный штамм ВКПМ Y-3737 (табл. 1). Сбраживающие лактозу дрожжи ассоциированы с молочными продуктами и млекопитающими и, по-видимому, являются родоначальниками клинических изолятов. Ранее нами было установлено, что молочные и госпитальные штаммы также имеют идентичные ПЦР-профили с микросателлитным праймером (GTG)₅ (Наумова и соавт., 2005). Согласно литературным данным, клинические изоляты *Saccharomyces cerevisiae* по многим молекулярным маркерам не отличаются от пекарских штаммов и, очевидно, происходят от них (Hennequin et al., 2001; de Llanos et al., 2004; Imre et al., 2019). Сбраживающий лактозу штамм ВКПМ Y-3737 был выделен из почвы в Измайловском парке Москвы (Наумов и соавт., 2014). Этот штамм по всем изученным молекулярным маркерам не отличается от типовой культуры *var. lactis* ВКМ Y-868. По-видимому, молочные дрожжи в природе могут распространяться с участием ди-

ких млекопитающих, кормящих потомство молоком. Другим источником их распространения в природе может быть молочное скотоводство.

С другой стороны, полученные нами молекулярные и генетические данные указывают на то, что не сбраживающие лактозу дрожжи разновидности *K. lactis* var. *drosophilarum* относятся к трем генетически изолированным популяциям: “krassilnikovii”, “drosophilarum” и “phaseolosporus”. Указанные популяции характеризуются различными молекулярными кариотипами, уникальными SNP-заменами в гене *ACT1* и образуют полустерильные гибриды: 6–34% выживаемости аскоспор. К популяции “krassilnikovii” относятся европейские и среднеазиатские изоляты, тогда как популяции “drosophilarum” и “phaseolosporus” представлены североамериканскими штаммами. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Типовые культуры *K. drosophilarum* ВКМ Y-1302 и *K. phaseolosporus* ВКМ Y-1296 имеют 70–83.4% ДНК–ДНК реассоциации, а с типовой культурой *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868: 70–79.9 и 70–90.2% соответственно (Martini, 1973; Fuson et al., 1987). Гибриды *var. lactis* × “drosophilarum” и *var. lactis* × “phaseolosporus” полностью стерильны или имеют низкую выживаемость аскоспор: 0–45% (Naumov, Naumova, 2002). Следует отметить высокую выживаемость аскоспор (66–96%) при гибридизации различных штаммов “krassil-

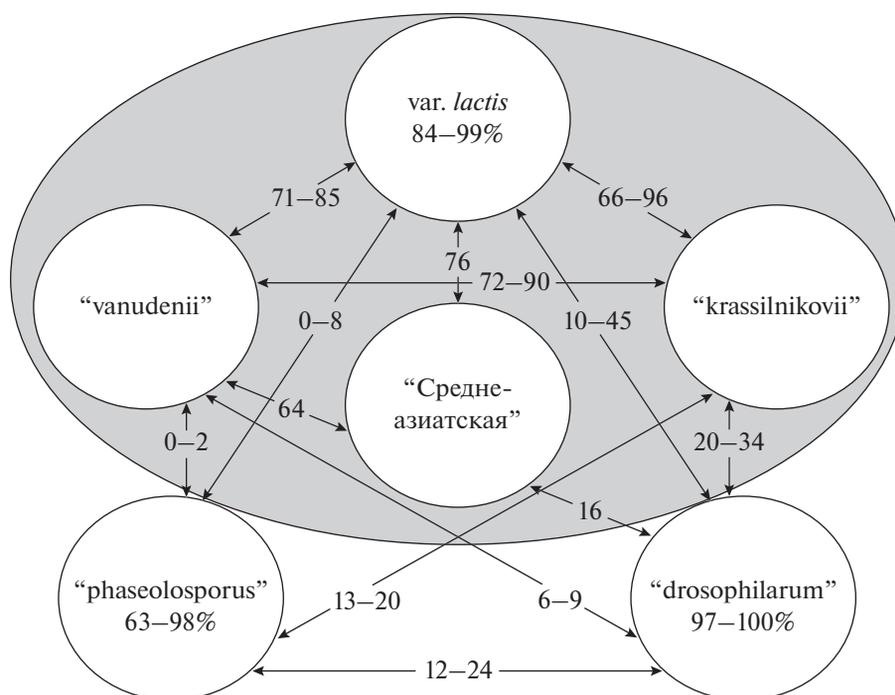


Рис. 6. Суммарные результаты гибридологического анализа генетических популяций дрожжей *Kluyveromyces lactis* (Naumov, Naumova, 2002; настоящее исследование).

nikovii” (ВКМ Y-831, ВКМ Y-834, CBS 2877, CBS 2896, CBS 9057, CBS 9058 и СЕСТ 1122) и *var. lactis* NRRL Y-1140 и NRRL Y-1118, которая сопоставима с фертильностью при скрещивании разных штаммов *var. lactis*: 84–99% (Naumov, Naumova, 2002; настоящее исследование). Полное отсутствие генетической изоляции указывает на то, что природные изоляты “krassilnikovii” являются прародителями культурных молочных дрожжей *K. lactis var. lactis* (Наумов, 2000; Наумов и соавт., 2006). Особое внимание заслуживают не утилизирующие лактозу дрожжи *K. vanudenii*, образующие фертильные гибриды с *var. lactis* и популяцией “krassilnikovii”, включая среднеазиатские штаммы: 64–90% (рис. 6). *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 не отличается от типовой культуры *K. lactis var. lactis* ВКМ Y-868 по IGS2-паттернам, ITS, *EF-1α* и *ACT1* последовательностям. Штамм ВКМ Y-1535 имеет 97% ДНК–ДНК реассоциации с типовой культурой *K. lactis var. lactis* ВКМ Y-868, что сопоставимо с ДНК–ДНК реассоциацией разных штаммов *var. lactis*: 96–100% (Bicknell, Douglas, 1970; Martini, 1973; Fuson et al., 1987). По молекулярному кариотипу дрожжи *K. vanudenii* наиболее сходны со среднеазиатскими штаммами популяции “krassilnikovii”. Полногеномное секвенирование этих дрожжей и последующий сравнительный анализ с геномом штамма *K. lactis var. lactis* NRRL Y-1140 поможет прояснить таксономический статус *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. Принимая во внимание средиземноморское происхождение винных дрож-

жей (Almeida et al., 2015), дрожжи *K. vanudenii* ВКМ Y-1535, выделенные с оборудования винограда в Южной Африке, также могут иметь европейское происхождение.

В современной систематике для видовой идентификации аскомицетовых дрожжей используется филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ряда молекулярных маркеров (баркодов), прежде всего домена D1/D2 гена 26S рРНК и 5.8S-ITS-фрагмента (Schoch et al., 2012; Vu et al., 2016). Последний маркер используется также для изучения внутривидовой изменчивости различных дрожжей и дифференциации генетических популяций. Сравнительный анализ дискриминационного потенциала трех использованных нами молекулярных маркеров показал, что с помощью ITS-участка и гена *EF-1α* можно четко разделить штаммы *K. lactis var. lactis* от не усваивающих лактозу популяций “krassilnikovii”, “drosophilorum” и “phaseolosporus”. В то же время, все четыре генетические популяции могут быть дифференцированы только на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1*. На примере различных родов аскомицетных дрожжей было показано, что, во многих случаях, ген *ACT1* является предпочтительным маркером по сравнению с последовательностями рДНК (Daniel, Meyer, 2003). Принимая во внимание, что в GenBank уже имеется достаточно обширная база данных дрожжевых последовательностей гена *ACT1*, этот мар-

кер может быть рекомендован для идентификации внутривидовых популяций дрожжей *K. lactis*.

Молекулярно-генетическое изучение не утилизирующих лактозу штаммов из североамериканской (“водная” и “pseudovanudenii”) и дальневосточной (“восточная”) популяций (Naumova et al., 2004) позволит установить их таксономический статус и разработать формальную классификацию вида *K. lactis*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было поддержано совместным российско-тайваньским грантом РФФИ (№ 18-54-52002МНТ_а).

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

- Наумов Г.И. Дикий европейский вид *Zygofabospora krassilnikovii* – прародитель молочных дрожжей *Z. lactis* // Доклады АН. 2000. Т. 372. С. 846–849.
- Naumov G.I. Wild European species *Zygofabospora krassilnikovii* is an ancestor of the dairy yeast *Z. lactis* // Dokl. Biol. Sci. 2000. V. 372. P. 321–324.
- Наумов Г.И., Наумова Е.С., Баррио Е., Керол А. Генетическое и молекулярное изучение неспособности дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilorum* сбраживать лактозу // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 299–304.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Barrio E., Querol A. Genetic and molecular study of inability of the yeast *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilorum* to ferment lactose // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 248–252.
- Наумов Г.И., Наумова Е.С., Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. Обнаружение молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* в природе // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 677–681.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Yu. Finding of dairy yeasts *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* in natural habitats // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 782–786.
- Наумова Е.С., Сухотина Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярные маркеры, дифференцирующие молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* от их ближайших диких родственников – европейской популяции “krassilnikovii” // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 387–393.
- Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. Molecular markers for differentiation between the closely related dairy yeast *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and wild *Kluyveromyces lactis* strains from the european krassilnikovii population // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 329–335.
- Almeida P., Barbosa R., Zalar P., Imanishi Y., Shimizu K., Turchetti B., Legras J.L., Serra M., Dequin S., Couloux A., Guy J., Bensasson D., Gonçalves P., Sampaio J.P. A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication // Mol. Ecol. 2015. V. 24. P. 5412–5427.
- Belloch C., Barrio E., Uruburu F., Garcia M.D., Querol A. Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis // Syst. Appl. Microbiol. 1997. V. 20. P. 397–408.
- Belloch C., Barrio E., Garcia M.D., Querol A. Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces* // Yeast. 1998a. V. 14. P. 1341–1354.
- Belloch C., Barrio E., Garcia M.D., Querol A. Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rDNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers // Syst. Appl. Microbiol. 1998b. V. 21. P. 266–273.
- Belloch C., Fernandez-Espinar T., Querol A., Garcia M.D., Barrio E. An analysis of inter- and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon // Yeast. 2002. V. 19. P. 257–268.
- Belloch C., Querol A., Garcia M.D., Barrio E. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene // Int. J. System. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 405–416.
- Bicknell J.N., Douglas H.C. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces* // J. Bacteriol. 1970. V. 101. P. 505–512.
- Boeke J.D., LaCrute F., Fink G.R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5' phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance // Mol. Genet. 1984. V. 197. P. 345–346.
- Daniel H.-M., Meyer W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeast // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 86. P. 61–78.
- de Llanos R., Querol A., Planes A.M., Fernandez-Espinar M.T. Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains // Syst. Appl. Microbiol. 2004. V. 27. P. 427–435.
- Fuson G.B., Presley H.L., Phaff H.J. Deoxyribonucleic acid base sequence relatedness among members of the yeast genus *Kluyveromyces* // Int. J. System. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 371–379.
- Hennequin C., Thierry A., Richard G.F., Lecoindre G., Nguyen H.-V., Gaillardin C., Dujon B. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 3. P. 551–559.
- Imre A., Rácz H.V., Antunovic Z., Rádai Z., Kovács R., Lopandic K., Pócsi I., Pfliegler W.P. A new, rapid multiplex PCR method identifies frequent probiotic origin among clinical *Saccharomyces* isolates // Microbiol. Res. 2019. V. 227. P. 126298.
- Kudrjawzew W.I. Die Systematik der Hefen. Berlin, Academic Verlag, 1960. 276 p.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Lachance M. Current status of *Kluyveromyces* systematic // FEMS Yeast Res. 2007. V. 7. P. 642–645.
- Lachance M.-A. *Kluyveromyces* van der Walt (1971) // The Yeasts. A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T.. Amsterdam: Elsevier, 2011. P. 471–482.
- Löoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications // Bio-techniques. 2011. V. 50. P. 325–328.

- Martini A.* Ibridazione DNA/DNA tra specie di lieviti del genere *Kluyveromyces* // Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia. 1973. V. 28. P. 1–15.
- Molnar O., Prillinger H., Lopandic K., Weigang F., Staudacher E.* Analysis of coenzyme Q systems, monosaccharide patterns of purified cell walls, and RAPD-PCR patterns in the genus *Kluyveromyces* // Antonie van Leeuwenhoek. 1996. V. 70. P. 67–78.
- Naumov G.I., Naumova E.S.* Five new combinations in the yeast genus *Zygothripspora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data // FEMS Yeast Res. 2002. V. 2. P. 39–46.
- Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I.* Molecular-genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives // FEMS Yeast Res. 2004. V. 5. P. 263–269.
- Nguyen H.-V., Pulvirenti A., Gaillardin C.* Rapid differentiation of the closely related *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* strains isolated from dairy products using selective media and PCR/RFLP of the rDNA non-transcribed spacer 2 // Can. J. Microbiol. 2000. V. 46. P. 1115–1122.
- Ragnini A., Fukuhara H.* Mitochondrial DNA of the yeasts *Kluyveromyces*: guanine-cytosine rich sequence clusters // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 8433–8442.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W.* Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 6241–6246.
- Sidenberg D.G., Lachance M.-A.* Speciation, species delineation, and electrophoretic isoenzyme patterns of the type strains of *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt // Int. J. Syst. Bacteriol. 1983. V. 33. P. 822–828.
- Sidenberg D.G., Lachance M.-A.* Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* population and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. P. 94–102.
- Sor F., Fukuhara H.* Analysis of chromosomal DNA patterns of the Genus *Kluyveromyces* // Yeast. 1989. V. 5. P. 1–10.
- van der Walt J.P.* *Kluyveromyces* (van der Walt) emend. van der Walt // The Yeasts. A Taxonomic Study / Ed. J. Lodder. 2nd edn. Amsterdam: North Holland Publishing, 1970. P. 316–378.
- Vu D., Groenewald M., Szo'ke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkleij G.J., Crous P.W., Boekhout T., Robert V.* DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.
- White T.J., Bruns T., Lee E., Taylor J.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. N.Y.: Academic Press, 1990. P. 315–322.

Intraspecific Polymorphism of the Yeast *Kluyveromyces lactis*: Genetic Populations

L. V. Lyutova^{1, 2}, G. I. Naumov^{1, †}, A. V. Shnyreva², and E. S. Naumova^{1, *}

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 123098 Russia

²Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Received March 10, 2022; revised March 25, 2022; accepted March 26, 2022

Abstract—According to the modern classification of yeasts, the species *Kluyveromyces lactis* includes two taxonomic varieties: cultural dairy yeast *K. lactis* var. *lactis* and non-lactose fermenting environmental strains of *K. lactis* var. *drosophilum*. This subdivision of the species, which is based only on phenotypic and ecological criteria, is formal and does not reflect the existing heterogeneity of *K. lactis*. Using various molecular methods and genetic hybridization analysis, we studied the genetic relationship of 35 *K. lactis* strains isolated from dairy products and environmental sources in different regions of the world. The lactose-fermenting yeast *K. lactis*, including dairy strains, clinical and soil isolates, had identical molecular karyotypes, did not differ in the nucleotide sequences of a number of molecular markers, and formed fertile hybrids with 84–99% ascospore viability. On the other hand, non-lactose fermenting yeasts split into three genetically isolated populations: “krassilnikovii,” “drosophilum,” and “phaseolusporus,” which differed in molecular karyotypes, had unique SNP substitutions in the *ACT1* gene, and formed semisterile hybrids: 6–34% ascospore viability. Despite profound chromosome length polymorphism, *K. lactis* var. *lactis*, “krassilnikovii,” “drosophilum,” and “phaseolusporus” probably have the same haploid number of chromosomes, equal to six. The largest range of chromosomal sizes was observed in “krassilnikovii” (1000–2900 kb), and the smallest in “drosophilum” (1600–2300 kb). The biogeography of the yeast *K. lactis* is noteworthy. Lactose-fermenting strains of *K. lactis* var. *lactis* have been isolated in various regions of the world. Genetic populations “drosophilum” and “phaseolusporus” are typical of North America, while “krassilnikovii” is represented by European and Central Asian isolates. Comparative analysis of the *ACT1* sequences should be applied for reliable delineation of all four genetic populations of *K. lactis*.

Keywords: *Kluyveromyces lactis* yeasts, genetic populations, phylogenetic and hybridization analyses, molecular karyotyping, nuclear gene *ACT1*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИМИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО МОРСКОГО МЕРОМИКТИЧЕСКОГО
ЖЕЛОБА (БУХТА БИОФИЛЬТРОВ), РАСПОЛОЖЕННОГО
В КАНДАЛАКШСКОМ ЗАЛИВЕ БЕЛОГО МОРЯ

© 2022 г. А. С. Саввичев^{a, *}, А. А. Кулакова^a, Е. Д. Краснова^b, Д. А. Воронов^c, В. В. Кадников^d,
А. В. Белецкий^d, В. В. Козяева^d, И. И. Русанов^a, М. А. Летарова^a, Е. Ф. Веслополова^a,
В. В. Беленкова^a, Н. А. Демиденко^e, В. М. Горленко^a

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

^bБеломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова
биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^cИнститут проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, 127051 Россия

^dИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

^eИнститут океанологии им. П.П. Шишова РАН, Москва, 117997 Россия

*e-mail: savvichev@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2022 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 17.03.2022 г.

В сентябре 2020 г. и в марте 2021 г. были проведены исследования состава микробного сообщества и активности микробных процессов водной толщи меромиктического желоба, расположенного в Бухте Биофильтров (Кандалакшский залив Белого моря). Показано, что зона хемоклина в воде простиралась от 8 до 9 м. В монимолимнионе желоба присутствовал сероводород, концентрация которого у дна достигала 25–38 мг л⁻¹. Условия редокс-зоны были благоприятны для развития как анаэробных аноксигенных фототрофов, так и аэробных сероокисляющих хемоавтотрофов. В этой зоне формируется бактериальная пластина, окрашенная в розовато-коричневый цвет. По результатам секвенирования фрагмента гена 16S рРНК установлено, что в марте в подледный период в хемоклине доминируют зеленые серобактерии (ЗСБ) *Chlorobium phaeovibrioides*. Вторыми по численности были аэробные сероокисляющие бактерии *Sulfurimonas* sp. Из проб, отобранных в хемоклине, на селективных средах выростали в основном коричнево-окрашенные колонии *Chlorobi* и лишь единичные колонии ЗСБ зеленого цвета. Оба морфотипа идентифицированы как *Chlorobium phaeovibrioides*. В период наших исследований пурпурные серобактерии (ПСБ) не формировали бактериальную пластину в редокс зоне, но выявлялись единичные колонии ПСБ. Изолированная культура ПСБ идентифицирована как *Thiocapsa rosea*. Бактерии этого вида способны переключаться с фотосинтеза на аэробный хемосинтез и могут конкурировать за сульфид с сероокисляющими хемоавтотрофами. Нами выдвинуто предположение, что меромиктический желоб Бухты Биофильтров, в результате своей открытости, может быть одним из источников расселения АФБ в акватории Кандалакшского залива.

Ключевые слова: аноксигенные фототрофные бактерии, экология *Chlorobi*, меромиктические водоемы, микробная биогеохимия, микробные сообщества

DOI: 10.31857/S002636562210010X

Меромиктические водоемы отличаются устойчивой стратификацией водной толщи и наличием содержащего кислород аэробного и сероводородного анаэробного слоев, разделенных редокс-зоной. В этой зоне формируются микробные сообщества, часто достигающие высокой плотности. Меромиктические водоемы, как реликтовые экосистемы, на протяжении многих лет привлекают внимание микробиологов (Gorlenko, Kuznezov, 1972; Gorlenko, 1978; Jørgensen et al., 1979; Gorlen-

ko et al., 1983; Overmann, 1997; Garcia-Gil et al., 1999; Camacho et al., 2001; Savvichev et al., 2021).

Наиболее плотное планктонное микробное сообщество, наблюдаемое в толще меромиктических водоемов, получило название бактериальной пластины (Guerrero et al., 1985; Klepac-Ceraj et al., 2012). Установлено, что если до верхней границы распространения сероводорода достигает свет, то в бактериальной пластине преобладают аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ)

(Van Gemerden, Mas 1995; Overmann, 1997, 1998; Tonolla et al., 2003; Rogozin et al., 2009; Gulati et al., 2017). Доминирование весьма ограниченного числа видов АФБ в микробном сообществе бактериальной пластины меромиктических водоемов, расположенных в самых разных точках земного шара, является интересным биогеографическим фактом. При этом минорная составляющая микробного сообщества хемоклина, как и нижележащего монимолимниона, отличалась значительным таксономическим разнообразием (Pjevac et al., 2015).

Среди меромиктических водоемов особое место занимают водоемы, расположенные на морском побережье и имеющие в разной степени выраженную связь с основным бассейном (marine-derived lakes) (Gorlenko et al., 1978; Boehrer, Schultze, 2008; Краснова и соавт., 2012; Krasnova et al., 2015; Gulati et al., 2018; Краснова, 2021). Солевой состав монимолимниона таких водоемов генетически связан с соевым составом морской воды, содержащей значительное количество сульфат-иона. Сульфат-ион является акцептором электронов для сульфатредуцирующих бактерий, образующих сульфид, поддерживающий анаэробные условия в монимолимнионе. На плотность и состав микробного сообщества бактериальной пластины, а также интенсивность микробных процессов циклов углерода и серы влияют мощность эпи- и монимолимниона, глубина залегания миксолимниона и редокс зоны, а также насыщенность сероводородного слоя.

Удобным объектом исследования микробных сообществ являются прибрежные меромиктические водоемы Кандалакшского залива Белого моря (Лунина и соавт., 2016; Savvichev et al., 2018, 2021). Беломорские меромиктические водоемы объединяет общность происхождения (Краснова et al., 2015). Это бывшие морские заливы и лагуны, отделившиеся и в разной степени изолированные от основного бассейна вследствие поднятия берегов и дна со средней скоростью 0.5 см в год (Romanenko, Shilova, 2012). Поскольку Беломорские меромиктические водоемы находятся на широте полярного круга, все биогеохимические процессы, протекающие в их водной толще, подчинены строгой сезонной изменчивости. Ледовый и снежный покровы в зимний сезон отражают и поглощают более 95% солнечного света. Снежные талые воды опресняют эпилимнион, тем самым поддерживая плотностную стратификацию водной толщи.

Микробиологами исследовано семь стратифицированных водоемов, связанных с Кандалакшским заливом (Кисло-Сладкое, Трехцветное, Лагуна на Зеленом мысе, Большие Хрусломены, Еловое, Верхнее и Нижнее Ершовые) (Краснова et al., 2015). Показано, что в этих озерах в хемоклине доминирующими микроорганизмами яв-

ляются зелено- или коричнево-окрашенные морфотипы вида *Chlorobium phaeovibrioides* (*Chlorobiaceae*) в зависимости от глубины расположения бактериальной пластины. В некоторых озерах в минорных количествах присутствовали коричнево-окрашенные *Prosthecochloris aestuarii* (ранее *Prosthecochloris phaeoasteroidea*), а также пурпурные бактерии рода *Thiocapsa* (Лунина и соавт., 2016; Grouzdev et al., 2019).

В 2013 году в дополнение к уже известным меромиктическим водоемам Кандалакшского залива был обнаружен стратифицированный водоем нового типа – подводный меромиктический желоб в Бухте Биофильтров (66°32'20" N, 33°10'10" E). Этот меромиктический желоб дополняет ряд водоемов, в разной степени изолированных от Белого моря. Он представляет собой самую раннюю стадию изоляции, при которой меромиктический водоем занимает только локальное понижение донного рельефа.

Целью настоящего исследования было изменение гидрохимических показателей в водной толще глубоководного желоба Бухты Биофильтров в осенне-зимний период 2019–2020 г., а также определение активности микробных процессов и состава бактериального сообщества зоны хемоклина. В задачи также входило оценить возможную роль открытого меромиктического водоема, которым является желоб Бухты Биофильтров, как источника распространения бактериальной инфекции на другие участки акватории Кандалакшского залива, пригодные для развития АФБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика объекта исследования. В Бухте Биофильтров обнаружен удлиненный узкий желоб глубиной 14–15 м (рис. 1а, 1б). Желоб окружен мелким широким плато до 4–5 м глубиной. Подводный желоб Бухты Биофильтров не изолирован от моря, что отличает его от ранее известных меромиктических водоемов, расположенных на побережье Кандалакшского залива.

Отбор проб из водной толщи желоба Бухты Биофильтров проводили в сентябре 2019 г., сентябре 2020 г. и в марте 2021 г. в точке с наибольшей глубиной – 14.5 м. Пробы отбирали в сентябре с борта лодки, в марте – через пробуренную во льду лунку. Степень освещенности на разных горизонтах водной толщи измеряли с помощью AR813A Luxmeter (“Smart Sensor”, Китай), модифицированного для подводных исследований. Температуру и содержание растворенного кислорода измеряли с помощью портативного электрометра и оксиметра WTW© 340iA HANNA HI8314F (“HANNA Instruments”, Германия). Общую соленость определяли с помощью кондуктометра HANNA HI8733 (“HANNA Instruments”,



Рис. 1. Спутниковый снимок (отмечено место нахождения меромиктического желоба) (а) и батиметрический план с изобатой 8 м, полученный путем эхолотирования (б).

Германия). Пробы воды отбирали с помощью силиконовой трубки, закрепленной на калиброванном тросе, и портативного насоса (Whale Premium Submersible Pump GP1352, “Whale” Ирландия). Содержание метана в пробах определяли по методике фазово-равновесной дегазации (McAuliffe, 1971). Концентрацию метана в газовой “head-space” фазе измеряли на газовом хроматографе Kristall-2000 M (“Хроматэк”, Россия), снабженном пламенно-ионизационным детектором. В статье использовали данные содержания сероводорода, полученные в Бухте Биофильный при проведении совместных исследований (Лосюк и соавт., 2021).

Для учета общей численности микроорганизмов (ОЧМ) пробы воды фиксировали раствором глутаральдегида, конечная концентрация которого в пробе составляла 2% (вес/об.). 1–5 мл фиксированной пробы жидкости фильтровали через черные поликарбонатные фильтры (“Millipore”, США) с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтры окрашивали раствором акридинового оранжевого. Препараты просматривали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus BX 41 (“Olympus”, Япония) с системой визуализации Image Score Color (M) при увеличении $\times 1000$. Учет клеток проводили с экрана монитора в 20 полях зрения.

Для определения активности микробных процессов пробы воды отбирали в 30 мл стеклянные флаконы и закрывали без пузырька воздуха резиновой газонепроницаемой пробкой и обжимали алюминиевой крышкой. Интенсивности микробных процессов: световой и темновой ассимиляции углекислоты (САУ и ТАУ), сульфатредукции (СР) и окисления метана (МО) определяли радиоизотопными методами с использованием меченых соединений — $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ и $^{14}\text{CH}_4$ соответственно (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006; Savvichev et al., 2021). Радиоактивности (^{14}C и ^{35}S) продуктов микробных процессов измеряли на

жидкостном сцинтилляционном счетчике “PackardTRI-CarbTR” (США). Для расчетов интенсивности микробных процессов ТАУ, МО и СР использовали среднюю величину, полученную из двух повторностей для каждого образца.

Для выделения и культивирования АФБ использовали среду следующего состава (г/л): NH_4Cl — 0.7; KH_2PO_4 — 0.7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; NaCl — 20.0; KCl — 0.33; NaHCO_3 — 1.5; CaCl_2 — 0.1, ацетат Na — 0.5; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 1.0, раствор микроэлементов и витаминов по Пфеннигу — 1 мл/л; витамин B_{12} — 0.02. $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (10%), NaHCO_3 и ацетат Na (10%) готовили и стерилизовали отдельно и вносили в основную среду непосредственно перед посевом. В готовой среде pH составлял 7.0 для ЗСБ и 7.5 — для ПСБ. Засеянные среды инкубировали при температуре 28°C при освещении 2000 лк. Очистку культур АФБ проводили методом разведений на агаризованной (0.5%) среде (Лунина и соавт., 2019). Эксперименты по определению оптимальной для роста АФБ температуры, концентрации NaCl и значений pH проводили путем измерения оптической плотности выросшей суспензии клеток при 726 нм на фотометре КФК-3 (Россия).

Микроскопирование. Морфологию бактерий изучали в световом микроскопе Olympus BX 41 (“Olympus”, Япония) с объективом $\times 100$ с фазовым контрастом. Для получения негативно окрашенных препаратов целых клеток суспензию бактерий наносили на поверхность медной сеточки, покрытую формваровой подложкой и негативно окрашивали 0.2% раствором уранилацетата в воде. Препараты просматривали под электронным микроскопом JEM-100B (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 или 90 кВ.

Состав пигментов определяли по спектрам поглощения на спектрофотометре Cary — 100 (“Varian”, Австралия) в диапазоне длин волн 350–950 нм. Суспензию клеток готовили в 50% глицерине.

Кроме того, исследовали спектральные характеристики экстрактов пигментов клеток в ацетоне.

Выделение метагеномной ДНК, ПЦР-амплификация и высокопроизводительное секвенирование фрагментов генов 16S рРНК. Свежеотобранные пробы воды объемом 200 мл пропускали через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтр гомогенизировали, растирая с жидким азотом, препарат метагеномной ДНК выделяли с помощью Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO Laboratories Inc.”, США). Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей варибельного V3–V4 региона гена 16S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦР с использованием праймеров PRK341F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATСТААТ-3'). ПЦР фрагменты были баркодированы с помощью Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США) и очищены с использованием Agencourt AMPure beads (“Beckman Coulter, Brea”, США). Концентрация полученных ПЦР продуктов была определена с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, США). Затем ПЦР фрагменты были смешаны в эквимольных количествах и секвенированы на Illumina MiSeq (2 × 300 нт с обоих концов). Парноконцевые чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11. Полученные последовательности были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные чтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации.

Таксономическая идентификация ОТЕ была выполнена по базе SILVA v.138 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016). Полученные последовательности были депонированы в базе данных NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номером SRX14459950 в рамках проекта PRJ-NA697856.

Филогенетический анализ. Выделение ДНК из накопительных и чистых культур проводили с помощью набора DNeasy UltraClean Microbial Kit (“Qiagen”, Нидерланды). Для идентификации накопительных культур ЗСБ применяли праймерную группоспецифичную систему F-99-GSB-R-1369 для гена 16S рРНК (Alexander et al., 2002). Для идентификации накопительной культуры пурпурных бактерий использовали универсальные зубактериальные праймеры 27F и 1492R. Секвенирование проводили с использованием автоматического генетического анализатора DNA Analyzer 3730 (“Applied Biosystems”, США) и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США), согласно инструкции производителя. Уровень сходства последовательностей гена 16S рРНК исследуемых

культур с генами наиболее близких типовых штаммов рассчитывали при помощи онлайн-сервиса EzBioCloud (Yoon et al., 2017). Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы BioEdit. Филогенетические деревья строили в программе Mega7 с использованием алгоритма maximum-likelihood и bootstrap анализа 1000 альтернативных деревьев (Kumar et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические условия и гидрологическая характеристика подводного меромиктического желоба Бухты Биофильтров (ББФ). Температура и соленость водной толщи были весьма стабильны и сезонно изменялись в верхнем перемешиваемом слое. Во время проведения исследований в марте 2021 г. температура подледного слоя была отрицательной (–1.3°C), постепенно увеличивалась с глубиной и переходила в положительную на глубине 9.0 м. Ниже она продолжала повышаться и возле дна достигала 1.8°C (рис. 2а). В сентябре температура поверхностного слоя до глубины 4 м составляла 10.2–10.4°C. Этот слой – миксолимнион подвержен ветровому и приливному перемешиванию. Начиная с 5.0 м, температура воды понижалась и возле дна на глубине 14.0 м соответствовала зимним значениям. Соленость в поверхностном слое сезонно варьировала от 23.7 до 25.6‰, но, начиная с глубины 7.5 м, оставалась сезонно стабильной (26.7‰). Четкий галоклин прослеживался только в сентябре (с 6.0 до 7.0 м). В этот период термоклин простирался с 4.0 до 10.0 м (рис. 2а).

Верхний перемешиваемый водный слой по содержанию растворенного кислорода не отличался от соответствующего слоя окружающих вод морского залива. В сентябре до глубины 4.0 м концентрация растворенного кислорода была близка к насыщению, ниже его концентрация уменьшалась. До глубины 6.5 м концентрация превышала 2 мг л⁻¹ – порог аэробных условий. Начиная с глубины 7.0 м, наблюдалось резкое снижение его концентрации вплоть до аналитического нуля на глубине 8.5 м (рис. 2б). Зимой содержание кислорода было выше, он обнаруживался вплоть до глубины 8.5 м. Непосредственно под кислородсодержащим слоем начинался слой, содержащий сероводород. Концентрация сероводорода возрастала с глубиной и составляла в хемоклине 4–6 мг л⁻¹, а в мнимом лимнионе достигала значений 25–38 мг л⁻¹ (рис. 2б). Таким образом, в зоне металимниона на глубине от 7.5 до 8.0 м в сентябре и от 8.0 до 9.0 м в марте наблюдалось совместное присутствие кислорода и сероводорода, что является благоприятным условием для развития как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов.

При сентябрьской съемке освещенность в поверхностном водном горизонте составляла 18000 лк (рис. 2в). До глубины 8.5 м освещенность равномерно падала в 1.6–2.0 раза в расчете на 1 м и достигала 70 лк на верхней границе хемоклина. Глубже 8.5 м освещенность резко падала в 5–7 раз в расчете на 1 м и достигала аналитического нуля на глубине 10 м. В марте в расчищенной ледовой лунке на поверхности воды величина освещенности составляла 9500 лк, однако уже на глубине 1 м подо льдом составляла 980 лк. Глубже освещенность падала и достигала аналитического нуля на глубине 8.5 м. Величина Eh четко соответствовала распределению кислорода и сероводорода (рис. 2в).

Стабильность меромиктических условий в желобе ББФ подтверждена многолетними наблюдениями, выполненными в различные сезоны, начиная с 2013 г. (Krasnova, 2021). Стратификация водной толщи в желобе бухты поддерживается на глубине около 10 м за счет повышенной плотности водных масс монимолимниона, связанной со стоком рассолов, опускающихся в придонный водный слой во время образования морского льда, а также пониженной плотности поверхностного водного слоя, пополняемого пресными водами талого льда и снега. В летне-осенний период определенную роль в поддержании стратификации играет формирующийся сезонный температурный градиент. Вместе с тем водоем остается открытой системой, способной к обмену с водой залива.

Общая численность (ОЧМ) и биомасса микроорганизмов. Микроскопирование окрашенных препаратов на мембранных фильтрах с разных водных горизонтов показало, что в водном слое над желобом величина ОЧМ соответствовала значениям, обычным для поверхностных вод Кандакшского залива (340–440 тыс. кл. мл⁻¹, рис. 3). В слое металимниона (хемоклина), в сентябре и марте, величина ОЧМ достигала высоких значений – до 1.8–2.1 млн кл. мл⁻¹. В этом слое происходит формирование бактериальной пластины, характерной для меромиктических водоемов. Под хемоклином величина ОЧМ была также высокой (2.0–2.3 млн кл. мл⁻¹). Средние значения объема клеток бактерий в аэробной водной толще варьировали от 0.08 до 0.11 мкм³, в слое хемоклина составляли 0.16–0.16 мкм³, в анаэробной зоне монимолимниона достигали 0.18 мкм³.

Продукция кислородного и анакисогенного фотосинтеза в водной толще. Для обычных меромиктических водоемов характерно два типа фотосинтеза: кислородный, осуществляемый эукариотическими водорослями и цианобактериями в поверхностном водном слое, и анакисогенный, осуществляемый анакисогенными фототрофными бактериями (АФБ) в зоне отсутствия кислорода. Световая ассимиляция углерода (САУ), является показателем продукции фотосинтеза. В сентябре в кислородсо-

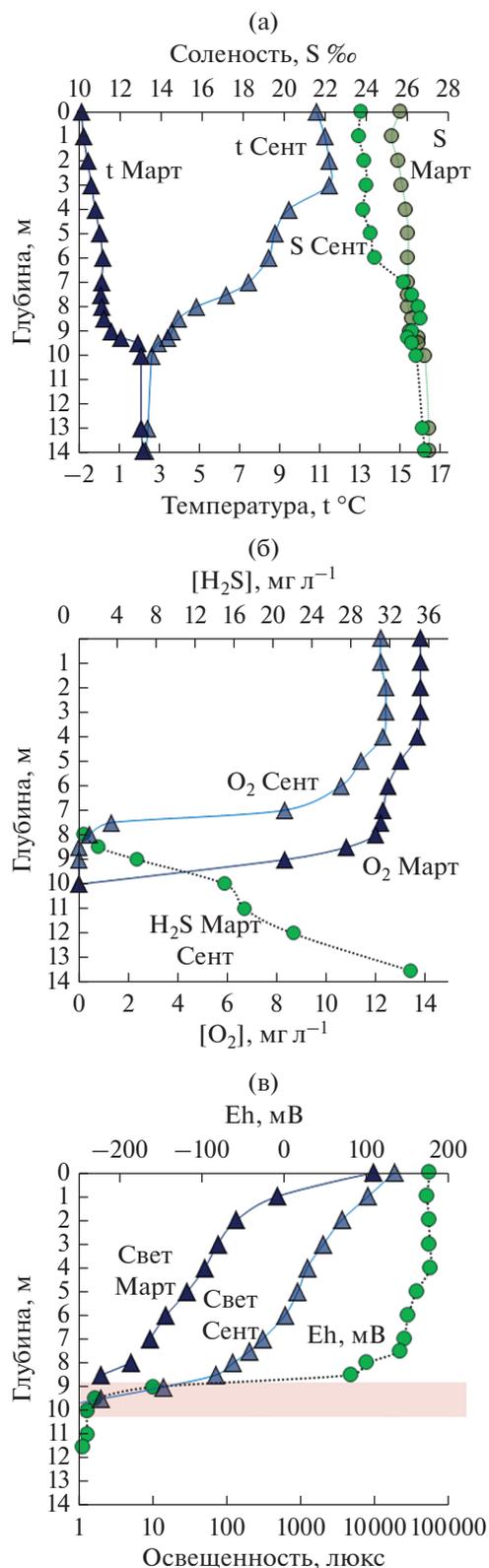


Рис. 2. Температура (t , °C) и соленость (S , ‰) (а); содержание кислорода и сероводорода (мг л^{-1}) (б); окислительно-восстановительные условия (Eh , мВ) и проникновение света (освещенность, лк, логарифмическая шкала) (в) в водной толще желоба Бухты Биофильфов в сентябре 2020 г. и марте 2021 г. (цветом отмечено расположение бактериальной пластины).

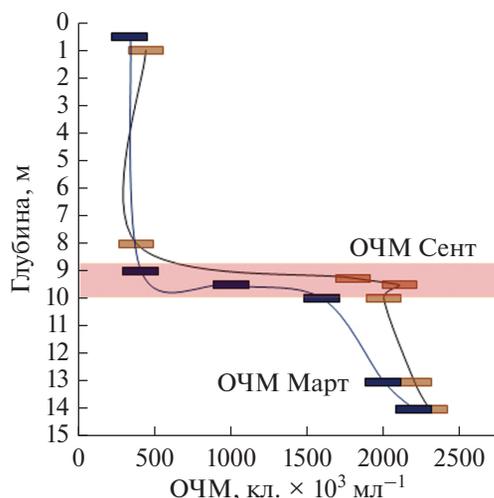


Рис. 3. Общая численность микроорганизмов (ОЧМ, кл. $\times 10^3$ мл $^{-1}$) на различных горизонтах водной толщи желоба Бухты Биофильтров в марте и сентябре 2020 г. (цветом отмечено расположение бактериальной пластины).

державшем слое была зарегистрирована активность окислительного фотосинтеза, начиная от поверхности и до 8.0 м включительно (рис. 4а). Максимальная интенсивность процесса окислительного фотосинтеза, выраженная в продукции органического вещества, составляла 3.2 мкмоль С л $^{-1}$ сут $^{-1}$. На нижней границе аэробной зоны интенсивность окислительного фотосинтеза снижалась до 1.0 мкмоль С л $^{-1}$ сут $^{-1}$ и, видимо, была обусловлена активностью мелких кокковидных цианобактерий, морфологически сходных с цианобактериями рода *Synechocystis*. В сентябре 2020 г. отчетливо выраженный пик анаэробного фотосинтеза проявлялся в верхней части сероводородсодержащего слоя, на глубине 9.25 м (19.2 мкмоль С л $^{-1}$ сут $^{-1}$, рис. 4а). Глубже интенсивность фотосинтеза резко падала до аналитического нуля на глубине 10.0 м. Во время подледной съемки активность окислительного фотосинтеза была ниже по сравнению с осенним сезоном и регистрировалась в узком подледном горизонте (до 1.5 мкмоль С л $^{-1}$ сут $^{-1}$). Достоверных значений активности анаэробного фотосинтеза при подледной съемке (9.0, 9.5 и 10.0 м) получено не было. Темновая ассимиляция углекислоты (ТАУ) является суммарным показателем, включающим как интенсивность гетеротрофного карбоксилирования, так и автотрофного потребления углекислоты при хемосинтезе. В сентябре в перемешиваемом водном слое величина ТАУ была низкой и составляла 0.6–0.9 мкмоль С л $^{-1}$ сут $^{-1}$. В слое хемоклина величина ТАУ резко возрастала до максимального значения на глубине 9.25 м (12.3 мкмоль С л $^{-1}$ сут $^{-1}$). Глубже величина ТАУ снижалась до значений 4.0–6.2 мкмоль

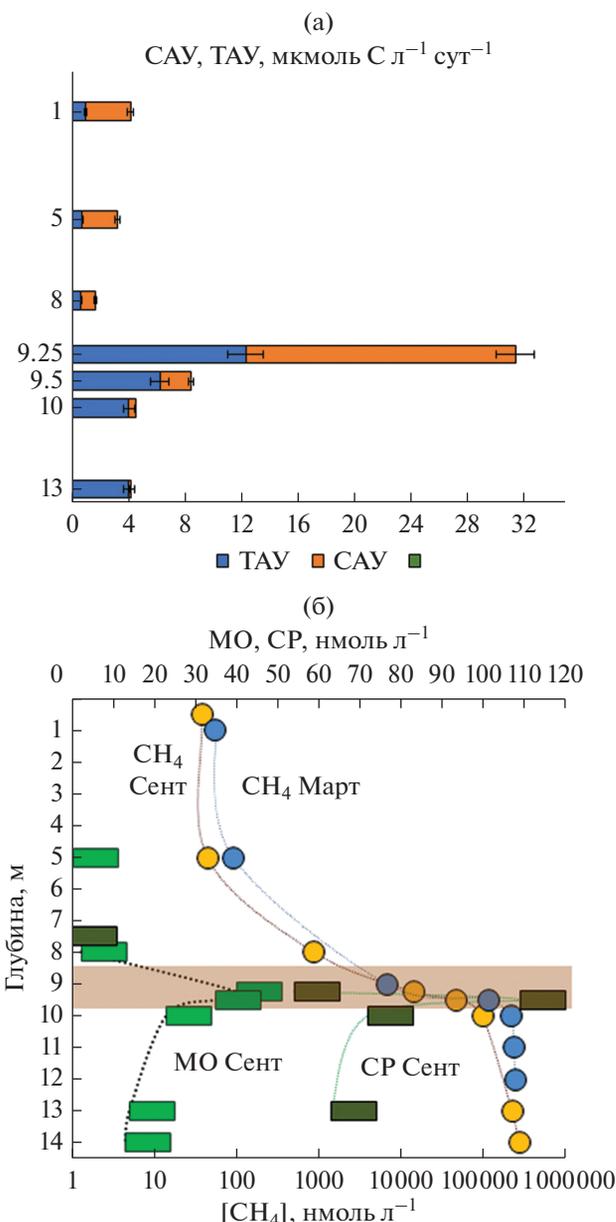


Рис. 4. Световая ассимиляция углерода (САУ) и темновая ассимиляция углерода (ТАУ) (а); содержание метана (CH $_4$, нмоль л $^{-1}$), интенсивность процессов сульфатредукции (СР, нмоль л $^{-1}$) и метанообразования (МО, нмоль л $^{-1}$) (б) в водной толще желоба Бухты Биофильтров в сентябре 2020 г.

С л $^{-1}$ сут $^{-1}$ (рис. 4а). В марте невысокая активность ТАУ была зафиксирована непосредственно в подледном слое (1.5 мкмоль С л $^{-1}$ сут $^{-1}$), а также в придонном слое, начиная с глубины 9.5 м и до дна (до 3.0 мкмоль С л $^{-1}$ сут $^{-1}$).

Процесс бактериальной сульфатредукции (СР). Проведенные радиоизотопные эксперименты показали, что в сентябре процесс сульфатредукции начинается с горизонта 9.25 м, что соответствует

верхней границе редокс-зоны (рис. 46). Интенсивность СР была максимальна на горизонте 9.5 м (109 нмоль S л⁻¹ сут⁻¹). Ниже 9.5 м интенсивность СР снижалась до 72 нмоль S л⁻¹ сут⁻¹ на горизонте 10.0 м и до 63 нмоль S л⁻¹ сут⁻¹ в придонном водном слое. Подледная съемка показала, что процесс сульфатредукции регистрируется во всей толще монимолимниона (60–80 нмоль S л⁻¹ сут⁻¹).

Содержание растворенного метана [СН₄], интенсивность микробного окисления метана (МО). Распределение содержания метана по вертикальному разрезу водной толщи желоба ББФ (рис. 46) типично для меромиктических водоемов. В поверхностной воде, непосредственно над желобом, концентрация СН₄ составляла 38–44 нмоль л⁻¹, что близко к содержанию метана в поверхностных водах залива за пределами исследуемого желоба. В слое хемоклина содержание метана повышалось до 14–112 мкмоль л⁻¹, а в придонном слое достигало 265–1820 мкмоль СН₄ л⁻¹. Зимний и осенний профили содержания метана существенно не различались. Показано, что процесс МО, протекает во всей водной толще озера, от придонного до поверхностного горизонтов включительно (рис. 46). В сентябре 2020 г. интенсивность МО в поверхностном слое до 5.0 м была крайне низкой и соответствовала пределу чувствительности метода (до 1 нмоль СН₄ л⁻¹ сут⁻¹). Резкий скачок и интенсивный процесс МО (23–40 нмоль СН₄ л⁻¹ сут⁻¹) отмечен на глубине 9.25, 9.5 и 10.0 м. В слое 10.0–14.0 м интенсивность МО составляла 13–14 нмоль СН₄ л⁻¹ сут⁻¹.

Состав микробного сообщества в зоне хемоклина. В марте 2021 г. методом высокопроизводительного секвенирования фрагмента гена 16S рРНК был определен таксономический состав микроорганизмов, формирующих бактериальную пластину в зоне хемоклина (табл. 1). Для характеристики состава микробного сообщества в образце хемоклина было получено 48153 последовательности фрагментов гена 16S рРНК. Абсолютно доминирующим видом сообщества прокариот в хемоклине в период подледной съемки являлись облигатно анаэробные ЗСБ *Chlorobium phaeovibrioides* (57.0%) (табл. 1, рис. 5). Эти бактерии в процессе фотосинтеза окисляют сульфид до элементной серы, которая откладывается вне клеток. Второе место в популяции занимали аэробные сероокисляющие бактерии рода *Sulfurimonas* (26.3%), принадлежащие к филуму *Campylobacterota* (табл. 1, рис. 5). Представители рода *Sulfurimonas* – типичные градиентные морские бактерии, микроаэробы, способные окислять элементную серу, сульфид, другие восстановленные соединения серы в процессе кислородного, а некоторые виды в процессе нитратного дыхания (Han, Perner, 2015). В заметном количестве (1.5%) были обнаружены анаэробные, сульфидогены фи-

Таблица 1. Состав микробного сообщества зоны хемоклина на основании анализа V3–V4 региона гена 16S рРНК (10.0 м, март 2021 г.)

Филогенетическая группа	Доля последовательностей генов 16S рРНК, %
<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	57.0
<i>Sulfurimonas</i>	26.3
<i>Anaerolineaceae</i>	4.4
<i>Proteobacteria</i>	2.9
<i>Firmicutes</i>	2.9
<i>Arcobacteraceae</i>	2.8
<i>Desulfobacterota</i>	1.5
<i>Bacteroidia</i>	1.1
<i>Patescibacteria</i>	0.33
Other <i>Bacteria</i>	0.29
Other <i>Campylobacterales</i>	0.16
<i>Nanoarchaeota</i>	0.06

лума *Desulfobacterota* (= *Thermodesulfobacteriota*), в который входят бактерии семейств *Desulfatiglandaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfosarcinaceae*, *Desulfocapsaceae*, *Desulfuromusa*, *Geopsychrobacter*. Бактерии филума *Desulfobacterota* продуцируют сероводород за счет диспропорционирования элементной серы, сульфита и тиосульфата (Murphy et al., 2021). При этом бактерии не нуждаются в органических субстратах и развиваются как хемолитоавтотрофы. Некоторые бактерии класса *Thermodesulfobacteria* вступают в синтрофные отношения с микроорганизмами, использующими сероводород. Примечательно присутствие значительного количества представителей порядка *Campylobacterales* (филум ϵ -*Proteobacteria*) и семейства *Anaerolineaceae* (филум *Chloroflexota*), функция которых заключается в преобразовании органических субстратов. Преобладание функциональных групп, участвующих в круговороте серы, позволяет определить микробное сообщество хемоклина желоба Бухты Биофильтров известным термином “сульфурета”. Особо отметим присутствие в сообществе некультивируемых ультрамикробактерий филума *Gracilibacteria* клады *Patescibacteria* (Candidate Phyla Radiation) (CPR). В состав этой группы входят хищные бактерии (Yakimov et al., 2021), возможно, выполняющие важную экологическую функцию, контролируя плотность популяции первичных продуцентов в системах с высокой плотностью биоты, характерной для бактериальной пластины меромиктических водоемов.

При микроскопировании природных образцов с глубины 9.5 м (сентябрь 2019 г.) обнаружены мелкие слегка изогнутые клетки, размером 0.3 × 0.9 мкм, внутри которых видны овальные структуры –

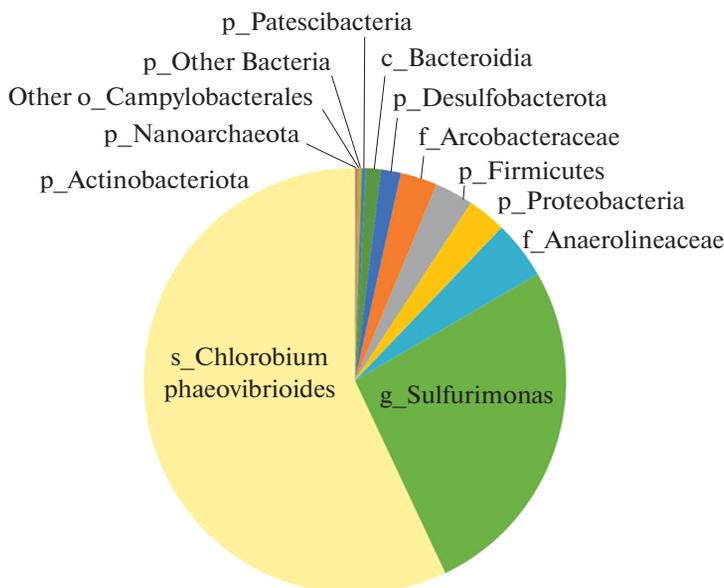


Рис. 5. Состав микробного сообщества зоны хемоклина на основании анализа V3–V4 региона гена 16S рПНК (10.0 м, март 2021 г.).

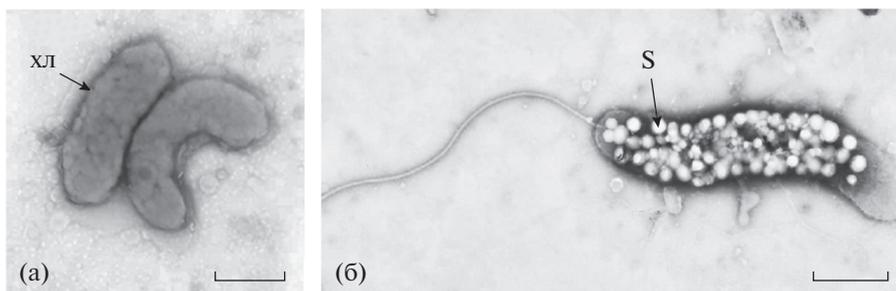


Рис. 6. Зеленые серобактерии *Chlorobium phaeovibrioides* (а) и бактерии рода *Sulfurimonas* (б) обитающие в хемоклине Бухты Биофильтров. Электронный микроскоп, тотальные препараты, окрашенные уранилацетатом. Масштабная линейка – 0.5 мкм. Обозначения: хл – хлоросомы; S – включения элементной серы.

хлоросомы, характерные для всех видов *Chlorobiota* (рис. 6а). Морфология клеток соответствует морфологии бактерии *Chlorobium phaeovibrioides*, доминирующей в сообществе хемоклина ББФ. Кроме ЗСБ часто встречались клетки мелких спирилл со жгутиком, содержащих множество включений, видимо внутриклеточной серы (рис. 6б). При окислении сульфида эти бактерии откладывают серу вне клеток, реже наблюдаются внутриклеточные капли серы (рис. 6б). Морфология этих клеток соответствует описанной для сероокисляющих бактерий рода *Sulfurimonas*, обнаруженных в бактериальной пластине молекулярным методом.

Спектральные характеристики бактерий из зоны хемоклина. Из проб воды, отобранных из зоны хемоклина в марте и сентябре 2020 г., была сконцентрирована центрифугированием суммарная биомасса бактерий, для которой были получены спектры поглощения целых клеток, а также их

ацетоновых экстрактов (рис. 7). Можно заключить, что как осенью, так и в марте в подледный период в хемоклине меромиктического желоба ББФ преобладали зеленые серобактерии, содержащие бактериохлорофилл *e* и каротиноид изорениератин. О присутствии бактериохлорофилла свидетельствуют пики 453 и 721 нм в целых клетках и 651 нм в растворе ацетона. Для каротиноида изорениератина характерно плечо при 516 нм в целых клетках и пик 445 нм в экстракте пигментов. Эти данные подтверждают доминирование в бактериальной пластине желоба ББФ коричнево-окрашенного морфотипа ЗСБ *Chlorobium phaeovibrioides*.

Получение накопительных и чистых культур АФБ. Из проб воды хемоклина были сделаны посевы на селективную агаризованную среду. Среди выросших АФБ преобладали коричнево-окрашенные колонии ЗСБ и лишь отдельные колонии зеленого цвета. Из проб, отобранных в сентябре 2019 г.,

были получены два штамма коричневого цвета (ChlKor-19a, ChlKor-19b) и три штамма ЗСБ зеленого цвета (ChlZel-19a, ChlZel-19b, ChlZel-19c), а также штамм пурпурных серобактерий ThRos-19 (рис. 8а–8г). ЗСБ характеризовались мелкими клетками (рис. 8д–8ж). Их форма варьировала от кокковидной до эллипсоидной и вибриодной. Такая морфология характерна для морских *Chlorobiota* вида *Chlorobium phaeovibrioides*. Штаммы ЗСБ были выделены в виде монокультуры и идентифицированы как *Ch. phaeovibrioides* (рис. 9). Один штамм зеленых бактерий (ChlZel-19b) имел визуально различимые газовые вакуоли, что характерно для *Ch. phaeovibrioides*, доминирующего в хемоклине оз. Трехцветное (Кандалакшский залив) (Лунина и соавт., 2019).

В накопительных культурах чаще вырастали колонии пурпурных серобактерий. Кокковидные клетки имели центральную газовую вакуоль. Этот морфотип (штамм ThRos-19) был выделен в чистую культуру. Было показано, что при росте у поверхности агаризованной среды (при контакте с кислородом воздуха) клетки переполнялись каплями элементарной серы (рис. 8г). Последовательность гена 16S рРНК штамма ThRos-19 имела 99.25% сходства с геном типового штамма *Thiocapsa rosea* DSM 235^T, что позволило отнести его к этому виду (рис. 10). Ранее для этого вида была показана способность к аэробному окислению тиосульфата (Горленко, 1974). Кроме кокковидного морфотипа ПСБ вырастали колонии, содержащие удлиненные клетки, подобные *Chromatium* (рис. 8б), но культуру этой бактерии получить не удалось. В посевах в столбики агара вырастали также колонии сине-зеленого цвета, состоящие из мелких кокковидных цианобактерий, размером около 1 мкм (рис. 8а). Эти цианобактерии, предположительно относящиеся к роду *Synechocystis*, видимо, определяют протекание кислородного фотосинтеза в металимнионе желоба ББФ.

Спектры поглощения целых клеток выделенных штаммов. Показано, что спектр коричнево-окрашенных клеток штамма ChKor-19 имеет максимумы поглощения при длинах волн 467, 516, 631, 714 и 806 нм (рис. 11а). Исходя из полученных результатов, бактерии штамма ChlKor-19а имеют бактериохлорофилл *e* (максимумы 464 и 714 нм), входящий в состав хлоросомы, и небольшой пик бактериохлорофилла *a* (806 нм). Кроме того, у них имеется каротиноид изорениератин (пик 516 нм). Спектр клеток ЗСБ штамма ChZel-19а имеет максимумы поглощения 444, 717 и 805 нм (рис. 11б), что свидетельствует о присутствии антенного бактериохлорофилла *d* и минорного бактериохлорофилла *a*. Спектр поглощения суспензии клеток штамма ThRos-19 имеет максимумы поглощения при длинах волн 521, 828 и 885 нм (рис. 11в), соответствующие бактериохлорофиллу *a* (основной пик при 828 нм) и каротиноиду окенону (521 нм).

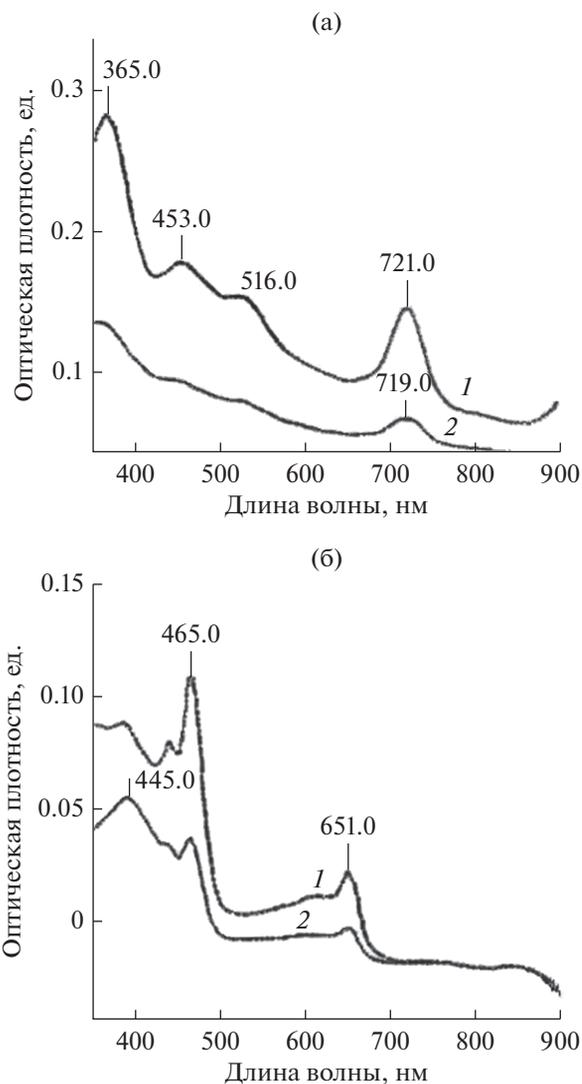


Рис. 7. Спектральные характеристики пигментов бактерий, сконцентрированных из проб воды зон максимального развития фототрофов в марте (1) и сентябре (2) 2020 г. Верхняя линия – пробы сентября, нижняя линия – марта; (а) – спектр целых клеток, (б) – спектр пигментов в ацетоне.

Таким образом, подводный меромиктический желоб Бухты Биофильтров имеет ряд отличий от исследованных ранее стратифицированных водоемов, возникших в прибрежной зоне Кандалакшского залива. Бактериальная пластина в ББФ формируется на значительной глубине (9–9.5 м), что объясняет доминирование в ней коричнево-окрашенных ЗСБ вида *Chlorobium phaeovibrioides*, приспособленных к жизни при низкой освещенности, господствующей на больших глубинах. Коричневые морфотипы ЗСБ, содержащие каротиноиды в составе антенных структур хлоросом, эффективно используют зеленую часть спектра, проникающего на большую глубину. Зелено-окрашенный морфотип этого вида, практически лишенный

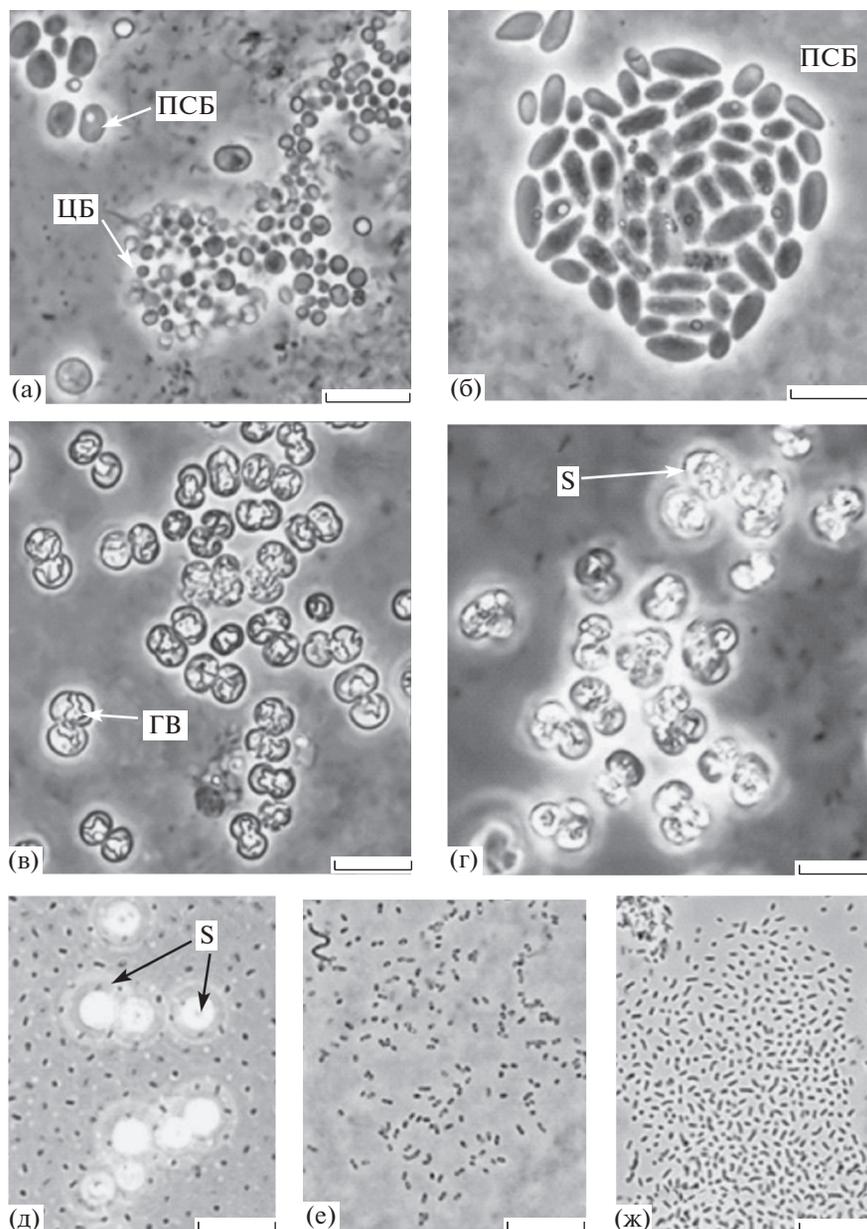


Рис. 8. Микроколонии мелких кокковидных цианобактерий (ЦБ) (а) и эллипсоидных пурпурных серобактерий (ПСБ) (б); кокковидные пурпурные серобактерии с центральной газовой вакуолью (ГВ) и мелкими каплями серы (S) на периферии клеток (в, г); те же пурпурные бактерии, но выросшие в контакте с кислородом атмосферы, клетки переполнены каплями серы (S) (г); ChKog-19a – коричневые серобактерии ЗСБ (д); зеленые серобактерии ЗСБ (е, ж): ChZel-19a (е), ChZel-19c (ж). Масштабная линейка – 0,2 мкм.

каротиноидов, выявлен в исследованном водоеме лишь в небольшом количестве. Следует отметить, что зелено-окрашенные *Chlorobium phaeovibrioides* монополюс доминировали в меромиктическом оз. Трехцветное (Кандалакшский залив), в котором бактериальная пластина находится близко к поверхности, на глубине 1,8–2,0 м (Саввичев и соавт., 2018). Бактериальная пластина желоба ББФ содержит два морфотипа (коричневый и зеленый) *Chlorobium phaeovibrioides*, абсолютного доминан-

та во всех стратифицированных озерах, имеющих или имевших связь с Кандалакшским заливом.

Широкая зона совместного присутствия кислорода и сульфида обуславливает возможность развития как анаэробных, так и микроаэрофильных микроорганизмов, потребляющих сульфид, к которым относится хемоавтотрофная серобактерия *Sulfurimonas* sp. Нами было отмечено, что в определенные сезоны на верхней границе редокс-зоны ББФ происходит формирование дополни-

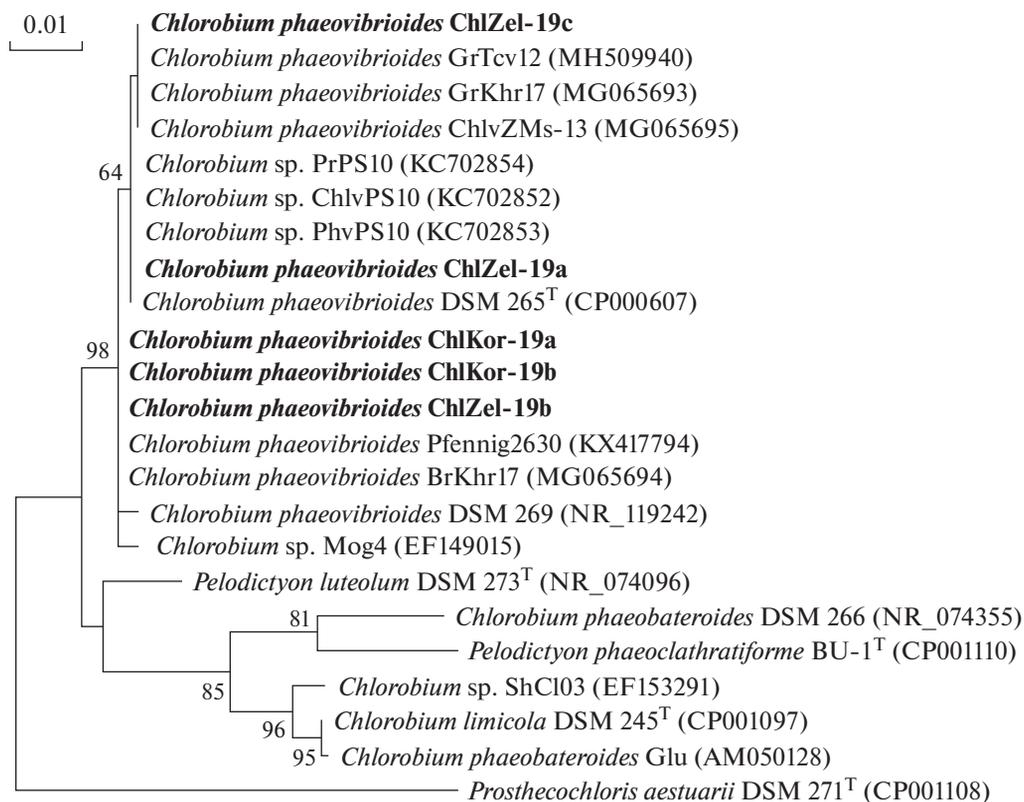


Рис. 9. Филогенетическое положение штаммов ChlKor-19a, ChlKor-19b коричневых серобактерий и штаммов ChlZel-19a, ChlZel-19b, ChlZel-19c зеленых серобактерий, выделенных из хемоклина желоба Бухты Биофильтров. Дерево построено с использованием алгоритма Maximum Likelihood. Длина последовательностей составляла 1102 нуклеотида. Достоверность ветвления рассчитана на основании 1000 альтернативных деревьев.

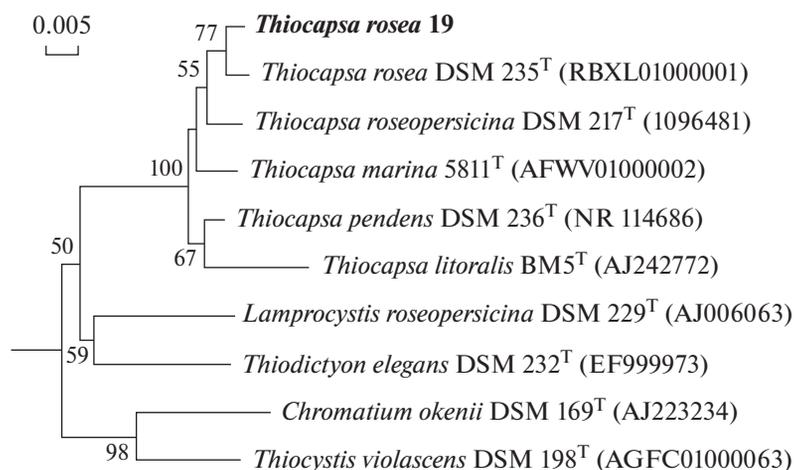


Рис. 10. Филогенетическое положение штамма 19 ПСБ на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК. Длина последовательностей составляла 1322 нуклеотида. Дерево построено с использованием алгоритма Maximum Likelihood. Достоверность ветвления рассчитана на основании 1000 альтернативных деревьев.

тельного слоя пурпурных серобактерий, многие виды которых способны переключаться на аэробный хемосинтез и составляют конкуренцию бесцветным серобактериям (Горленко, 1974). К таковым отно-

сится выделенная нами пурпурная серобактерия *Thiocapsa rosea*. Нахождение ПСБ выше ЗСБ, отмечалось ранее, как для соленых, так и для пресных меромиктических озер (Gorlenko et al., 1983).

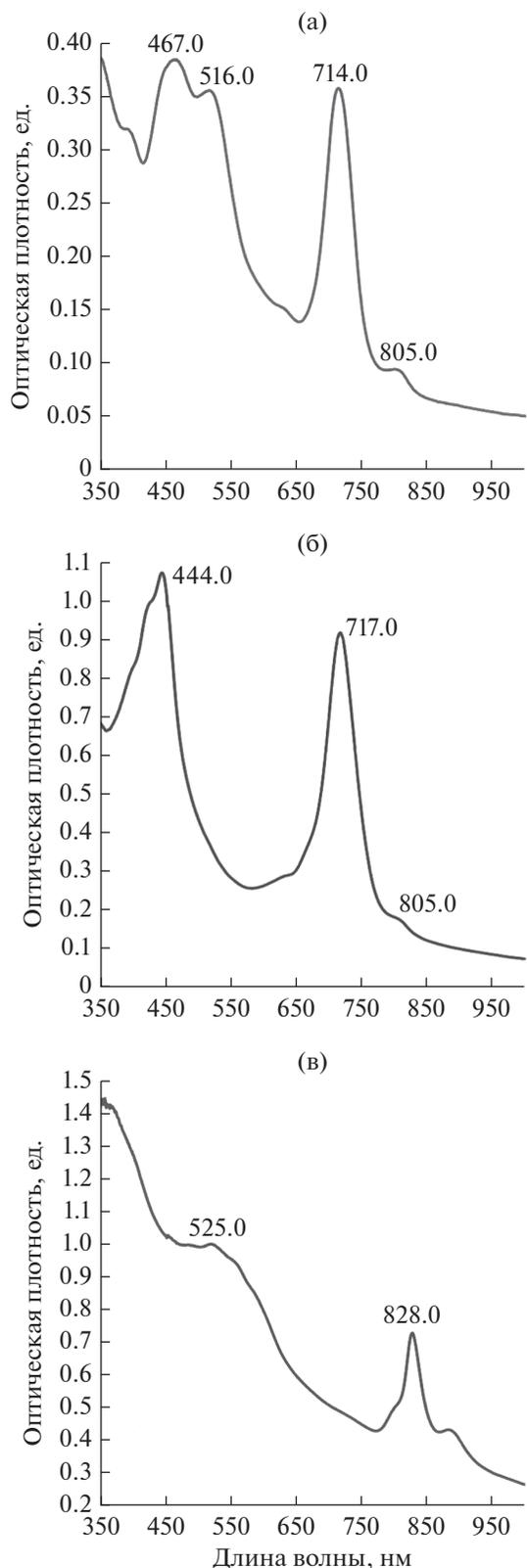


Рис. 11. Спектры поглощения целых клеток АФБ – коричнево-окрашенных серобактерий штамм ChKor-19a (а); зелено-окрашенных серобактерий штамм ChZel-19a (б) и пурпурных серобактерий штамм ThRos-19 (в), выделенных из хемоклина желоба Бухты Биофильтров.

Для других меромиктических озер Кандалакшской акватории подобного явления не наблюдалось. Морфометрические особенности Бухты Биофильтров позволяют предположить, что бактериальная пластина подвержена эрозии при участии разного рода течений и ветрового перемешивания; формирующие ее микроорганизмы могут разноситься на значительные расстояния и в пределах залива инфицировать экониши, благоприятные для развития привносимых видов. Эта гипотеза удовлетворительно объясняет генетическую однородность доминирования *Chlorobium phaeovibrioides* во всех озерах Кандалакшской акватории и в оз. Могильном, отделившемся от Баренцева моря и имеющего связь с Белым морем. Практическая значимость исследования микробных сообществ и микробных процессов в водоемах, отделенных от основного морского бассейна, связана, прежде всего, с необходимостью прогноза негативных последствий сероводородного заражения в искусственно замкнутых морских акваториях, появившихся в результате строительства дамб, плотин, приливных электростанций и т.д., а также с нарастающей актуальностью прогноза реакции морских экосистем на появление придонной бескислородной зоны – мирового тренда, наблюдаемого по всему мировому океану (Velinsky, Fogel, 1999; Middelburg, Levin, 2009; Zhang et al., 2010; Savvichev et al., 2017).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность капитанам и команде маломерного флота, а также водителям снегоходов (В.В. Сивонен и А.С. Козлов) ББС им. Н.А. Перцова за предоставленные возможности и всестороннюю помощь при сборе образцов, а также коллегам и друзьям, объединившимся в изучении меромиктических водоемов Белого моря, но не вошедших в число авторов этой статьи (А.В. Летаров, Н.М. Кокрятская, Г.Н. Лосюк, С.В. Пацаева, А.Н. Харчева). Авторы благодарят Н.А. Кострикину за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований. Секвенирование ДНК выполнено при помощи научного оборудования ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горленко В.М. Окисление тиосульфата *Atmoeobacter roseus* в темноте в микроаэрофильных условиях // Микробиология. 1974. Т. 43. С. 729–731.
- Краснова Е.Д. Экология меромиктических озер России. 1. Прибрежные морские водоемы // Водные ресурсы. 2021. Т. 48. № 3. С. 322–333.
<https://doi.org/10.31857/S0321059621030093>
- Krasnova E.D. Ecology of meromictic lakes of Russia. Coastal marine waterbodies // Water Resour. 2021. V. 48. P. 427–438.
<https://doi.org/10.1134/S009780782103009X>
- Краснова Е.Д., Пантюлин А.Н., Белевич Т.А., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Житина Л.С., Ильяш Л.В., Кокрятская Н.М., Лунина О.Н., Мардашова М.В., Саввичев А.С., Филиппов А.С., Шевченко В.П. Комплексные исследования отделяющихся водоемов на разных стадиях изоляции от Белого моря в марте 2012 г. // Океанология. 2013. Т. 53. С. 714–717.
- Krasnova E.D., Pantyulin A.N., Belevich T.A., Voronov D.A., Demidenko N.A., Zhitina L.S., Ilyash L.V., Kokryatskaya N.M., Lunina O.N., Mardashova M.V., Savvichev A.S., Filippov A.S., Shevchenko V.P. Multidisciplinary studies of the separating lakes at different stage of isolation from the White Sea performed in March 2012 // Oceanology. 2013. V. 53. P. 714–717.
- Лосюк Г.Н., Кокрятская Н.М., Краснова Е.Д. Сероводородное заражение прибрежных озер на разных стадиях изоляции от Белого моря // Океанология. 2021. Т. 61. С. 401–412.
- Losyuk G.N., Kokryatskaya N.M., Krasnova E.D. Hydrogen sulfide contamination of coastal lakes at different stages of isolation from the White Sea // Oceanology. 2021. V. 61. P. 351–361.
- Лунина О.Н., Саввичев А.С., Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Кузнецов Б.Б., Горленко В.М. Сукцессионные процессы в сообществе аноксигенных фототрофных бактерий озера Кисло-Сладкое (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 531–544.
<https://doi.org/10.7868/S0026365616050116>
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Krasnova E.D., Kokryatskaya N.M., Veslopolova E.F., Kuznetsov B.B., Gorlenko V.M. Succession processes in the anoxygenic phototrophic bacterial community in lake Kисло-Sladkoe (Kandalaksha Bay, White Sea) // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 570–582.
<https://doi.org/10.1134/S0026261716050118>
- Лунина О.Н., Саввичев А.С., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Колганова Т.В., Краснова Е.Ф., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Воронов Д.А., Кузнецов Б.Б., Демиденко Н.А., Летарова М.А., Летаров А.В., Горленко В.М. Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий меромиктического озера Трехцветное (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 100–115.
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Babenko V.V., Boldyreva D.I., Kuznetsov B.B., Kolganova T.V., Krasnova E.D., Kokryatskaya N.M., Veslopolova E.F., Voronov D.A., Demidenko N.A., Letarova M.A., Letarov A.V., Gorlenko V.M. Seasonal variations in the structure of an anoxygenic phototrophic bacterial community from the meromictic Lake Trekhtsvetnoe (Kandalaksha Bay, White Sea) // Microbiology, 2019. V. 88. P. 71–85.
- Романенко Ф.А., Шилова О.С. Последледниковое поднятие Карельского берега Белого моря по данным радиоуглеродного и диатомового анализов озерно-болотных отложений полуострова Киндо // Докл. Акад. Наук. 2012. Т. 442. № 4. С. 544–548.
- Romanenko F.A., Shilova O.S. The postglacial uplift of the Karelian coast of the White Sea according to radiocarbon and diatom analyses of lacustrine boggy deposits of Kindo Peninsula // Doklady Earth Sci. 2012. V. 442. P. 242–246.
- Alexander B., Andersen J., Cox R., Imhoff J. Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16S rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein // Arch. Microbiol. 2002. V. 178. P. 131–140.
<https://doi.org/10.1007/s00203-002-0432-4>
- Boehrer B., Schultze M. Stratification of lakes // Rev. Geophys. 2008. V. 46. RG2005.
<https://doi.org/10.1029/2006RG000210>
- Camacho A., Erez J., Chicote A., Florin M., Squires M.M., Lehmann C., Bahofen R. Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web // Aquat. Sci. 2001. V. 63. P. 91–106.
- Comeau A.M., Harding T., Galand P.E., Warwick F., Vincent W.F., Lovejoy C. Vertical distribution of microbial communities in a perennially stratified Arctic lake with saline, anoxic bottom waters // Sci. Rep. 2012. V. 2. P. 604.
<https://doi.org/10.1038/srep00604>
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Garcia-Gil L.J., Vicente E., Camacho A., Borrego C.M., Vila X., Cristina X.P., Rodriguez-Gonzalez J. Vertical distribution of photosynthetic sulphur bacteria linked to saline gradients in Lake ‘El Tobar’ (Cuenca, Spain) // Aquat. Microb. Ecol. 1999. V. 20. P. 299–303.
- Gorlenko W.M., Kuznezov S.I. Über die photosynthesierenden Bakterien des Kononjer-Sees // Arch. Hydrobiol. 1972. V. 70. № 1. S. 1–13.
- Gorlenko V.M., Vainshtein M.B., Kachalkin V.I. Microbiological characteristic of Lake Mogilnoye // Arch. Hydrobiol. 1978. V. 81. № 4. P. 475–492.
- Gorlenko V.M., Dubinina G.A., Kuznetsov S.I. The Ecology of Aquatic Micro-Organisms // [Die Binnengewasser, Band XXVIII] 1983. Ohle W., ed.; Wareing, Helen, trans. Published by E. Schweizerbart’sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. P. 252.
- Grouzdev D.S., Gaisin V.A., Krutkina M.S., Bryantseva I.A., Lunina O.N., Savvichev A.S., Gorlenko V.M. Genome sequence of *Prosthecochloris* sp. strain ZM and *Prosthecochloris* sp. strain ZM-2, isolated from an arctic meromictic lake // Microb. Res. Announc. 2018. V. 7. e01415-18.
<https://doi.org/10.1128/MRA.01415-18>
- Grouzdev D.S., Lunina O.N., Gaisin V.A., Krutkina M.S., Baslerov R.V., Savvichev A.S., Gorlenko V.M. Genome sequences of green- and brown-colored strains of *Chlorobium phaeovibrioides* with gas vesicles // Microb. Resour. An-

- nounc. 2019. V. 8. e00711-19.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00711-19>
- Guerrero R., Montesinos E., Pedros-Alio C., Esteve I., Mas J., van Gernerden H., Hoffmann P.A.G., Bakker J.F. Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: Vertical distribution and limiting factors // *Limnol. Oceanogr.* 1985. V. 30. P. 919–931.
- Gulati R.D., Zadereev T.S., Degermendzhi A.G. // *Ecology of meromictic lakes* / Eds. Gulati R.D., Zadereev T.S., Degermendzhi A.G. Springer International Publish, 2018. Ecol. Stud. V. 228. 405 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-49143-1>
- Hamilton T.L., Bovee R.J., Thiel V., Sattin S.R., Mohr W., Schaperdoth I., Vogl K., Gilhooly 3rd W.P., Lyons T.W., Tomsho L.P., Schuster S.C., Overmann J., Bryant D.A., Pearson A., Macalady J.L. Coupled reductive and oxidative sulfur cycling in the phototrophic plate of a meromictic lake // *Geobiology.* 2014. V. 12. P. 451–468.
- Han Y., Perner M. The globally widespread genus *Sulfurimonas*: versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 989.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00989>
- Jørgensen B.B., Kuenen J.G., Cohen Y. Microbial transformations of sulfur-compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai) // *Limnol. Oceanogr.* 1979. V. 24. P. 799–822.
- Klepac-Ceraj V., Hayes C.A., Gilhooly W.P., Lyons T.W., Kolter R., Pearson A. Microbial diversity under extreme euxinia: Mahoney Lake, Canada // *Geobiol.* 2012. V. 10. P. 223–235.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2012.00317.x>
- Krasnova E., Voronov D., Frolova N., Pantyulin A., Samsonov T. Salt lakes separated from the White Sea // *EARSeL Proc.* 2015. V. 14 (S.1). P. 8–22.
<https://doi.org/10.12760/02-2015-1-02>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Losyuk G., Kokryatskaya N., Krasnova E. Formation of hydrogen sulfide in isolated basins at the Karelian of the White Sea coast // *EARSeL eProc.* 2015. V. 14. P. 49–54.
<https://doi.org/10.12760/02-2015-1-07>
- McAuliffe C. Gas chromatographic determination of solutes by multiple phase equilibrium // *Chem. Technol.* 1971. V. 1. P. 46–51.
- Middelburg J.J., Levin L.A. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry // *Biogeosci.* 2009. V. 6. P. 1273–1293.
<https://doi.org/10.5194/bg-6-1273-2009>
- Murphy C.L., Biggerstaff J., Eichhorn A., Ewing E., Shahan R., Soriano D., Stewart S., VanMol K., Walker R., Walters P., Elshahed M.S., Youssef N.H. Genomic characterization of three novel *Desulfobacterota* classes expand the metabolic and phylogenetic diversity of the phylum // *Environ. Microb.* 2021. V. 23. P. 4326–4343.
- Overmann J. Mahoney Lake: a case study of the ecological significance of phototrophic sulphur bacteria // *Adv. Microb. Ecol.* 1997. V. 15. P. 251–288.
- Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *In situ* activity studies in thermal environments // *Methods Microbiol.* 2006. V. 35. P. 29–53.
- Pjevac P., Korlević M., Berg J.S., Bura-Nakić E., Ciglenečki I., Amann R., Orlić S. Community shift from phototrophic to chemotrophic sulfide oxidation following anoxic holomixis in a stratified seawater lake // *Appl. Environ. Microb.* 2015. V. 81. P. 298–308.
- Pruesse E., Peplies J., Glöckner F.O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // *Bioinformatics.* 2012. V. 28 P. 1823–1829.
- Rogozin D.Y., Zykov V.V., Chernetsky M.Y., Degermendzhy A.G., Gulati R.D. Effect of winter conditions on distributions of anoxic phototrophic bacteria in two meromictic lakes in Siberia, Russia // *Aquat. Ecol.* 2009. V. 43. P. 661–672.
- Savvichev A.S., Demidenko N.A., Krasnova E.D., Kalmatskaya O.V., Kharcheva A.N., Ivanov M.V. Microbial processes in the Kanda Bay, a meromictic water body artificially separated from the White Sea // *Dokl. Biol. Sci.* 2017. V. 474. P. 135–139.
- Savvichev A.S., Babenko V.V., Lunina O.N., Letarova M.A., Boldyreva D.I., Veslopolova E.F., Demidenko N.A., Kokryatskaya N.M., Krasnova E.D., Gaisin V.A., Kostryukova E.S., Gorlenko V.M., Letarov A.V. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic Lake Trekhtzvetnoe // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 3784–3797.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Beletsky A.V., Krasnova E.D., Voronov D.A., Kallistova A.Yu., Veslopolova E.F., Zakharova E.E., Kokryatskaya N.M., Losyuk G.N., Demidenko N.A., Belyaev N.A., Sigalevich P.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Microbial processes and microbial communities in the water column of the polar meromictic Lake Bol'shie Khruslomeny at the White Sea coast // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 1945. P. 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01945>
- Tonolla M., Peduzzi S., Hahn D., Peduzzi R. Spatio-temporal distribution of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland) // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003. V. 43. P. 89–98.
- Van Gernerden H., Mas J. Ecology of phototrophic sulfur bacteria // *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* / Eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. N.Y.: Kluwer Academic, 1995. P. 49–85.
- Velinsky D.J., Fogel M.L. Cycling of dissolved and particulate nitrogen and carbon in the Framvaren Fjord, Norway: Stable isotopic variations // *Mar. Chem.* 1999. V. 67. P. 161–180.
- Yakimov M.M., Merkel A.Y., Gaisin V.A., Pilhofer M., Messina E., Hallsworth J.E., Klyukina A.A., Tikhonova E.N., Gorlenko V.M. Cultivation of a vampire: '*Candidatus Absconditococcus praedator*' // *Environ. Microbiol.* 2022. V. 24. P. 30–49.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15823>
- Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 1613–1617.
- Zhang J., Gilbert D., Gooday A.J., Levin L., Naqvi S.W.A., Middelburg J.J., Scranton M., Ekau W., Peña A., Dewitte B., Oguz T., Monteiro P.M.S., Urban E., Rabalais N.N., Ittekkot V., Kemp W.M., Ulloa O., Elmgren R., Escobar-Brion E., Van der Plas A.K. Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development // *Biogeosci.* 2010. V. 7. P. 1443–1467.

Microbial Community of a Marine Meromictic Trough (Biofilter Bay) in the Kandalaksha Bay, White Sea

A. S. Savvichev^{1,*}, A. A. Kulakova¹, E. D. Krasnova², D. A. Voronov³, V. V. Kadnikov⁴, A. V. Beletskii⁴,
V. V. Kozyaeva⁴, I. I. Rusanov¹, M. A. Letarova¹, E. F. Veslopolova¹, V. V. Belenkova¹,
N. A. Demidenko⁵, and V. M. Gorlenko¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 117312 Russia

²Pertsov White Sea Biological Station, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, Russia

³Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia

⁴Skryabin Institute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

⁵Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: savvichev@mail.ru

Received February 17, 2022; revised March 14, 2022; accepted March 17, 2022

Abstract—The composition of microbial communities and the rates of microbial processes in the water column of a meromictic trough in the Biofilter Bay, Kandalaksha Bay, White Sea were investigated in September 2020 and March 2021. The chemocline zone was located at the depths from 8 to 9 m. Sulfide was present in the monimolimnion, its concentration at the bottom reaching 25–38 mg L⁻¹ (0.7–1.1 mmol). Conditions of the redox zone favored development of both anaerobic anoxygenic phototrophs and aerobic sulfur-oxidizing chemoautotrophs. A pinkish-brown bacterial plate was formed in this zone. Sequencing of the 16S rRNA gene fragments revealed predominance of green sulfur bacteria (GSB) *Chlorobium phaeovibrioides*. Aerobic sulfur-oxidizing bacteria *Sulfurimonas* sp. were the second most abundant group. Plating of chemocline samples on selective media resulted in massive formation of brown-colored *Chlorobi* colonies, while green GSB colonies were few. Both morphotypes were identified as *Chlorobium phaeovibrioides*. At the time of our study, purple sulfur bacteria (PSB) did not form a bacterial plate in the redox zone, although few PSB colonies were revealed. The PSB isolate was identified as *Thiocapsa rosea*. Members of this species are able to switch from photosynthesis to aerobic chemosynthesis and may compete for sulfide with sulfur-oxidizing chemoautotrophs. We suggest that due to its openness the Biofilter Bay meromictic trough may act as a source for the propagation of anoxygenic phototrophic bacteria in the Kandalaksha Bay.

Keywords: anoxygenic phototrophic bacteria, *Chlorobi* ecology, meromictic basins, microbial biogeochemistry, microbial communities

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИВЛИЯНИЕ НЕМОДИФИЦИРОВАННЫХ МНОГОСТЕННЫХ
УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗРУШЕНИЕ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК© 2022 г. Ю. Г. Максимова^{a, b, *}, Я. Е. Быкова^{a, b}, А. С. Зорина^a,
С. М. Никулин^c, А. Ю. Максимов^{a, b}^aИнститут экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского
федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия^bПермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия^cАкционерное общество “Уральский научно-исследовательский институт композиционных материалов”
 (“УНИИКМ”), Пермь, 614014 Россия

*e-mail: maks@iegm.ru

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

После доработки 23.03.2022 г.

Принята к публикации 24.03.2022 г.

Изучено влияние немодифицированных многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) на биопленки грамотрицательных бактерий, типичных представителей сообщества активного ила, и грамположительных родококков, играющих важную роль в биодеградации ксенобиотиков. Было показано, что наноматериалы этого типа не только не приводят к полному ингибированию биопленкообразования изученных бактерий, но и оказывают на них пробиопленочное действие. В присутствии МУНТ в условиях динамического равновесия с суспензионной культурой формировались менее массивные биопленки *Burkholderia dolosa* БОС, *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *R. ruber* gt1, но достоверно более массивные биопленки *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Alcaligenes faecalis* 2 и *R. erythropolis* 11-2, однако после предварительной адгезии клеток и в отсутствие суспензионной культуры все изученные штаммы формировали достоверно более массивную биопленку. Более интенсивному разрушению в присутствии МУНТ были подвержены биопленки грамотрицательных подвижных бактерий. Воздействие углеродных наноматериалов на метаболическую активность и жизнеспособность изученных бактерий было оценено по восстановлению соли тетразолия и окислительно-восстановительного индикатора резазурина, общему содержанию АТФ и нарушению цитоплазматической мембраны. Достоверно возрастала дыхательная активность клеток биопленок *R. erythropolis* 11-2 и *R. ruber* gt1, выращенных в присутствии МУНТ, и зрелых, выращенных на среде LB, биопленок *R. erythropolis* ИЛ БИО и *R. erythropolis* 11-2 при последующем воздействии на них МУНТ. Было отмечено отсутствие отрицательного воздействия МУНТ на восстановление метаболизируемого красителя ХТТ клетками. Комплексные исследования биопленкообразования и метаболической активности бактериальных клеток подтвердили отсутствие цитотоксического действия немодифицированных МУНТ на клетки грамотрицательных представителей сообщества активного ила и грамположительных родококков в составе биопленок.

Ключевые слова: бактериальные биопленки, многостенные углеродные нанотрубки, биопленкообразование, дыхательная активность, метаболическая активность

DOI: 10.31857/S0026365621100694

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой полую цилиндрическую структуру из плоскостей графена и, в зависимости от количества этих плоскостей, подразделяются на одно- (ОУНТ) и многостенные (МУНТ) (Aqel et al., 2012). Благодаря своим уникальным свойствам, среди которых высокая электро- и теплопроводность, прочность, значительная удельная поверхность и химическая инертность, наноматериалы этого типа нашли применение в таких областях, как материаловедение,

электроника, техническая химия, медицина, природоохранные мероприятия, биотехнологии. Получение больших объемов наноматериалов приводит к неизбежному их попаданию в окружающую среду, что ставит вопрос о воздействии на биоценозы, и в первую очередь на микробиоценозы естественной среды, а также на представителей сообщества активного ила очистных сооружений.

Взаимодействие микроорганизмов с УНТ может быть различным. Во-первых, накоплено достаточно данных о цитотоксических свойствах УНТ, что предполагает возможность использования их как антимикробных агентов (Kang et al., 2007, 2008), а микроорганизмов в качестве тест-объектов для изучения токсичности наноматериалов (Зарубина и соавт., 2009). Во-вторых, высокие адсорбционные способности УНТ позволяют применять их в технологиях очистки воды как носитель для иммобилизации (агрегации) микробных клеток (Yan et al., 2004; Das et al., 2014; Özdemir et al., 2017), в биокатализе (Максимова и соавт., 2017), биодegradации токсичных веществ (Qu et al., 2016), в качестве электропроводящего материала в микробных топливных элементах (Ghasemi et al., 2013) и биосенсорах (Tolmaciu, Morris, 2015).

Следуя современным представлениям микробиологии, основной формой существования микроорганизмов в природе является адгезированное состояние и формирование многовидовых сообществ, погруженных в вырабатываемый ими полимерный матрикс (Ножевникова и соавт., 2015). Биопленки имеют большое значение в технологиях очистки окружающей среды, биотехнологиях, связанных с получением энергии (микробные топливные элементы) и конструированием биосенсоров, а также представляют собой проблему медицинского характера, являясь трудно поддающейся антибиотикотерапии и антисептике формой существования болезнетворных микроорганизмов.

Биопленочный фенотип микроорганизмов существенно отличается от фенотипа одиночных планктонных клеток, в связи с чем результаты воздействия многих факторов внешней среды, химических веществ, биоцидов и антибиотиков, а также наноматериалов, могут значительно отличаться. Данные, касающиеся воздействия углеродных наноматериалов на бактериальные биопленки, достаточно противоречивы. С одной стороны, антимикробные свойства нанотрубок предотвращают адгезию клеток и формирование биопленок (Uradhyayula, Gadhamshetty, 2010; Sun, Zhang, 2016), с другой стороны, есть сведения, что биопленки могут нарастать на таких материалах: мертвые клетки на поверхности экранируют токсический эффект УНТ, в результате чего происходит образование биопленки по принципу “живое на мертвом” (Goodwin et al., 2015, 2016). В ряде исследований показано антибактериальное действие МУНТ на микробные биопленки. Продемонстрировано, что модификация нанотрубками полидиметилсилоксановых композитов снижает колонизацию этих поверхностей пионерными биопленками эукариотов (Sun, Zhang, 2016), а дисперсия МУНТ в структуре полиэфирсульфоновых мембран обеспечивает устойчивость таких композитных материалов к обрастанию биопленками модельных организмов *Escherichia coli* и *Pseudomonas*

aeruginosa (Madenli et al., 2020). Продемонстрирован эффект ингибирования биопленкообразования *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus epidermidis* МУНТ различной длины (Malek et al., 2016). Различные модификации МУНТ увеличивают их антимикробную активность. МУНТ, конъюгированные с антителами, применялись для фототермальной инактивации (обработки инфракрасным светом с целью эрадикации) стрептококков группы А (Levi-Polyachenko et al., 2014). МУНТ, покрытые антимикробным пептидом низином, обладали антиадгезивными свойствами и были эффективны против образования биопленок (Dong et al., 2014). Поверхности, модифицированные МУНТ и импрегнированные антибиотиком, препятствовали формированию биопленок патогенных микроорганизмов на эндопротезах (Hirschfeld et al., 2017). УНТ также используют в технологиях очистки воды, благодаря таким качествам, как большая площадь поверхности и простота функционализации. Они сами являются фильтрами, либо входят в состав мембран различного состава, так как препятствуют биообрастанию, способствуют дезинфекции, а также обладают прочностью и проницаемостью (Ihsanullah, 2019).

В свою очередь, углеродные наноматериалы могут способствовать образованию биопленок электрогенных микроорганизмов, что используется при конструировании микробных топливных элементов (Zhang et al., 2017; Jiang et al., 2018). Показано, что модификация нанотрубками анода микробных топливных элементов улучшает их электрохимические характеристики и повышает производительность (Zhang et al., 2018). Таким образом, две противоположные задачи – борьба с “вредными” биопленками и содействие образованию “полезных” биопленок могут решаться с помощью различных углеродных материалов, их функционализации и модификации. Однако воздействие углеродных нанотрубок в гораздо большей степени исследовано в отношении микробных клеток в суспензии, чем их биопленок.

В связи с этим целью работы явилось изучение влияния МУНТ на биопленкообразование и разрушение биопленок бактерий различных систематических групп, а также на жизнеспособность и метаболическую активность бактериальных клеток в составе биопленок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и характеристики МУНТ.

Объектами исследования явились грамотрицательные бактерии, ранее выделенные нами из активного ила очистных сооружений: *Alcaligenes faecalis* 2, *Acinetobacter guillouiae* 11h (Демаков и соавт., 2015), *Achromobacter pulmonis* ПНОС, *Burkholderia dolosa* БОС (Максимова и соавт., 2020), и грамположи-

тельные бактерии, ранее выделенные из почв: *R. erythropolis* ИЛ БИО, *R. erythropolis* 11-2, *R. ruber* gt1 (Максимов и соавт., 2003).

МУНТ синтезировали в Уральском научно-исследовательском институте композиционных материалов (г. Пермь, Россия) осаждением природного газа с содержанием метана около 97 об. %. Осаждение МУНТ проводили на катализаторе, содержащем оксиды магния, никеля, кобальта и частицы металлического сплава никеля и кобальта, МУНТ содержали 83.0% С, 16.6% MgO, 0.3% Со, 0.1% Ni и обладали следующими характеристиками: внешний диаметр 5–35 нм, внутренний диаметр 3–14 нм, длина не менее 2 мкм, удельная поверхность, измеренная по методу БЭТ, не менее 400 м²/г.

Условия культивирования биопленок и определение их биомассы. Бактериальные биопленки выращивали в 96-луночном полистироловом планшете “Медполимер” (Россия) в среде LB (“Sigma-Aldrich”, США) в присутствии МУНТ (200 мкг/мл). Предварительно для получения однородной суспензии среду с МУНТ обрабатывали УЗ в ультразвуковой ванне Elma Ultrasonic 30S (“Elma”, Германия) при 37 кГц 10 раз по 1 мин. В лунки планшета вносили 200 мкл среды, инокулировали 5 мкл бактериальной суспензии, содержащей 10⁹ КОЕ/мл. Контролем служили биопленки, выращенные на среде LB без МУНТ.

После 3–7 сут инкубации в термостате при 30°C планктонные клетки удаляли из лунок декантацией, отмывали биопленку 200 мкл калий-фосфатного буфера дважды и определяли биомассу образованной биопленки. Биопленку окрашивали 0.1% кристаллическим фиолетовым в течение 40 мин в темноте, удаляли краситель, отмывали 1 раз калий-фосфатным буфером и экстрагировали краситель 200 мкл 96% спирта. Биопленкообразование оценивали по оптической плотности раствора красителя при 540 нм на планшетном ридере Infinite M1000 pro (“TECAN”, Швейцария).

Во втором варианте изучали формирование биопленки из предварительно адгезированных клеток (Gannesen et al., 2018): 200 мкл бактериальной суспензии вносили в лунки полистиролового планшета для адгезии клеток, через 2 ч удаляли, отмывали однократно калий-фосфатным буфером и вносили по 200 мкл среды LB с МУНТ и без нанотрубок в качестве контроля; раз в сутки среду заменяли на свежую. Биомассу биопленок определяли как описано выше.

Для определения массивности полимерного матрикса биопленки, выращенные в лунках черного непрозрачного планшета (“Nunc”, Дания), окрашивали 150 мкл водного раствора конА-тетраметилродамина (500 мкг/мл) в течение 40 мин в темноте, удаляли краситель, отмывали биопленку 1 раз 150 мкл 0.9% NaCl. В качестве контроля краситель вносили в пустую лунку, удаляли и отмывали, как описано выше.

Массивность полимерного матрикса оценивали по интенсивности флуоресценции на планшетном ридере Infinite M1000 pro (“TECAN”, Швейцария) при длине волны возбуждения/испускания 555/580 нм (Зорина и соавт., 2019).

Влияние МУНТ на разрушение биопленок оценивали по биомассе биопленки, определенной описанным выше методом, после суточной инкубации выращенных на среде LB биопленок с 0.9% NaCl, содержащим 200 мкг/мл МУНТ. Контролем служили биопленки, инкубированные с 0.9% NaCl без МУНТ.

Оценка влияния МУНТ на метаболическую активность биопленок. Воздействие МУНТ на дыхательную активность биопленок оценивали колориметрическим методом с использованием набора реактивов ХТТ Cell Proliferation Assay Kit (“Roche”, Германия). Биопленки грамположительных и грамотрицательных бактерий выращивали в полистирольном плоскодонном 96-луночном планшете в 200 мкл среды LB с добавлением МУНТ (200 мкг/мл) в течение 7 и 3 сут соответственно, контролем служили биопленки, выращенные на среде LB без МУНТ. Сформированные биопленки отмывали и вносили 100 мкл 0.9% раствора NaCl с добавлением 50 мкл реактива ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфобензил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид). Измерения проводили на планшетном ридере Infinite M1000 pro (“TECAN”, Швейцария) при ОП₄₈₀ через каждый час в течение 7 ч. Во второй серии опытов выращенные, как описано выше, на среде LB биопленки отмывали, вносили 100 мкл 0.9% NaCl с МУНТ (200 мкг/мл) и добавляли 50 мкл реактива ХТТ, контролем служил 0.9% NaCl без добавок. Измерения проводили, как описано выше. Уровень влияния МУНТ на метаболическую активность бактериальных клеток определяли как отношение оптической плотности экспериментального образца к оптической плотности контрольного образца (ОП_{экспер}/ОП_{контр}) через 6 ч инкубации. При значении, превышающем 1, делали вывод о повышении дыхательной активности, менее 1 – о снижении дыхательной активности.

Метаболическую активность клеток биопленок оценивали по уровню флуоресценции после окраски PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (“Invitrogen”, США). Биопленки грамположительных и грамотрицательных бактерий выращивали в черном полистироловом плоскодонном 96-луночном планшете (“Nunc”, Дания) в 200 мкл среды LB в течение 3 и 7 сут соответственно, отмывали фосфатным буфером, вносили 0.9% NaCl с МУНТ (200 мкг/мл), инкубировали в термостате. Через 1 ч биопленки отмывали 100 мкл 0.9% NaCl однократно. В лунки вносили 90 мкл 0.9% NaCl и 10 мкл PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. После 10 мин инкубации при температуре 37°C измеряли уро-

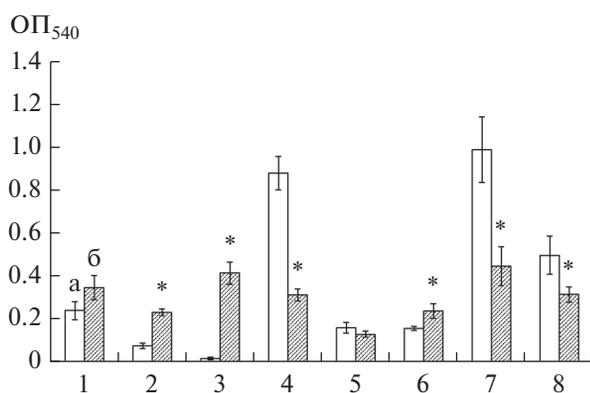


Рис. 1. Биомасса биопленок *A. pulmonis* ПНОС (1), *A. guillouiae* 11h (2), *A. faecalis* 2 (3), *B. dolosa* БОС (4), *R. erythropolis* ИЛ БИО (5), *R. erythropolis* 11-2 (6), *R. erythropolis* 4-1 (7), *R. ruber* gt1 (8), сформированных в присутствии планктонной культуры в среде LB (а) и в среде LB с МУНТ (б), (* $p < 0.05$).

вень флуоресценции при λ возбуждения/испускания 560/590 нм. Условные единицы флуоресценции контрольных образцов (1 ч инкубации с 0.9% NaCl без внесения МУНТ) принимали за 100%. Окраску реактивом PrestoBlue™ Cell Viability Reagent проводили отдельно для биопленок и планктонных клеток.

Эпифлуоресцентная микроскопия биопленок. Биопленки грамотрицательных и грамположительных бактерий выращивали в течение 3 и 7 сут соответственно в чашках Петри на предметных стеклах (25 × 75 мм) в среде LB, содержащей 200 мкг/мл МУНТ, или среде LB без МУНТ в качестве контроля. Среду инокулировали клетками соответствующего штамма. Стекла с биопленками отмывали фосфатным буфером (рН 7) однократно, окрашивали красителем LIVE/DEAD® (Syto 9/пропидиум иодид) BacLight™ Bacterial Viability Kit (“Invitrogen”, США) из расчета 3 мкл смеси красителя на 1 мл физиологического раствора (0.9% NaCl), инкубировали в темноте в течение 20 мин и просматривали в световом микроскопе Leica DM LS (Германия) с флуоресценцией. Процент живых и мертвых клеток подсчитывали с помощью программы BioFilmAnalyzer (Bogachev et al., 2018).

Статистический анализ результатов проводили с помощью стандартного пакета лицензионной программы MS Excel 2007, определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего. Достоверность различий определяли с использованием критерия Стьюдента. Авторы принимали, что варьирование результатов в их экспериментах подчиняется закону нормального распределения. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$ ($n = 7-14$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние МУНТ на биоленкообразование и разрушение биопленок. Изучено влияние МУНТ на биоленкообразование актино- и протеобактерий (рис. 1). В первом варианте опыта биоленкообразование оценивали в присутствии планктонной культуры. Показано, что МУНТ в среде культивирования приводили к увеличению биомассы биопленок *A. faecalis* 2, *A. guillouiae* 11h и *R. erythropolis* 11-2 и ее снижению у *B. dolosa* БОС и *R. ruber* gt1. Увеличение биомассы сформированных биопленок может быть связано с двумя факторами: во-первых, УНТ в среде культивирования могут способствовать агрегации клеток и приводить к повышенной адгезии. При биоленкообразовании в присутствии планктонной культуры возникает динамическое равновесие между прикрепленной и неприкрепленной культурами, и увеличение или уменьшение биомассы биопленки происходит за счет влияния МУНТ на планктонную культуру или формирующуюся биопленку: может происходить снижение или стимуляция роста клеток, повышенная агрегация и включение планктонных клеток в состав биопленки в процессе роста, или наоборот, дисперсия клеток. Также увеличение биомассы биопленок может быть ответом клетки на различные стрессовые факторы. Как следует из накопленных знаний, касающихся формирования биопленок, микробные популяции переходят от планктонного способа существования к прикрепленному под воздействием различных стрессовых условий (Плакунов и соавт., 2017). Менее массивные биопленки могут формироваться за счет снижения выработки полимерного матрикса, либо за счет отрицательного влияния внешних факторов на жизнеспособность, рост и размножение клеток. В данном эксперименте полного ингибирования биоленкообразования в присутствии МУНТ отмечено не было.

Во втором варианте экспериментов бактериальные клетки предварительно адгезировали в лунках полистиролового планшета в течение 2 ч, после чего суспензию удаляли и заменяли свежей питательной средой. Формирование биопленок в данном случае было первичным по отношению к планктонному росту, однако не был исключен переход клеток биопленки в планктонное состояние и размножение клеток в суспензии. Для всех изученных культур отмечали эффективное биоленкообразование в присутствии МУНТ, что свидетельствовало о пробиоленочном эффекте этих наноматериалов (рис. 2).

Показано усиление процесса разрушения биопленок *A. pulmonis* ПНОС, *B. dolosa* БОС и *A. guillouiae* 11h под воздействием МУНТ, тогда как на биопленки грамположительных бактерий рода *Rhodococcus* углеродные наноматериалы влияние не оказывали (рис. 3). Разрушение биопленки

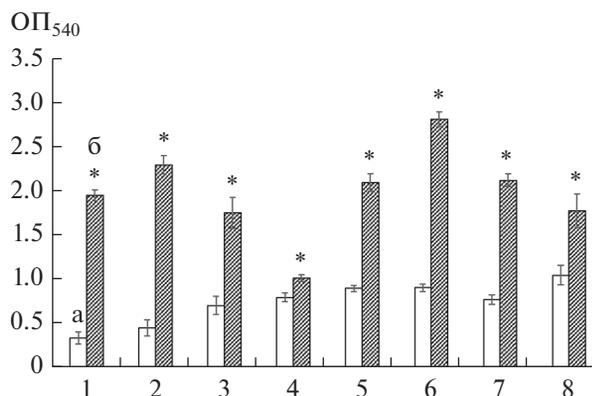


Рис. 2. Формирование биопленок после предварительной адгезии клеток *A. pulmonis* ПНОС (1), *A. guillouiae* 11h (2), *A. faecalis* 2 (3), *B. dolosa* БОС (4), *R. erythropolis* ИЛ БИО (5), *R. erythropolis* 11-2 (6), *R. erythropolis* 4-1 (7), *R. ruber* gt1 (8) в среде LB (a) и в среде LB с МУНТ (б), (* $p < 0.05$).

является следствием как более активной миграции клеток и перехода в планктонное состояние, так и отрыва целых фрагментов биопленки. Нами было показано, что под влиянием МУНТ интенсивнее разрушались биопленки грамотрицательных подвижных бактерий, что может быть обусловлено их меньшей прочностью, а также более активным переходом подвижных клеток из прикрепленного состояния в свободно плавающее.

Оценка воздействия МУНТ на жизнеспособность и метаболическую активность клеток в составе биопленок. Жизнеспособность и метаболическую активность клеток в составе биопленок оценивали различными методами. Прямой высев клеток биопленок и определение КОЕ не является достаточно точным методом вследствие неравномерного разрушения клеточных агрегатов (Плакунов и соавт., 2016), поэтому в данной работе были использованы косвенные методы, среди которых оценка дыхательной активности с использованием реактива ХТТ Cell Proliferation Assay Kit и метаболической активности с использованием PrestoBlue™ Cell Viability Reagent, а также оценка общего содержания АТФ и соотношения живых и мертвых клеток (клеток с интактной и нарушенной мембраной) методом флуоресцентной микроскопии при окраске красителем LIVE/DEAD®. Изучена динамика изменения оптической плотности раствора красителя ХТТ, добавленного к бактериальным биопленкам, выращенным с МУНТ в среде культивирования и в среде без нанотрубок. Бактериальные биопленки для данного эксперимента были выращены в присутствии планктонной культуры. Более интенсивное восстановление соли тетразолия, входящей в состав ХТТ, до оранжевого раствора формазана связано с увеличением количества дегидрогеназ, участвующих в переносе электронов от

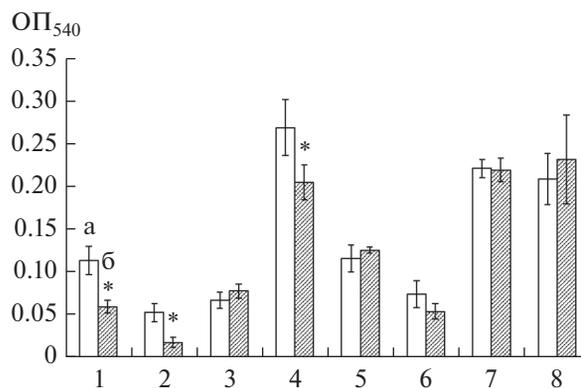


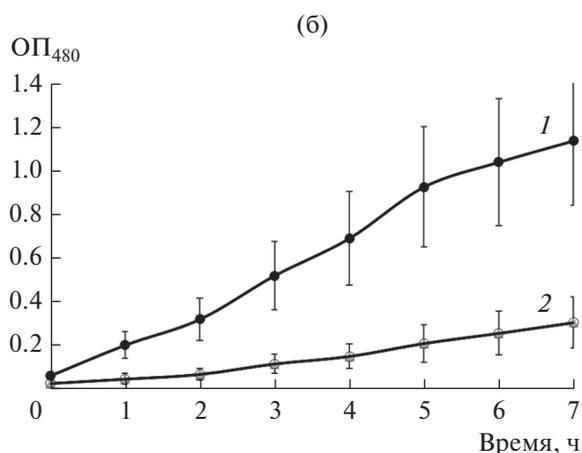
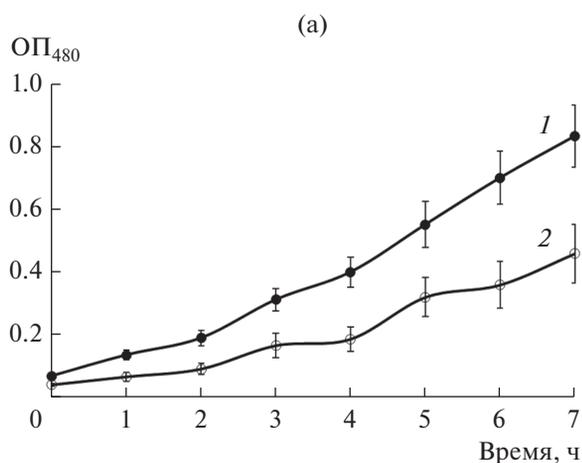
Рис. 3. Разрушение биопленок *A. pulmonis* ПНОС (1), *A. guillouiae* 11h (2), *A. faecalis* 2 (3), *B. dolosa* БОС (4), *R. erythropolis* ИЛ БИО (5), *R. erythropolis* 11-2 (6), *R. erythropolis* 4-1 (7), *R. ruber* gt1 (8) в 0.9% NaCl (a) и в 0.9% NaCl с МУНТ (б), (* $p < 0.05$).

донора к соединению тетразолия, и поэтому может коррелировать с количеством жизнеспособных клеток. В присутствии МУНТ достоверно увеличивалась дыхательная активность клеток биопленок *R. erythropolis* 11-2 (рис. 4a) и *R. ruber* gt1 (рис. 4б). У культур *A. faecalis* 2, *A. guillouiae* 11h и *R. erythropolis* 11-2 отмечена корреляция между общим биопленкообразованием и относительным содержанием живых клеток, оцененным по изменению ОП₄₈₀ раствора ХТТ, однако в отношении *R. ruber* gt1 получены противоположные данные (табл. 1). Определено, что *R. ruber* gt1, в отличие от *R. erythropolis* 11-2, в присутствии МУНТ формировал биопленку, массивность которой была достоверно меньше, чем на среде LB без добавок. Такое противоречие могло объясняться снижением продукции полимерного матрикса. Полимерный матрикс биопленок, синтезируемый в присутствии и отсутствии МУНТ, был окрашен конканавалин А-тетраметилпроламином, и было показано, что полисахаридная основа внеклеточного матрикса *R. ruber* gt1 незначительно, но достоверно менее массивна при формировании биопленки в присутствии МУНТ (рис. 5). Можно предположить, что такая же тенденция будет прослеживаться и при формировании биопленки из предварительно адгезированных клеток, однако в последнем случае формируется значительно более массивная биопленка под воздействием МУНТ, чем в состоянии динамического равновесия с планктонными клетками.

В то же время, восстановление ХТТ было более интенсивным при добавлении МУНТ к выращенным на среде LB биопленкам всех изученных штаммов бактерий, и у *R. erythropolis* ИЛ БИО и *R. erythropolis* 11-2 эта разница была достоверна (рис. 6, табл. 1). Увеличение содержания формазана при восстановлении ХТТ под воздействием

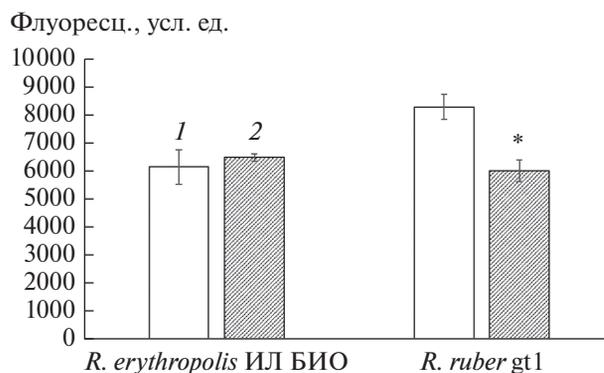
Таблица 1. Воздействие МУНТ на метаболическую активность клеток биопленок

Штаммы	Коэффициент интенсивности воздействия МУНТ на дыхательную активность, I		Метаболическая активность биопленок/планктонных культур после воздействия МУНТ, %
	выращивание биопленок в присутствии МУНТ	воздействие МУНТ на выращенные биопленки	
<i>A. pulmonis</i> ПНОС	1.0	1.9	32/94
<i>A. guillouiae</i> 11h	1.9	1.7	107/136
<i>A. faecalis</i> 2	1.5	1.3	88/95
<i>B. dolosa</i> БОС	1.3	1.2	81/124
<i>R. erythropolis</i> 4-1	0.9	1.1	86/89
<i>R. erythropolis</i> ИЛ БИО	0.9	3.3*	162/88
<i>R. erythropolis</i> 11-2	1.8*	1.9*	99 /257
<i>R. ruber</i> gt1	3.7*	1.2	92/89

* $p < 0.05$.**Рис. 4.** Дыхательная активность 7-суточных биопленок *R. erythropolis* 11-2 (а) и *R. ruber* gt1 (б), выращенных на среде LB в присутствии МУНТ (1) и на среде LB без добавок (2).

зрелых биопленок в присутствии МУНТ могло быть связано либо с более интенсивной работой дыхательной цепи вследствие адаптивного ответа клеток на присутствие наноматериалов, либо более активным переносом электронов с помощью дегидрогеназ, опосредованным электропроводящими свойствами углеродных нанотрубок. Как следовало из результатов исследования абиотического контроля, МУНТ без клеток на реагент не воздействовали.

Общую интенсивность метаболизма клеток биопленок также оценивали по появлению флуоресценции при окраске PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. Оценка уровня метаболической активности связана с трансформацией в живых клетках окислительно-восстановительного индикатора резазурина в флуоресцирующий резорурфин. Показано, что ме-

**Рис. 5.** Массивность полимерного матрикса биопленок *R. erythropolis* ИЛ БИО и *R. ruber* gt1 при формировании биопленок на среде LB (1) и на среде LB с МУНТ (2).

таболизм биопленок и планктонных культур незначительно изменялся после часового воздействия МУНТ, а у ряда штаммов превышал таковой в контрольных условиях. Снижение флуоресценции отмечено только у биопленок *A. pulmonis* ПНОС (табл. 1). Дополнительно оценили влияние МУНТ в течение 1 ч на разрушение биопленок: было определено достоверное отличие от контроля только для биопленок *R. erythropolis* 4-1 и *A. guillouiae* 11h, причем биопленки *R. erythropolis* 4-1 разрушались активнее под действием МУНТ (массивность биопленки была снижена на 27%), а *A. guillouiae* 11h – в присутствии 0.9% NaCl без нанотрубок (массивность биопленки превышала контрольную почти в 2 раза). У остальных штаммов достоверной разницы в массивности биопленок после часовой инкубации с МУНТ в растворе 0.9% NaCl и контролем без МУНТ не наблюдали, следовательно, отличие уровня флуоресценции не было связано с разрушением биопленок.

Нарушение цитоплазматической мембраны клеток в биопленках оценивали с помощью окраски LIVE/DEAD® и подсчитывали количество живых и мертвых клеток, используя программу Bio-

FilmAnalyzer. Было показано, что при выращивании в присутствии МУНТ формируются биопленки, содержащие даже большие количества живых клеток, чем на среде LB без добавок (табл. 2). Данный факт мог быть связан с более активной адгезией и инициацией процесса биопленкообразования как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, и отсутствием повреждающего действия МУНТ на клетки.

Определение энергетического статуса клеток в составе биопленок, сформированных в присутствии МУНТ. Изучили влияние МУНТ на содержание АТФ в клетках биопленок. Известно, что общее содержание АТФ в биопленке может говорить как о количестве жизнеспособных клеток, так и о стрессовом состоянии клетки, при котором количество АТФ может либо снижаться, либо возрастать при разобщении энергетического и конструктивного метаболизма. Показано, что у *A. guillouiae* 11h, *A. faecalis* 2 и *R. ruber* gt1 общее содержание АТФ при выращивании биопленок в присутствии МУНТ возрастает (рис. 7), что коррелирует с данными, полученными другими методами: у представителей грамотрицательных бактерий увеличивается как общее биопленкообразование в присутствии МУНТ, так и метаболическая активность за счет жизнеспособных клеток биопленки, а у *R. ruber* gt1 при меньшей биомассе биопленки, сформированной в присутствии МУНТ, содержание жизнеспособных клеток не снижается, а уменьшается только массивность полисахаридного матрикса.

Таким образом, показано, что МУНТ не оказывает ингибирующего действия на биопленкообразование и метаболическую активность клеток представителей экологически и биотехнологически значимых групп бактерий: грамположительных родококков, имеющих большой потенциал для использования в технологиях очистки окру-

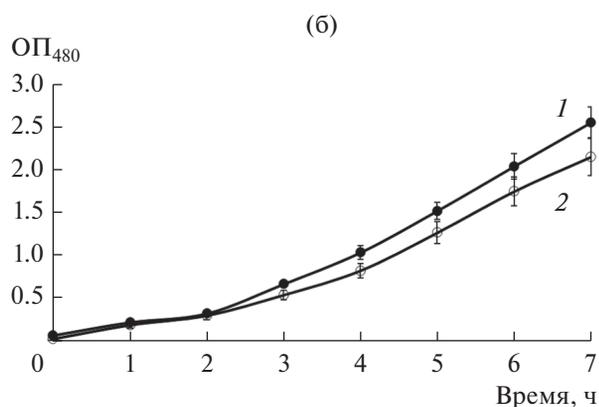
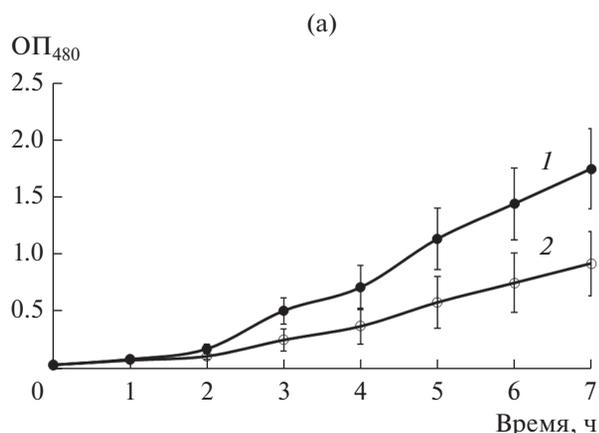


Рис. 6. Дыхательная активность биопленок *R. erythropolis* 11-2 (а) и *R. ruber* gt1 (б), выращенных на среде LB, определенная по восстановлению ХТГ в 0.9% NaCl с МУНТ (1) и в 0.9% NaCl без добавок (2).

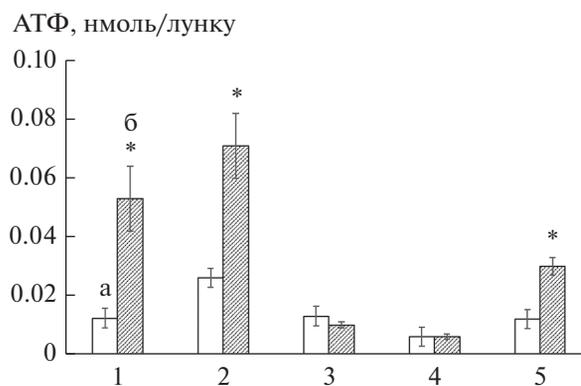


Рис. 7. Содержание АТФ в клетках биопленок *A. guillouiae* 11h (1), *A. faecalis* 2 (2), *R. erythropolis* ИЛ БИО (3), *R. erythropolis* 11-2 (4), *R. ruber* gt1 (5) при росте на среде LB (а) и на среде LB с МУНТ (б).

Таблица 2. Оценка жизнеспособности клеток биопленок при воздействии МУНТ

Штаммы	Клетки с ненарушенной мембраной, %	
	LB	LB + МУНТ
<i>B. dolosa</i> БОС	19.3 ± 4.3	89.7 ± 3.7
<i>A. faecalis</i> 2	65.0 ± 4.4	90.0 ± 5.4
<i>R. erythropolis</i> 4-1	77.1 ± 3.1	95.5 ± 4.1
<i>R. erythropolis</i> ИЛ БИО	93.3 ± 3.8	65.2 ± 5.9
<i>R. erythropolis</i> 11-2	48.6 ± 10.6	83.6 ± 5.3
<i>R. ruber</i> gt1	33.2 ± 6.5	55.5 ± 8.9

жающей среды от нефтепродуктов и тяжелых металлов (Ившина и соавт., 2013), и граммотрицательных бактерий водной среды, которые являются типичными представителями сообщества активного ила. Снижение биомассы биопленок, формируемых в присутствии МУНТ в условиях динамического равновесия с планктонной культурой, было связано в большей степени с выработкой полисахаридного матрикса, а не с нарушением жизнеспособности клеток. Предварительно адгезированные клетки изученных культур формировали достоверно более массивные биопленки в присутствии МУНТ.

Диаметр МУНТ превышает диаметр ОУНТ, в результате чего цитотоксическое действие немодифицированных МУНТ отмечается реже (Zardini et al., 2012) и, как было показано в данной работе, практически не проявляется в отношении бактериальных клеток, находящихся в составе биопленок. Однако следует отметить, что в окружающей среде МУНТ могут подвергаться различным модификациям под воздействием ультрафиолетового облучения и гуминовых кислот почвы, что может внести коррективы во взаимоотношения МУНТ с бактериальными биопленками (Sartori et al., 2021). В данной работе отмечено изменение интенсивности дыхательной активности бактериальных клеток в двух различных вариантах экспериментов: при выращивании биопленок в присутствии МУНТ и при воздействии МУНТ на предварительно выращенные зрелые биопленки. Повышение дыхательной активности биопленки, выращенной в присутствии МУНТ, свидетельствует, главным образом, о большем количестве жизнеспособных клеток, а более интенсивное восстановление соли тетразолия до формаза под воздействием МУНТ у клеток выращенных биопленок связано с более активным переносом электронов с помощью дегидрогеназ, опосредованным воздействием МУНТ на мембрану, либо является следствием общего адаптивного ответа клетки. Полной эрадикации биопленок в присутствии МУНТ не наблюдали, при этом более интенсивному разрушению были подвержены биопленки подвижных граммотрица-

тельных бактерий, а не грамположительных родококков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 20-44-596002.

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

- Демаков В.А., Васильев Д.М., Максимова Ю.Г., Павлова Ю.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. Бактерии активного ила биологических очистных сооружений, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкарбоновых кислот // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 369–378.
- Demakov V.A., Vasil'ev D.M., Pavlova Y.A., Ovechkina G.V., Maksimov A.Y., Maksimova Y.G. Activated sludge bacteria transforming cyanopyridines and amides of pyridinecarboxylic acids // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 433–441.
- Зарубина А.П., Лукашев Е.П., Деев Л.И., Пархоменко И.М., Рубин А.Б. Бiotестирование биологических эффектов одностенных углеродных нанотрубок с использованием тест-системы люминесцентных бактерий // Российские нанотехнологии. 2009. Т. 4. № 11–12. С. 152–155.
- Zarubina A.P., Lukashov E.P., Deev L.I., Parkhomenko I.M., Rubin A.B. Biotesting the biological effects of single-wall carbon nanotubes using bioluminescent bacteria test-system // Nanotechnologies in Russia. 2009. V. 4. № 11–12. P. 871–875.
- Зорина А.С., Максимова Ю.Г., Демаков В.А. Биопленкообразование моно- и смешанных культур штаммов *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 175–183.

- Zorina A.S., Maksimova Y.G., Demakov V.A. Biofilm formation by monocultures and mixed cultures of *Alcaligenes faecalis* 2 and *Rhodococcus ruber* gt 1 // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 164–171.
- Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костина Л.В. Адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам тяжелых металлов // Экология. 2013. С. 115–123.
- Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Kostina L.V. Adaptive mechanisms of nonspecific resistance to heavy metal ions in alkanotrophic actinobacteria // Russ. J. Ecol. 2013. V. 44. P. 123–130.
- Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Козлов С.В., Максимова Ю.Г., Демаков В.А. Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus* sp. gt1 // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. С. 63–68.
- Maksimov A.Yu., Kuznetsova M.V., Ovechkina G.V., Kozlov S.V., Maksimova Yu.G., Demakov V.A. Effects of nitriles and amides on the growth and nitrile hydratase activity of the *Rhodococcus* sp. strain gt1 // Appl. Biochem. Microbiol. 2003. V. 39. P. 55–59.
- Максимова Ю.Г., Никулин С.М., Осовецкий Б.М., Демаков В.А. Гетерогенный биокатализатор на основе клеток нитрилгидролизующих бактерий и многослойных углеродных нанотрубок для трансформации нитрилов и амидов // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 462–469.
- Maksimova Y.G., Demakov V.A., Osovetskii B.M., Nikulin S.M. Heterogeneous biocatalyst for nitrile and amide transformation based on cells of nitrile-hydrolyzing bacteria and multiwalled carbon nanotubes // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 506–512.
- Максимова Ю.Г., Сергеева А.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. Деградация пиридина суспензиями и биопленками штаммов *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Burkholderia dolosa* БОС, выделенных из активного ила очистных сооружений // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 2. С. 86–98.
- Maksimova Yu.G., Sergeeva A.A., Ovechkina G.V., Maksimov A.Yu. Pyridine degradation by suspensions and biofilms of *Achromobacter pulmonis* PNOS and *Burkholderia dolosa* BOS strains isolated from activated sludge of sewage treatment plants // Biotechnology (Biotechnologiya). 2020. V. 36. № 2. P. 86–98.
- Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 623–644.
- Nozhevnikova A.N., Botchkova E.A., Plakunov V.K. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 731–750.
- 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.
- Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты // 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.
- Aqel A., El-Nour K.M.M.A., Ammar R.A.A., Al-Warthan A. Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation // Arabian J. Chem. 2012. V. 5. P. 1–23.
- Bogachev M., Volkov V., Markelov O., Trizna E., Baydamshina D., Melnikov V., Zelenikhin P., Murtazina R., Sharafutdinov I., Kayumov A. Fast and simple tool for the quantification of biofilm-embedded cells sub-populations from fluorescent microscopic images // PLoS One. 2018. V. 13. e0193267.
- Das R., Hamid S.B.A., Ali M.E., Ismail A.F., Annuar M.S.M., Ramakrishna S. Multifunctional carbon nanotubes in water treatment: The present, past and future // Desalination. 2014. V. 354. P. 160–179.
- Dong X., McCoy E., Zhang M., Yang L. Inhibitory effects of nisin-coated multi-walled carbon nanotube sheet on biofilm formation from *Bacillus anthracis* spores // J. Environ. Sci. 2014. V. 26. P. 2526–2534.
- 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. 2018. V. 9. Art. 2912.
- Ghasemi M., Daud W.R.W., Hassan S.H.A., Ohc S.-E., Ismail M., Rahimnejad M., Jahim J.M. Nano-structured carbon as electrode material in microbial fuel cells: A comprehensive review // J. Alloys Compd. 2013. V. 580. P. 245–255.
- Goodwin D.G., Jr., Marsh K.M., Sosa I.B., Payne J.B., Gorham J.M., Bouwer E.J., Fairbrother D.H. Interactions of microorganisms with polymer nanocomposite surfaces containing oxidized carbon nanotubes // Environ. Sci. Technol. 2015. V. 49. P. 5484–5492.
- Goodwin D.G., Jr., Xia Z., Gordon T.B., Gao C., Bouwer E.J., Fairbrother D.H. Biofilm development on carbon nanotube/polymer nanocomposites // Environ. Sci.: Nano. 2016. V. 3. P. 545–558.
- Hirschfeld J., Akinoglu E.M., Wirtz D.C., Hoerauf A., Bekeredjian-Ding I., Jepsen S., Haddouti E.-M., Limmer A., Giersig M. Long-term release of antibiotics by carbon nanotube-coated titanium alloy surfaces diminish biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2017. V. 13(4). P. 1587–1593.
- Ihsanullah. Carbon nanotube membranes for water purification: Developments, challenges, and prospects for the future // Separat. Purificat. Technol. 2019. V. 209. P. 307–337.
- Jiang Z., Zhang D., Zhou L., Deng D., Duan M., Liu Y. Enhanced catalytic capability of electroactive biofilm modified with different kinds of carbon nanotubes // Anal. Chim. Acta. 2018. V. 1035. P. 51–59.
- Kang S., Pinault M., Pfeifferle L.D., Elimelech M. Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity // Langmuir. 2007. V. 23. P. 8670–8673.
- Kang S., Herzberg M., Rodrigues D.F., Elimelech M. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! // Langmuir. 2008. V. 24. P. 6409–6413.

- Levi-Polyachenko N., Young C., MacNeill C., Braden A., Argenta L., Reid S. Eradicating group A streptococcus bacteria and biofilms using functionalised multi-wall carbon nanotubes // *Int. J. Hyperthermia*. 2014. V. 30. P. 490–501.
- Madenli E.C., Yanar N., Choi H. Enhanced antibacterial properties and suppressed biofilm growth on multi-walled carbon nanotube (MWCNT) blended polyethersulfone (PES) membranes // *J. Environ. Chem. Engin.* 2020. V. 9. Art. 104755.
- Malek I., Schaber C.F., Heinlein T., Schneider J.J., Gorb S.N., Schmitz R.A. Vertically aligned multi walled carbon nanotubes prevent biofilm formation of medically relevant bacteria // *J. Mater. Chem. B*. 2016. V. 4. P. 5228–5235.
- Özdemir S., Oduncu M.K., Kilinc E., Soylak M. Tolerance and bioaccumulation of U(VI) by *Bacillus mojavensis* and its solid phase preconcentration by *Bacillus mojavensis* immobilized multiwalled carbon nanotube // *J. Environ. Manage.* 2017. V. 187. P. 490–496.
- Qu Y., Wang J., Zhou H., Ma Q., Zhang Z., Li D., Shen W., Zhou J. Concentration-dependent effects of carbon nanotubes on growth and biphenyl degradation of *Dyella ginsengisoli* LA-4 // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. P. 2864–2872.
- Sartori D.R., Bertuola M., Miñan A., Gonik E., Gonzalez M.C., de Melé M.F.L. Environmentally induced changes of commercial carbon nanotubes in aqueous suspensions. Adaptive behavior of bacteria in biofilms // *ACS Omega*. 2021. V. 6. P. 5197–5208.
- Sun Y., Zhang Z. New anti-biofouling carbon nanotubes-filled polydimethylsiloxane composites against colonization by pioneer eukaryotic microbes // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2016. V. 110. P. 147–154.
- Tolmaciu C.-M., Morris M.C. Carbon nanotube biosensors // *Front. Chem.* 2015. V. 3. A. 59.
- Upadhyayula V.K.K., Gadhamshetty V. Appreciating the role of carbon nanotube composites in preventing biofouling and promoting biofilms on material surfaces in environmental engineering: a review // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. P. 802–816.
- Yan H., Pan G., Zou H., Li X., Chen H. Effective removal of microcystins using carbon nanotubes embedded with bacteria // *Chin. Sci. Bull.* 2004. V. 49. P. 1694–1698.
- Zardini H.Z., Amiri A., Shanbedi M., Maghrebi M., Baniadam M. Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method // *Colloids Surf. B*. 2012. V. 92. P. 196–202.
- Zhang P., Liu J., Qu Y., Zhang J., Zhong Y., Feng Y. Enhanced performance of microbial fuel cell with a bacteria/multi-walled carbon nanotube hybrid biofilm // *J. Power Sourc.* 2017. V. 361. P. 318–325.
- Zhang Y., Chen X., Yuan Y., Lu X., Yang Z., Wang Y., Sun J. Long-term effect of carbon nanotubes on electrochemical properties and microbial community of electrochemically active biofilms in microbial fuel cells // *Int. J. Hydrogen Energy*. 2018. V. 43. P. 16240–16247.

Effect of Pristine Multi-Walled Carbon Nanotubes on Formation and Degradation of Bacterial Biofilms

Yu. G. Maksimova^{1, 2, *}, Ya. E. Bykova^{1, 2}, A. S. Zorina¹, S. M. Nikulin³, and A. Yu. Maksimov^{1, 2}

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

²Perm State National Research University, Perm, 614990 Russia

³JSC “Ural Research Institute of Composite Materials” (UNIIKM), Perm, 614014 Russia

*e-mail: maks@iegm.ru

Received November 15, 2021; revised March 23, 2022; accepted March 24, 2022

Abstract—The effect of pristine multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) on the biofilms of gram-negative bacteria, typical members of the activated sludge community, and gram-positive rhodococci involved in xenobiotic biodegradation, was investigated. Nanomaterials of this type not only did not inhibit biofilm formation completely, but were shown to have a probiofilm effect on the studied bacteria. In the presence of MWCNT in dynamic equilibrium with suspension cultures, less massive biofilms of *Burkholderia dolosa* BOS, *Rhodococcus erythropolis* 4-1, and *R. ruber* gt1, but reliably more massive biofilms of *Acinetobacter guilouiae* 11h, *Alcaligenes faecalis* 2, and *R. erythropolis* 11-2 were formed. However, after preliminary cell adhesion and in the absence of suspension culture, all studied strains formed reliably more massive biofilms. More pronounced degradation in the presence of MWCNT was observed for the biofilms of motile gram-negative bacteria. The effect of carbon nanomaterials on the metabolic activity and viability of the studied strains was assessed by reduction of a tetrazolium salt and of the redox indicator resazurin, total ATP content, and cell membrane disturbance. The respiratory activity reliably increased in the biofilms of *R. erythropolis* 11-2 and *R. ruber* gt1 grown in the presence of MWCNT, as well as in mature biofilms of *R. erythropolis* IL BIO and *R. erythropolis* 11-2 grown in LB medium and then treated with MWCNT. MWCNT were shown to have no negative effect on reduction of metabolized stain XTT by the cells. Comprehensive investigation of biofilm formation and metabolic activity of bacterial cells confirmed the absence of cytotoxic effect of pristine MWCNT on the cells of gram-negative activated sludge bacteria and gram-positive rhodococci in biofilms.

Keywords: bacterial biofilms, multi-walled carbon nanotubes, biofilm formation, respiratory activity, metabolic activity