

СОДЕРЖАНИЕ

Том 90, номер 3, 2021

ОБЗОРЫ

Ацетогены: биохимия, энергетика, генетика, биотехнологический потенциал <i>В. Г. Дебабов</i>	259
Микроорганизмы донных отложений Байкала – самого глубокого и древнего озера мира <i>Т. И. Земская, С. В. Букин, А. В. Ломакина, О. Н. Павлова</i>	286

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Метаноксиляющая активность и филогенетическое разнообразие аэробных метанотрофов в поверхностных осадках моря Лаптевых <i>Е. Н. Тихонова, В. В. Кадников, И. И. Русанов, А. В. Белецкий, Е. Е. Захарова, О. С. Самылина, Н. В. Равин, Н. В. Пименов</i>	304
Таксономическое разнообразие и размерно-морфологическая структура бактериопланктона Рыбинского водохранилища <i>Е. В. Кузнецова, Е. В. Суханова, Д. Б. Косолапов</i>	315
Таксономическое разнообразие бактериального сообщества плодовых тел миксомицета <i>Lycogala epidendrum</i> (L.) Fr. <i>Л. Р. Сизов, Л. В. Лысак, В. И. Гмошинский</i>	329
Рамнан клеточной стенки актинобактерий рода <i>Curtobacterium</i> <i>В. А. Зайчиков, Н. В. Потехина, А. С. Дмитренко, Дин Фань, Е. М. Тульская, Л. В. Дорофеева, Л. И. Евтушенко</i>	337
Природный полиморфизм пектиназных генов <i>PGU</i> дрожжей рода <i>Saccharomyces</i> <i>Е. С. Наумова, А. Н. Боровкова, М. Ю. Шаламитский, Г. И. Наумов</i>	344

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Новые штаммы-деструкторы линдана <i>Achromobacter</i> sp. NE1 и <i>Brevundimonas</i> sp. 242 <i>Д. О. Егорова, Э. А. Назарова, В. А. Демаков</i>	357
Выделение нового хемолитотрофного сульфатредуцирующего фирмикута из термальной скважины в Тюмени <i>И. А. Панова, М. А. Григорьев, Л. Б. Глухова, М. Р. Авакян, О. В. Карначук</i>	362
Новая среда для культивирования “ <i>Desulforudis audaxviator</i> ” <i>А. П. Лукина, О. В. Карначук</i>	367

ХРОНИКА

К 70-летию со дня рождения члена-корреспондента РАН Елизаветы Александровны Бонч-Осмоловской	372
Памяти члена-корреспондента РАН Льва Владимировича Калакуцкого	374
Памяти профессора Валерия Константиновича Ерошина (28.12.1932–26.07.2020)	377
Правила для авторов	379

Contents

Vol. 90, No. 3, 2021

Reviews

Acetogens: Biochemistry, Bioenergetics, Genetics, and Biotechnological Potential

V. G. Debabov 259

Bottom Sediment Microorganisms of Lake Baikal, the Deepest and Oldest Lake in the World

T. I. Zemskaya, S. V. Bukin, A. V. Lomakina, and O. N. Pavlova 259

Experimental Articles

Methane-Oxidizing Activity and Phylogenetic Diversity of Aerobic Methanotrophs in the Laptev Sea Upper Sediment Horizons

E. N. Tikhonova, V. V. Kadnikov, I. I. Rusanov, A. V. Beletsky, E. E. Zakharova, O. S. Samylina, N. V. Ravin, and N. V. Pimenov 259

Taxonomic Diversity and Size-Morphological Structure of Bacterioplankton of the Rybinsk Reservoir

E. V. Kuznetsova, E. V. Sukhanova, and D. B. Kosolapov 259

Taxonomic Diversity of the Bacterial Community Associated with the Fruiting Bodies of the Myxomycete *Lycogala epidendrum* (L.) Fr.

L. R. Sizov, L. V. Lysak, and V. I. Gmshinskii 259

Cell Wall Rhamnan in Actinobacteria of the genus *Curtobacterium*

V. A. Zaichikov, N. V. Potekhina, A. S. Dmitrenok, Ding Fan, E. M. Tul'skaya, L. V. Dorofeeva, and L. I. Evtushenko 259

Natural Polymorphism of Pectinase *PGU* Genes in the *Saccharomyces* Yeasts

E. S. Naumova, A. N. Borovkova, M. Yu. Shalamitskiy, and G. I. Naumov 259

Short Communications

New Lindane-Degrading Strains *Achromobacter* sp. NE1 and *Brevundimonas* sp. 242

D. O. Egorova, E. A. Nazarova, and V. A. Demakov 259

Isolation of a Novel Chemolithotrophic Sulfate-Reducing Firmicute from a Tyumen Thermal Borehole

I. A. Panova, M. A. Grigoriev, L. B. Glukhova, M. R. Avakyan, and O. V. Karnachuk 259

A Novel Medium for Cultivation of “*Desulforudis audaxviator*”

A. P. Lukina and O. V. Karnachuk 259

Chronicles

70 Years to E.A. Bonch-Osmolovskaya 372

In Memorium L.V. Kalakutskii, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences 374

In Memorium Professor V.K. Eroshin 377

Rules for authors 379

АЦЕТОГЕНЫ: БИОХИМИЯ, ЭНЕРГЕТИКА, ГЕНЕТИКА, БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

© 2021 г. В. Г. Дебабов*

ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

*e-mail: debabov13@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 25.01.2021 г.

Принята к публикации 25.01.2021 г.

Ацетогены – это анаэробные грамположительные бактерии, способные к росту на газовых субстратах – CO_2 , CO , H_2 . Отличительной особенностью этих бактерий служит биохимический путь восстановления CO_2 до ацетил CoA, называемый ацетил-CoA восстановительный путь или путь Вуда–Льонгдала (Wood Ljungdahl Pathway, WLP). Это единственный путь фиксации CO_2 , сопряженный с запасанием энергии. Вследствие эффективной нефотосинтетической фиксации двуокиси углерода ацетогены могут служить платформой для получения биотоплива и химикатов в будущей экономике, основанной на возобновляемой энергии и ресурсах. Недостатком ацетогенов, растущих на газовых субстратах, является низкая энергетическая обеспеченность и ограниченность синтезируемых конечных метаболитов, главным образом, уксусной кислоты и этанола, и в небольших количествах бутанола и масляной кислоты. Ацетогены обладают способностью к гетеротрофному росту на многих субстратах – сахарах, лактате, спиртах. Перспективным направлением увеличения энергообеспеченности процессов является миксотрофия – одновременное использование разных субстратов ацетогенами. Как для успешного сопряжения различных метаболических путей, так и для расширения репертуара синтезируемых соединений необходимо использование методов метаболической инженерии. В последние годы генетические инструменты для преобразования геномов ацетогенов существенно усовершенствованы. Данный обзор рассматривает современное состояние биохимии, энергетики, генетики ацетогенов и их биотехнологический потенциал.

Ключевые слова: ацетогены, CO_2 -фиксация, путь Wood–Ljungdahl, электронная бифуркация, генетические инструменты, метаболическая инженерия, биотопливо, хранение водорода

DOI: 10.31857/S0026365621030022

ВВЕДЕНИЕ

Ацетогены – это анаэробные грамположительные бактерии, главным образом, филы *Firmicutes*, представленные более чем 20 родами (Darke et al., 2008, 2013). Ацетогены растут автотрофно на газовых субстратах (CO_2 , CO , H_2), и при этом основным продуктом метаболизма оказывается уксусная кислота (ацетат), что и послужило основанием для их названия. Значительная и наиболее изученная часть ацетогенов относится к роду *Clostridia* (Latif et al., 2014). Фиксацию двуокиси углерода ацетогены осуществляют через ацетил-CoA восстановительный путь, который также называется путем Вуда–Льонгдала (Wood–Ljungdahl Pathway или сокращенно WLP) (Rogsdale, Pierce, 2008). Отличительной чертой ацетогенов является то, что фиксация CO_2 у них сочетается с накоплением энергии, что и позволяет им осуществлять литотрофный рост.

Большинство ацетогенов способны к гетеротрофному росту на разнообразных субстратах (сахара, спирты, лактат). Уникальная способность к фиксации CO_2 и метаболическая гибкость способствовали широкому распространению ацетогенов в природе. Они широко представлены во многих анаэробных экологических нишах, таких как донные отложения морей и пресных водоемов, метаногенные сообщества, горячие источники и т.д. По некоторым оценкам, ацетогены ежегодно фиксируют до 10 млрд т CO_2 (Rogsdale, 2008). Среди ацетогенов встречаются как мезофилы, так и термофилы (Basen, Müller, 2017). В последние годы показано, что способностью к фиксации CO_2 обладают и некоторые археи (Rogsdale, 2008; He et al., 2016). Большая часть фундаментальных исследований и попыток практического применения выполнена на ограниченном числе представителей ацетогенов, главным образом, это

Clostridium ljungdahlii, *C. autoethanogenum*, *Acetobacterium woodii*, *Moorella thermoacetica*, *Sporomusa ovata*.

ПУТЬ ВУДА–ЛЮНГДАЛА (WLP)

Используя путь Вуда–Люнгдала ацетогены способны синтезировать ацетил-СоА из двух молекул CO_2 , используя в качестве восстановителя молекулярный водород. На сегодня известно 6 различных биохимических путей биологической фиксации CO_2 (Fast et al., 2012), но только ацетогены способны одновременно с фиксацией CO_2 накапливать энергию. В отличие от других путей фиксации CO_2 , WLP – линейный путь, состоящий из двух ветвей – метильной и карбонильной (рис. 1). В метильной ветви CO_2 восстанавливается до формиата с помощью фермента формиатдегидрогеназы. В качестве восстановителя в этой реакции используется NADPH. Далее формильная группа связывается с тетрагидрофолатом с образованием формилтетрагидрофолата. Эта реакция требует гидролиза 1 молекулы АТФ. Далее через ряд последовательных реакций формильная группа восстанавливается до метильной (метилтетрагидрофолат). Метильная группа с метилтетрагидрофолата переносится на специальный белок-переносчик, содержащий железосерные кластеры и кобаламин (Corrinoid Iron Sulfur Protein – FeSP) (Rogsdale, 2008). В карбонильной ветви молекула CO_2 восстанавливается до СО с помощью фермента карбонмонооксид дегидрогеназы ацетил-СоА синтетазы (CoDH/Acs). Это ключевой фермент всего WLP пути. Далее CoDH/Acs катализирует реакцию синтеза ацетил-СоА из метильной группы, доставляемой белком CFeSP, СО и коэнзима А. На самом деле CoDH/Acs – два фермента, работающих в достаточно прочном комплексе. Карбонмонооксид дегидрогеназа (CoDH) может функционировать как независимый фермент в форме гомодимера. CoDH может взаимодействовать с гидрогеназой для сопряжения окисления СО и образования водорода (Burton et al., 2018). Восстановление CO_2 до СО сопряжено с окислением ферредоксина (рис. 1).

Большинство ацетогенов превращает ацетил-СоА в ацетилфосфат с высвобождением кофермента СоА. Далее ацетаткиназа синтезирует уксусную кислоту с генерацией 1 моля АТФ. Таким образом, на уровне субстратного фосфорилирования, путь WLP оказывается нейтральным: 1 молекула АТФ образуется и 1 молекула расходуется. Вместе с тем, суммарная реакция образования уксусной кислоты из 4 молекул водорода и 2 молекул CO_2 термодинамически выгодна и осуществляется с выделением энергии (уравнение 1):



Ацетогены способны в ходе ацетогенеза использовать часть этой энергии путем создания мембранного ионного градиента и синтеза АТФ мембранно-связанными АТФазами (Schuchman, Müller, 2014).

КОНВЕРСИЯ ЭНЕРГИИ АЦЕТОГЕНАМИ

Для создания ионного градиента ацетогены обычно используют протоны, но некоторые виды используют ионы Na^+ . Для синтеза АТФ бактерии обладают либо H^+ -зависимыми, либо Na^+ -зависимыми мембранными АТФазами. Транслокация ионов через мембрану осуществляется мембранно-связанными комплексами, движущей силой работы которых является окисление Fd. У ацетогенов обнаружено два типа таких комплексов, называемых Rnf и Ech (Schuchman, Müller, 2014). Оба комплекса – многосубъединичные образования, обязательной частью которых являются субъединицы, обеспечивающие локализацию комплексов в мембране. Субъединица, катализирующая окисление восстановленного ферредоксина, субъединица, обеспечивающая транслокацию ионов и субъединица, катализирующая сопряженную с окислением Fd восстановительную реакцию (см. рис. 2). В случае Rnf происходит восстановление NAD^+ в NADH, а в случае Ech восстановление протонов до водорода. Была предложена классификация ацетогенов на основании наличия у них Rnf- или Ech-комплексов (Schuchman, Müller, 2014).

Кластеры Ruf способны транслоцировать как ионы Na^+ (*A. woodii*), так и H^+ (*C. ljungdahlii*). Как правило, Rnf- и Ech-комплексы содержат 8–9 субъединиц, и гены, ответственные за их синтез, образуют кластеры. Часто геномы бактерии содержат более одного кластера Ech и Rnf (Schoelmerich, Müller, 2020), тем не менее, делеция Rnf-генов у *A. woodii* полностью прекращает рост на $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (Westphal et al., 2018), что доказывает, что в данном случае это единственная функционирующая система. Геномный анализ 25 различных ацетогенов показал, что 19 из них содержат гены Rnf-комплексов, 9 Ech-комплексов, а 4 содержат как Rnf, так и Ech. Среди последних *Sporomusa ovata* и *Clostridium scatologenes* (Schoelmerich, Müller, 2020).

Недавно найдена анаэробная бактерия кишечника *Pseudobutyribrio ruminis*, у которой имеются функционально активные Ruf- и Ech-комплексы и Na^+ - и H^+ -зависимые АТФазы (Schoelmerich et al., 2020). Один из первых описанных ацетогенов, *Clostridium aceticum*, также способен к Na^+ -зависимому росту и, вместе с тем, может использовать H^+ -градиент для получения энергии (Mayer, Weuster-Botz, 2017).

Следует отметить, что детальное экспериментальное исследование функционирования Rnf- и Ech-комплексов осуществлено на небольшом числе примеров: Rnf-комплекс *A. woodii* (Hess et al.,

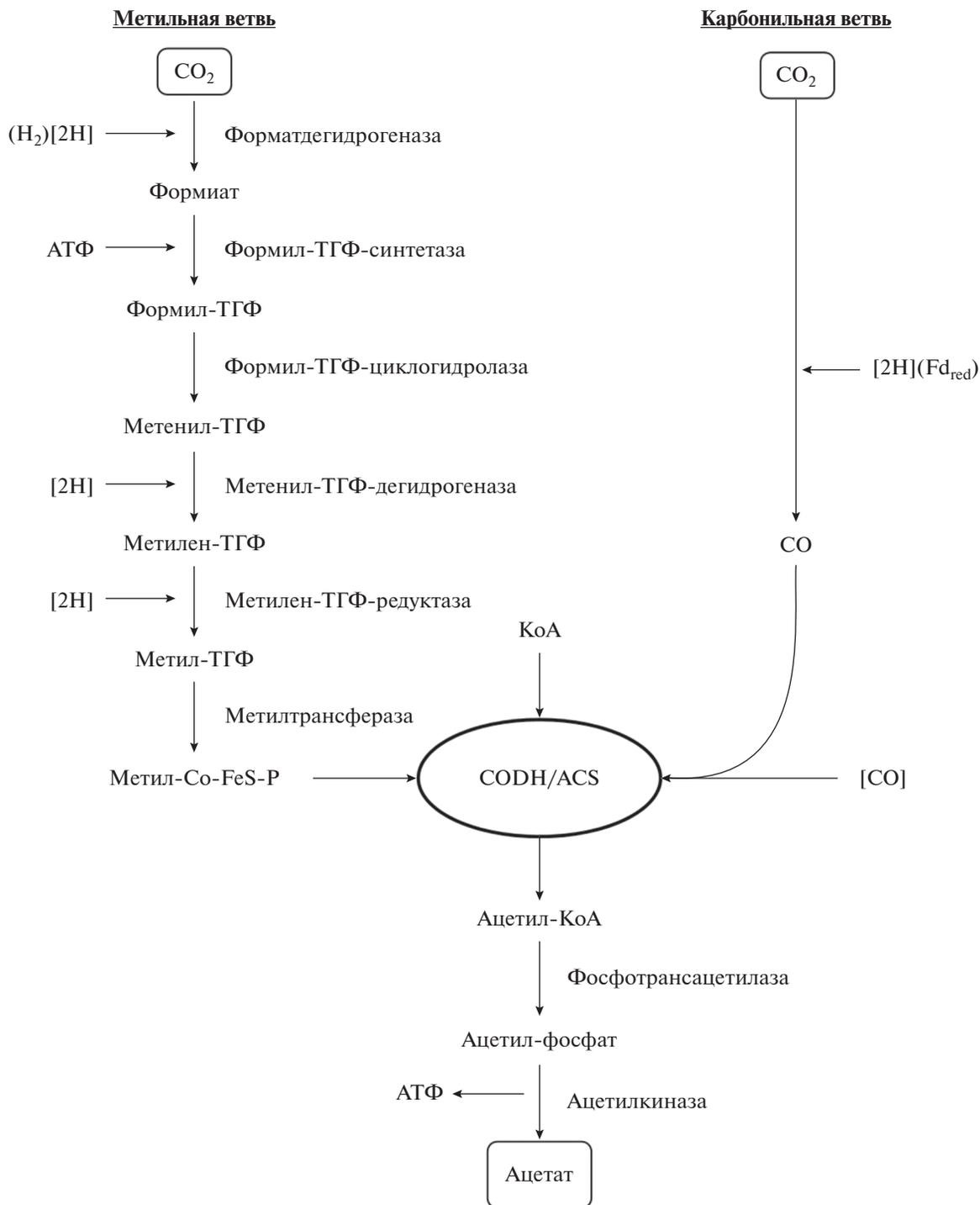


Рис. 1. Восстановление CO₂ до ацетата – путь Вуда–Люнгдаля (WLP). THF – тетрагидрофолиевая кислота [H] – восстановительные эквиваленты; CoFeSP – белок, переносчик метильной группы; CODH/ACS – карбонилдегидрогеназа – CoA синтетаза.

2013) и *C. ljungdahlii* (Tremblay et al., 2012) и Ech-комплекс *Thermoanaerobacter kivui* (Schoelmerich, Müller, 2019b). Движущей силой работы как Rnf-, так и Ech-комплексов является окисление восстановленного ферредоксина (Fd_{red}). Ферредоксины –

древние белки, содержащие простетические группы в виде железосерных комплексов (FeS, Fe₂S₂ и Fe₄S₄). Стандартный окислительно-восстановительный потенциал пары Fd_{red}/Fd_{ox} E₀' = ~470–

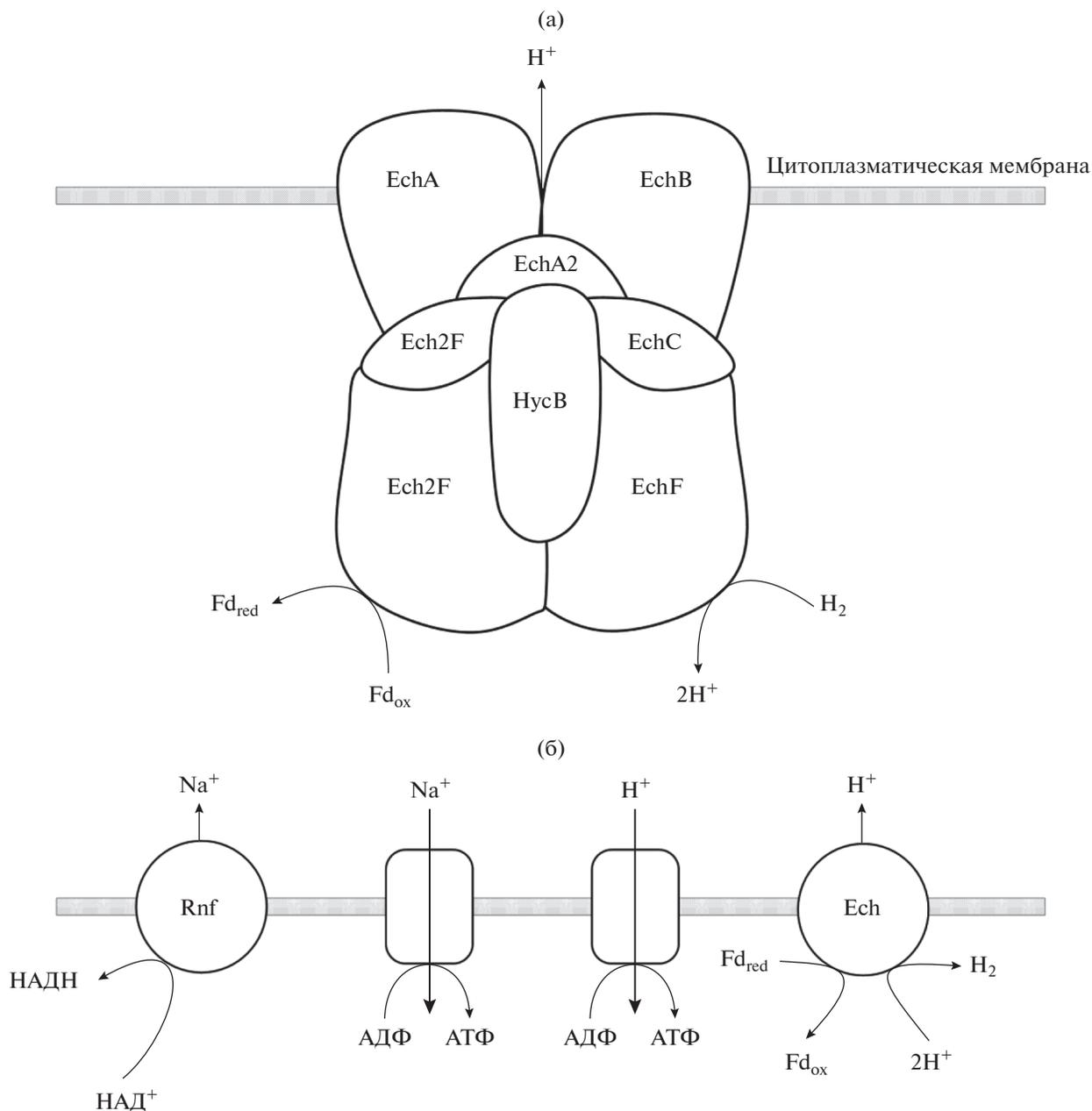


Рис. 2. а – Структура Ech-комплекса в мембране *Thermoanaerobacter kivui*. б – Схема консервации энергии у ацетогенов через осмохимический механизм: □ – Na^+ - или H^+ -зависимые мембранные АТФ-азы; Rnf- и Ech-комплексы, обеспечивающие экспорт протонов и ионов Na; Fd_{red} – восстановленный ферредоксин, обеспечивающий функционирование Rnf- и Ech-комплексов.

500 мВ, т.е. восстановление ферредоксина – очень энергозатратная реакция. Для восстановления ферредоксина ацетогены используют специфический процесс, названный электронной бифуркацией.

ЭЛЕКТРОННАЯ БИФУРКАЦИЯ

Электронная бифуркация – окислительно-восстановительный процесс, при котором окис-

ление одного донора приводит к восстановлению двух акцепторов, причем одна из реакций восстановления идет с выделением энергии (экзергоническая реакция), а вторая – с поглощением энергии (эндергоническая реакция). Экзергоническая реакция обеспечивает энергией эндергоническую, делая процесс термодинамически разрешенным (рис. 3).

Процесс электронной бифуркации постулировал Питер Митчел в 1975 г. для объяснения процес-

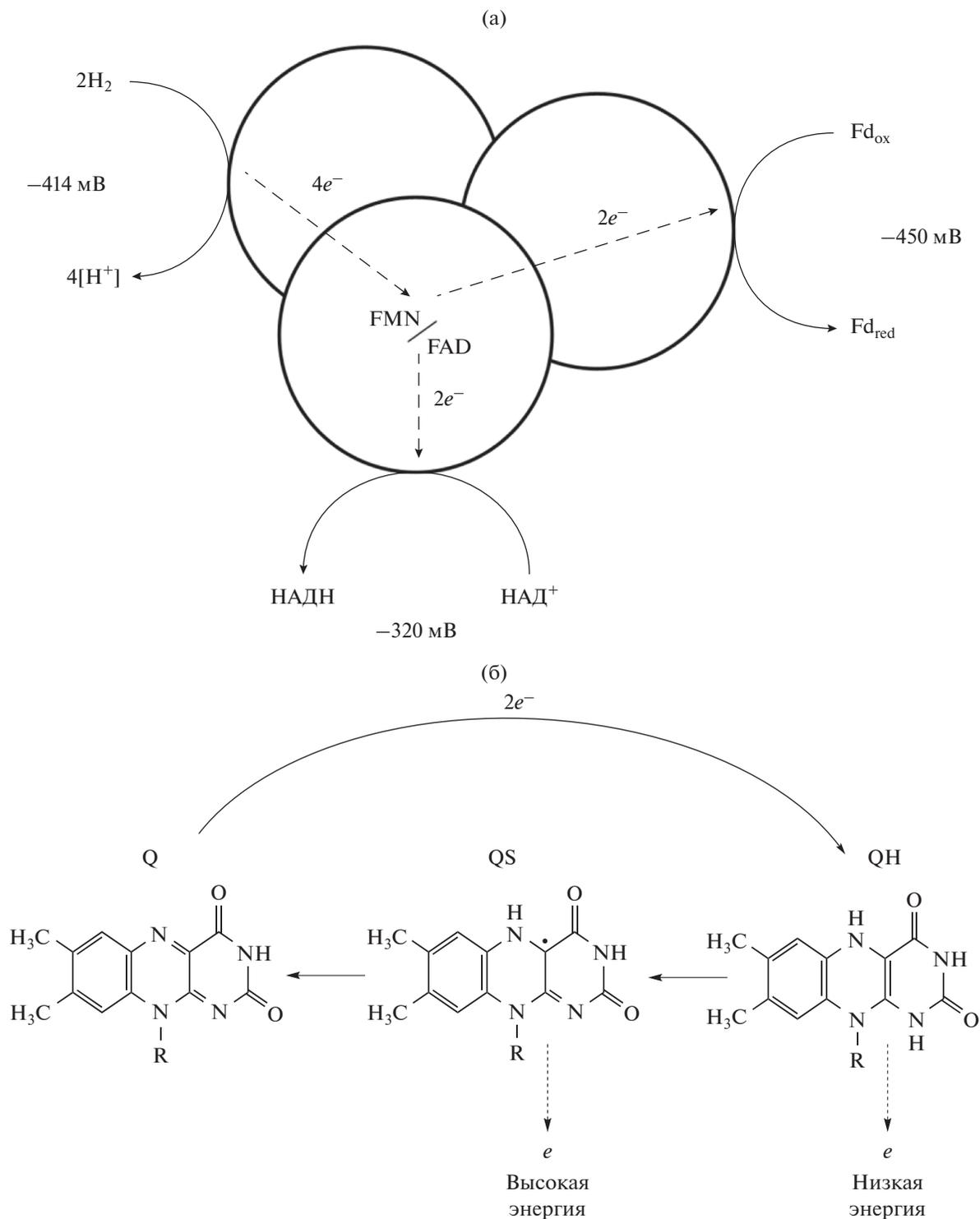


Рис. 3. а – Флавин-зависимая бифуркация (пояснение в тексте); б – механизм окисления флавинов, связанный с бифуркацией. Q – флавинохинон; QS – флавиносемихинон (радикал); QH – гидрохинон. Флавинохинон окисляется в гидрохинон, акцептируя пару электронов от донора. QH отдает 1 электрон низкой энергии в экзергоническую ветвь и превращается в короткоживущий радикал QS. Флавиносемихинон отдает 1 электрон высокой энергии в эндергоническую ветвь, вновь возвращаясь в исходное состояние Q.

са аэробного дыхания в митохондриях (Mitchell, 1975, 1976). В плане нашего рассмотрения анаэробных ацетогенов, нас будет интересовать вариант электронной бифуркации, открытой в 2008 г. (Herrmann et al., 2008) и названной флавин-зависимой электронной бифуркацией (Flavin based electronic bifurcation, FBEB). Этот процесс обеспечивает в анаэробных микроорганизмах биосинтез восстановленного ферредоксина (Fd_{red}) – электронного переносчика с очень низким отрицательным потенциалом ($E'_0 = \sim 450\text{--}500$ мВ).

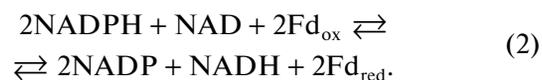
Особенностями строения всех FBEB-комплексов является обязательное наличие флавина (FMN или FAD), который участвует в бифуркации электронов и субъединиц, осуществляющих окисление и восстановление субстратов. В качестве восстановленного продукта в эндергонической реакции во всех комплексах выступает Fd_{red} , в качестве доноров электронов используется молекулярный водород, формиат, NADH (см. рис. 3).

Все FBEB-комплексы – растворимые цитоплазматические образования. В настоящее время описано 12 комплексов 4 типов (Buckel, Thauer, 2018a, 2018b). Явление FBEB широко распространено у прокариот. Анализ 4588 геномов выявил наличие хотя бы одного гомолога для 12 известных типов FBEB-комплексов в 681 случаях. Обнаружено 512 видов бактерий и 169 видов архей, имеющих такие гены. Ни в одном случае эти гены не были обнаружены у эукариот (Poudel et al., 2018).

В настоящее время установлено, что бифуркация, т.е. разделение пары электронов на электрон с высокой и низкой энергией, осуществляется на молекулах флавинов (Lubner et al., 2017; Buckel, Thauer, 2018b; Peters et al., 2018). Флавины могут находиться в трех состояниях окисленности (см. рис. 3б): в виде флавохинонов (Q), флавосемихинонов (SQ) и флавогидрохинонов (HQ). Флавосемихинон представляет собой радикал со свободным электроном, который может иметь энергию выше, чем электрон в паре, передаваемый донором. Схематично можно представить события следующим образом: 1) сначала происходит двухэлектронное восстановление флавохинона (Q) в флавогидрохинон (QH); 2) затем QH теряет один электрон, который транспортируется в каталитический центр и восстанавливает акцептор в экзергонической реакции; 3) образуется нестабильный QS радикал, который мгновенно передает электрон в эндергоническую ветвь и регенерирует исходное Q состояние (рис. 3).

Существует небольшое число хорошо охарактеризованных комплексов, для которых известна пространственная структура. Именно на этих примерах выяснен молекулярный механизм функционирования комплексов, включая потенциалы всех окислительно-восстановительных центров, их взаимное расположение и расстояние между ними.

Вероятно, лучше всего изучен комплекс NADH-зависимая ферредоксин:NADP⁺ восстанавливающая оксоредуктаза, называемая Nfn (Demmer et al., 2015; Liang et al., 2019). Nfn-комплекс катализирует реакцию (уравнение 2):



Схематически комплекс представлен на рис. 4. Nfn состоит из двух субъединиц. Большая субъединица содержит один флавин в центре окисления NADPH (называемый флавин А) и два железо-серных кластера [4Fe-4S]. Малая субъединица содержит один флавин в составе центра восстановления NAD (называемый флавин В) и один железо-серный кластер состава [2Fe-2S]. Эти пять редокс-центров расположены линейно. Бифуркацию электронов осуществляет флавин А, получающий пару электронов при окислении NADPH. В экзергонической ветви электрон с низкой энергией движется от флавина А к [2Fe-2S] кластеру, удаленному от него на 14 Å и затем к флавину В, который участвует в восстановлении NAD. В эндергонической ветви электрон с высокой энергией восстанавливает проксимальный к флавину А кластер [4Fe-4S], расположенный в 8 Å от него. Экспериментально показан удивительно высокий редокс-потенциал этого кластера [t_0 –718 мВ]. Далее электрон передается на дистальный [4Fe-4S] кластер ($E'_0 = -513$ мВ), который участвует в восстановлении ферредоксина (Lubner et al., 2017). В этой же работе показано, что потенциал [2Fe-2S] кластера $\sim +80$ мВ. Таким образом, экспериментально продемонстрирована эффективность процесса бифуркации для получения электронного переносчика Fd_{red} с очень низким потенциалом. Общее изменение свободной энергии в реакции с участием процесса бифуркации очень невелико, поэтому большинство реакций обратимо и служит для сохранения редокс баланса и соотношения NAD/NADH и NADP/NADPH в клетке (Schuchmann, Müller, 2014). Процесс, осуществляемый комплексом бифуркации в обратном направлении, называют “конфуркацией” (Shut, Adams, 2009).

МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТОГЕНОВ ПРИ РОСТЕ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ

Газовые субстраты

Ацетогены обладают способностью к росту на газовых субстратах (H_2 , CO, CO_2), на C_1 -соединениях (метанол, формиат), на сложных органических соединениях, таких как лактат, аминокислоты, сахара, спирты. Конечно, особое внимание привлекает способность ацетогенов к фиксации CO_2 при росте на газовых субстратах.

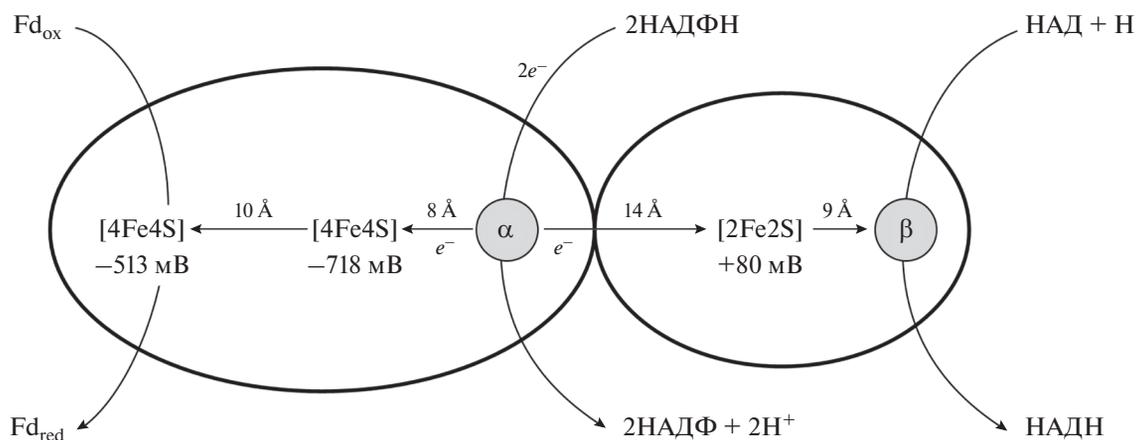
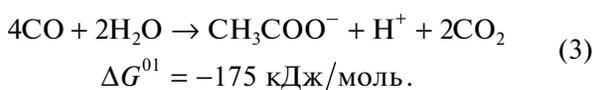


Рис. 4. Схема строения Nfn-комплекса.

В качестве восстановителя CO_2 в газовых смесях может выступить H_2 или CO . В синтез-газе одновременно присутствуют оба восстановителя. Два восстановителя энергетически неравнозначны. В случае присутствия в газовой смеси CO бактериям не нужно расходовать энергию на восстановление CO_2 до CO в карбонильной ветви WLP (рис. 1). Эта реакция, осуществляемая монокарбондегидрогеназой (CODH) проходит с использованием в качестве кофактора Fd_{red} , восстановление которого требует больших затрат энергии.

Энергетический и редокс-балансы могут различаться у разных ацетогенов и не всегда могут быть точно учтены в силу недостаточной изученности многих из них. Для наиболее изученного ацетогена, *A. woodii*, был рассчитан энергетический баланс при росте на H_2/CO и CO (Bertsch, Müller, 2015a). Рост на CO энергетически более выгоден. Ниже для сравнения приведены уравнения биосинтеза ацетата при росте на H_2/CO_2 (уравнение 1) и на CO (уравнение 3):



При росте на смеси H_2/CO_2 в метильной ветви WLP расходуются две молекулы NADH и моль H_2 для восстановления CO_2 до метильной группы, а в карбонильной 1 моль Fd_{red} для восстановления CO_2 до CO (рис. 1). У *A. woodii* Fd_{red} образуется дегидрогеназой в реакции бифуркации. При этом из 3 молей H_2 образуется 1.5 моля NADH и 1.5 моля Fd_{red} (рис. 3). Далее 1 моль Fd_{red} используется на восстановление CO_2 до CO и 0.5 моля Fd_{red} потребляется Rnf-комплексом (рис. 2), который синтезирует 0.5 моля NADH и транспортирует

1 моль иона Na^+ через цитоплазматическую мембрану. У *A. woodii* для синтеза 1 моля АТФ АТФаза требует 3 молей Na^+ . Таким образом, 4 молей водорода достаточно для синтеза 1 моля ацетата и 0.3 молей АТФ. В случае роста на CO не требуется Fd_{red} для восстановления CO_2 до CO , но зато требуется 1 моль водорода для восстановления CO_2 до формата. Из 4 молей CO (уравнение 3) 1 моль непосредственно вовлекается в WLP, а три других окисляются CODH до CO_2 с одновременным восстановлением 3 молей Fd . Один моль водорода синтезируется в процессе конфуркации дегидрогеназой из 0.5 моля Fd_{red} и 0.5 моля NADH . В Rnf-комплекс поступает 1.5 моля Fd_{red} , что приводит к синтезу 2.5 моля NADH и выбросу 5 молей ионов Na^+ . Это количество ионов Na^+ обеспечивает синтез 1.5 моля АТФ.

Большинство реакций WLP пути, реакции Rnf- и Ech-комплексов, а также реакции бифуркации электронов обратимы. Эта обратимость позволяет ацетогенам сохранять энергетический и редокс-баланс при росте на газообразных субстратах различного состава. Хотя рост на CO энергетически выгоден, но при этом синтезируется нежелательная двуокись углерода (уравнение 3). Рост на H_2/CO_2 не образует CO_2 (уравнение 1), но генерирует мало энергии и, следовательно, обладает низким потенциалом для биосинтеза полезных соединений.

Казалось бы идеальным субстратом для роста ацетогенов должен быть синтез-газ, содержащий CO , CO_2 и H_2 . Тем не менее, это не совсем так. Оказалось, что CO в концентрациях, присутствующих в синтез-газе, ингибирует некоторые ферменты. Так, при росте *C. ljungdahlii* на синтез-газе сначала потребляется CO , и только после того, как более 90% этого газа израсходовано, начинается потребление H_2 (Najafpour, Yones, 2006).

Экспериментально показано, что CO ингибирует прежде всего водород-зависимую CO₂ редуктазу (HDCR), катализирующую восстановление CO₂ в формиат (Bertsch, Müller, 2015b). Следует отметить, что если восстановление CO₂ в CO у всех ацетогенов осуществляется практически одинаковым ферментом (CODH), то структура ферментативных систем, восстанавливающих CO₂ в формиат достаточно разнообразна (Lemaire et al., 2020). Так, например, *C. autoethanogenum* использует для синтеза формиата дегидрогеназу, зависящую от окисления NADPH и Fd_{red} и не ингибируемую CO (Wang et al., 2013).

Жидкие субстраты

Главным фактором, ограничивающим скорость роста ацетогенов на газовых субстратах, является плохая растворимость в воде H₂ и CO₂, что снижает массообмен. Такого недостатка лишены метанол и формиат – C₁-соединения, которые смешиваются с водой в любых соотношениях.

Формиат является первым соединением в метильной ветви WLP (рис. 1), а метильная группа метанола может быть превращена в метилтетрагидрофолат в той же ветви WLP (рис. 1).

И метанол, и формиат рассматриваются как перспективные субстраты для ферментации микроорганизмов (Cotton et al., 2020). Метанол сегодня получают из природного газа, а формиат – окислением метанола. Вместе с тем, в будущей зеленой циклической экономике формиат может быть будет получать электровосстановлением CO₂ (Martin et al., 2015).

Метанол. Хотя рост ацетогенов на средах с метанолом был известен давно (Vache, Pfenning, 1981), сведения о механизмах и ферментах, участвующих в процессе, были получены лишь в последние годы. У бактерии *A. woodii* была идентифицирована специфическая трансметилаза, переносящая метильную группу от метанола к тетрагидрофолату. Идентификация фермента и соответствующих генов оказалась непростой задачей, так как геном *A. woodii* содержит около 30 генов, кодирующих потенциальные метилазы. Специфическую для метанола трансметилазу удалось обнаружить при анализе транскриптома. При переносе бактерий со среды с фруктозой на среду с метанолом активность специфической метилазы увеличилась в 10–14 раз (Kremp et al., 2018).

Метанол-специфическая трансметилаза содержит 3 субъединицы. Одна субъединица представляет собой корриноидный белок (CoP), а две другие субъединицы обеспечивают перенос метильной группы от метанола на CoP и от CoP на тетрагидрофолат с образованием метил-ТНФ, промежуточного продукта WLP (рис. 1).

Мы уже говорили ранее о легкой обратимости реакций WLP. В данном случае молекула метил-ТНФ окисляется по обращенному пути метильной ветви WLP с образованием АТФ, CO₂ и H₂. Можно рассчитать, что H₂ и АТФ могут обеспечить образование 6 восстановительных эквивалентов, достаточных для восстановления 3 молекул CO₂ до CO. Таким образом, потребление 4 молекул метанола может обеспечить синтез 3 молекул ацетата с одновременной фиксацией 2 молекул CO₂ (Kremp et al., 2018) (уравнение 4):



Донором метильной группы может быть не только метанол. Так, было показано, что такой же механизм использует *A. woodii* при росте на бетанине (триметилглицин) (Lechtenfeld et al., 2018). В процессе участвует бетаинспецифическая метилаза, которая может переносить метильную группу от бетаина к тетрагидрофолату. Интересно, что донором метильной группы не может быть диметилглицин или триметиламин (Kremp et al., 2018).

Формиат является промежуточным продуктом в WLP-пути (рис. 1). Многие ацетогены могут расти на формиате. Процесс протекает по уравнению 5:



В этом процессе электроны, необходимые для восстановления одного формиата и CO₂ до ацетата, получаются за счет окисления формиата до CO₂ и H₂. Пока еще недостаточно сведений о ферментах, принимающих участие в этом процессе (Müller, 2019).

Интересно, что при росте многих ацетогенов на газовых субстратах в среде накапливаются значительные количества формиата (Groher, Weuster-Botz, 2016). Неясно, является ли экскреция в среду и обратное поглощение формиата частью нормального метаболизма ацетогенов. Так как формиат является промежуточным продуктом в пути WLP, а метанол образует также промежуточный продукт метил-ТНФ, то при росте на этих субстратах клетка должна экономить энергию, которую она затратила бы на синтез этих промежуточных продуктов. Действительно, энергоэффективность при росте на метаноле и формиате выше, чем при росте на газовых субстратах. Энергоэффективность определяется как доля энергии, сохраненной в продукте от энергии заключенной в субстрате. Это можно определить по энергии, выделяемой при сгорании (Classen et al., 2019). При росте на газовых субстратах энергоэффективность ацетогенов (при образовании ацетата) составляет 60–80%, а при росте на метаноле и формиате – 80–90% (Cotton et al., 2020).

Метанол и формиат при высоких концентрациях ингибируют рост ацетогенов. Так, было по-

казано, что при pH 5.0–6.0 рост *C. ljungdahlii* полностью ингибируется 30 мМ формиата Na, но при pH 7.0 рост возобновляется (Romio-Pujol et al., 2014). На примере ацетогена *Sporomusa ovata* было показано, что бактерии можно адаптировать к росту на повышенных концентрациях метанола, и это приводит к усилению конверсии CO₂ в органические продукты (Tremblay et al., 2015).

МЕТАБОЛИТЫ, СИНТЕЗУЕМЫЕ ПРИ АВТОТРОФНОМ РОСТЕ АЦЕТОГЕНОВ

Многие ацетогены при росте на газовых субстратах синтезируют исключительно ацетат, но ряд представителей этой группы, наряду с ацетатом, производят и другие метаболиты, которые представляют практический интерес.

Такие ацетогены, как *Clostridium ljungdahlii*, *C. autoethanogenum*, *C. regsdalei* способны к синтезу больших количеств этанола, который при некоторых условиях ферментации становится преимущественным продуктом. Эти же ацетогены в качестве минорных продуктов синтезируют 2,3-бутандиол (2,3BD) и лактат. Некоторые ацетогены, такие как *Clostridium carboxidivorans*, *Eubacterium limosum* способны к синтезу бутирата и бутанола (De Tissera et al., 2019).

Все перечисленные продукты представляют практический интерес, особенно этанол, который сегодня производится в мире из пищевого сырья (кукурузы, сахарного тростника, злаков) в количествах более 100 млрд л (около 80 млн т в год) и используется в качестве моторного биотоплива. Производство топливного этанола с использованием газовых субстратов представляет удачную альтернативу, так как позволяет уйти от использования пищевого сырья и приводит к фиксации такого парникового газа как CO₂ (<http://www.statista.com>; Дебабов, 2012; Körpke et al., 2011a).

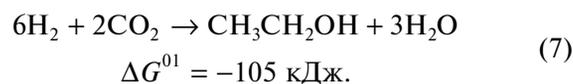
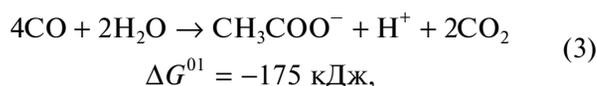
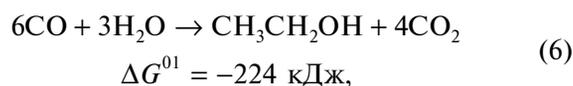
Биосинтез этанола из ацетил-СоА у ацетогенов возможен двумя путями: прямым – восстановлением из ацетил-СоА, и непрямой – восстановлением из ацетата (см. рис. 5).

При прямом синтезе ацетил-СоА восстанавливается бифункциональным ферментом алкогольдегидрогеназой (AdhE), состоящим из двух субъединиц ацетил-СоА-зависимой алкогольдегидрогеназы (Ald) и алкогольдегидрогеназы (AdH). В этом синтезе расходуются два восстановительных эквивалента в виде NADPH.

Непрямой путь связан с восстановлением ацетата ацетальдегидферредоксин оксиредуктазой (AOR) в ацетальдегид и последующим его восстановлением алкогольдегидрогеназой в этанол. В реакции расходуется восстановленный ферредоксин и NADPH. Непрямая реакция энергетически выгоднее для клетки, так как в ходе синтеза ацетата образуется молекула АТФ.

Анализ геномов ацетогенов подтвердил наличие у них всех генов вышеперечисленных ферментов. Биохимическое подтверждение наличия AOR-активности и возможность непрямого пути биосинтеза этанола была постулирована для *C. ljungdahlii* (Körpke et al., 2011a) и *C. autoethanogenum* (Mock et al., 2015).

Соотношение этанола и ацетата сильно зависит от условий ферментации и, особенно, состава газовых субстратов. Биосинтез ацетата и этанола при росте на H₂/CO₂ или СО происходит согласно уравнениям (1, 3, 6, 7) и сопровождается значительным уменьшением свободной энергии, т.е. термодинамически разрешен:



Рост на СО энергетически выгоднее, чем на H₂/CO₂, что отражается прежде всего в том, что титр биомассы выше при росте на СО. Так, титр биомассы *C. ljungdahlii* при росте на СО/CO₂ (80 : 20) составлял 8.4 OD₆₀₀ (120 ч), а при росте на H₂/CO₂ (60 : 40) только 1.84 (186 ч). В этих условиях при росте на H₂/CO₂ клетки производят практически один ацетат, а при росте на СО/CO₂—этанол (713 мМ) и ацетат (188 мМ) (Zhu et al., 2020).

При периодическом культивировании ацетогенов на синтез-газе обычно наблюдают две стадии: ацидогенез и сольватогенез (Richter et al., 2016; Arslan et al., 2019). На первой стадии синтезируется ацетат и происходит снижение pH среды, следствием чего является появление в растворе значительных концентраций недиссоциированной уксусной кислоты. Уксусная кислота проникает в клетку и ингибирует рост. Остановка роста приводит к появлению избытка восстановительных эквивалентов, которые реокисляются в процессе синтеза этанола на второй сольватогенной стадии. Интересно, что анализ экспрессии генов при переходе от ацетогенеза к сольватогенезу не показал заметных изменений, т.е. переход не регулируется на генетическом уровне. Регуляция осуществляется на уровне редокс-баланса и доступности АТФ, т.е. на термодинамическом уровне (Richter et al., 2016).

В качестве побочных продуктов этанолсинтезирующие ацетогены производят 2,3-бутандиол

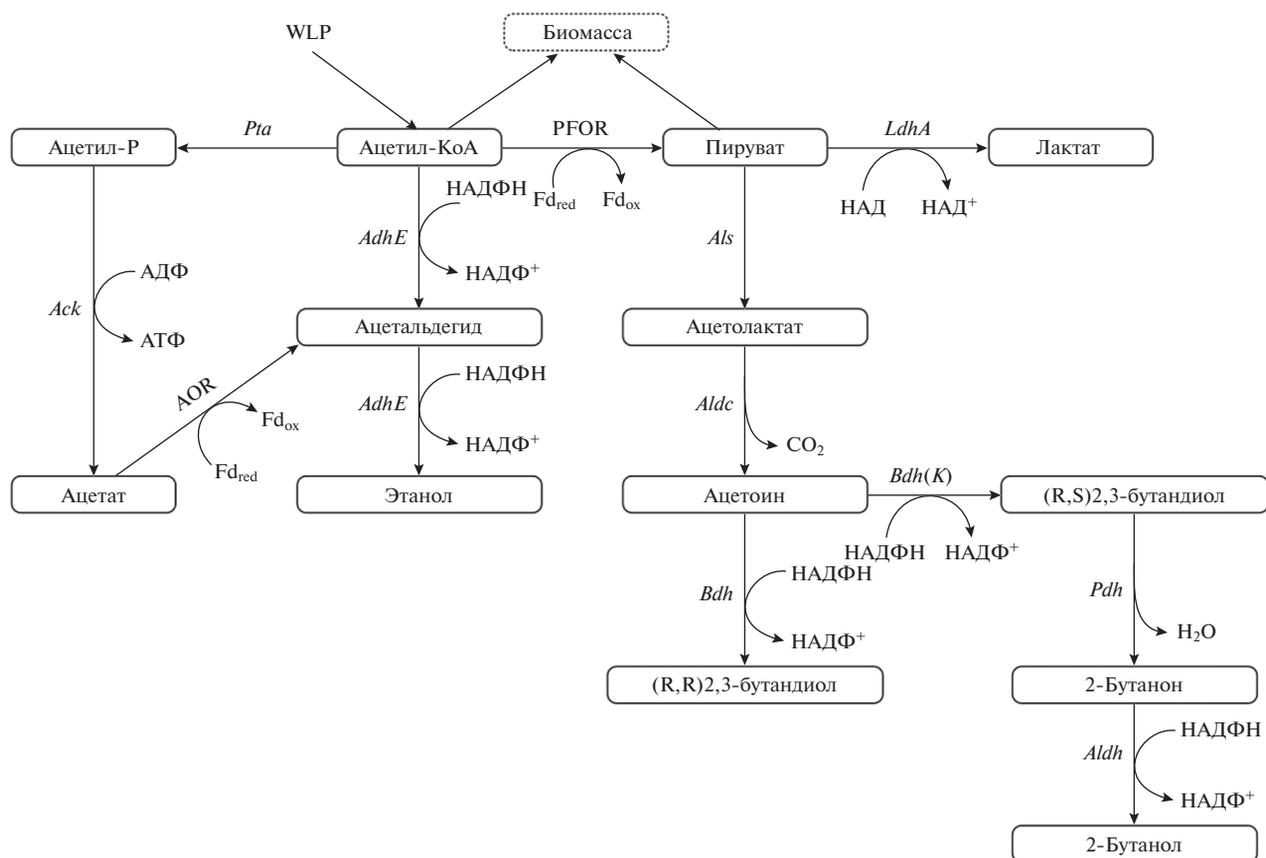


Рис. 5. Схема биосинтеза ацетата, этанола, 2,3-бутандиола, 2-бутанола и лактата у *C. ljungdahlii* и *C. autoethanogenum*. Ацетил-СоА и пируват служат исходными субстратами для синтеза всех других метаболитов и синтеза биомассы. AOR – ацетальдегид ферредоксин оксоредуктаза; PFOR – пируват ферредоксин оксоредуктаза; Als – ацетолактатсинтаза; LdhA – лактатдегидрогеназа; Pta – фосфоацетилтрансфераза; Ack – ацетилкиназа; AdhE – бифункциональный фермент ацетальдегид/алкогольдегидрогеназа; Aldc – ацетолактатдекарбоксилаза; ADH – первично-вторичная алкогольдегидрогеназа; BDH – (R,R)2,3-бутанолдегидрогеназа; DDH – (R,S)2,3-бутанолдегидрогеназа; 2-бутанон (метил-этил кетон МЕК).

(2,3BD) и лактат, предшественником которых в клетке является пируват (рис. 5).

Представление о соотношении продуктов дает работа (Körke et al., 2011b), в которой исследовали состав конечных продуктов при ферментации трех ацетогенов: *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* и *C. regsdalei* на синтетической смеси газов (44% CO₂, 22% CO и 2% H₂). В конце ферментации концентрация ацетата составляла 28–32 мМ, этанола 19–22 мМ, 2,3BD – 1.4–2 мМ и лактата 0.1–0.2 мМ. Молярное отношение 2,3BD к ацетату было 1 : 15 и к этанолу 1 : 10 (Körke et al., 2011b).

Пируват образуется из ацетил-СоА и CO₂ с помощью пируват-ферредоксин оксиредуктазы (PFOR). Далее лактатдегидрогеназа (LdhA) восстанавливает пируват в лактат. Путь к 2,3BD начинается с конденсации двух молекул пирувата с образованием ацетолактата, который декарбоксилируется с образованием ацетоина. Ацетоин восстанавливается 2,3-бутандиолдегидрогеназой в 2,3BD (рис. 5).

Все гены, потенциально кодирующие вышеперечисленные ферменты, найдены в геномах ацетогенов. Лишь в относительно небольшом числе случаев была подтверждена функциональность этих ферментов. Так, с этой целью гены кандидаты были перенесены из *C. autoethanogenum* в *E. coli*. Было показано, что лактатдегидрогеназа экспрессируется в *E. coli* и образует лактат. Метаболический путь биосинтеза 2,3BD воссоздан в *E. coli* клонированием генов ацетолактатсинтазы, ацетолактатдегидрогеназы и 2,3-бутандиолдегидрогеназы. Исследование последнего фермента показало, что этот NADPH-зависимый фермент обладает широкой специфичностью при восстановлении кетосоединений C₂–C₄ в соответствующие спирты. Фермент назван NADPH-зависимая первично-вторичная алкогольдегидрогеназа (CaADH). *E. coli* с реконструированным геномом при росте на фруктозе могли синтезировать 1.1 ± 0.2 мМ 2,3BD (Körke et al., 2011), что сравнимо с его

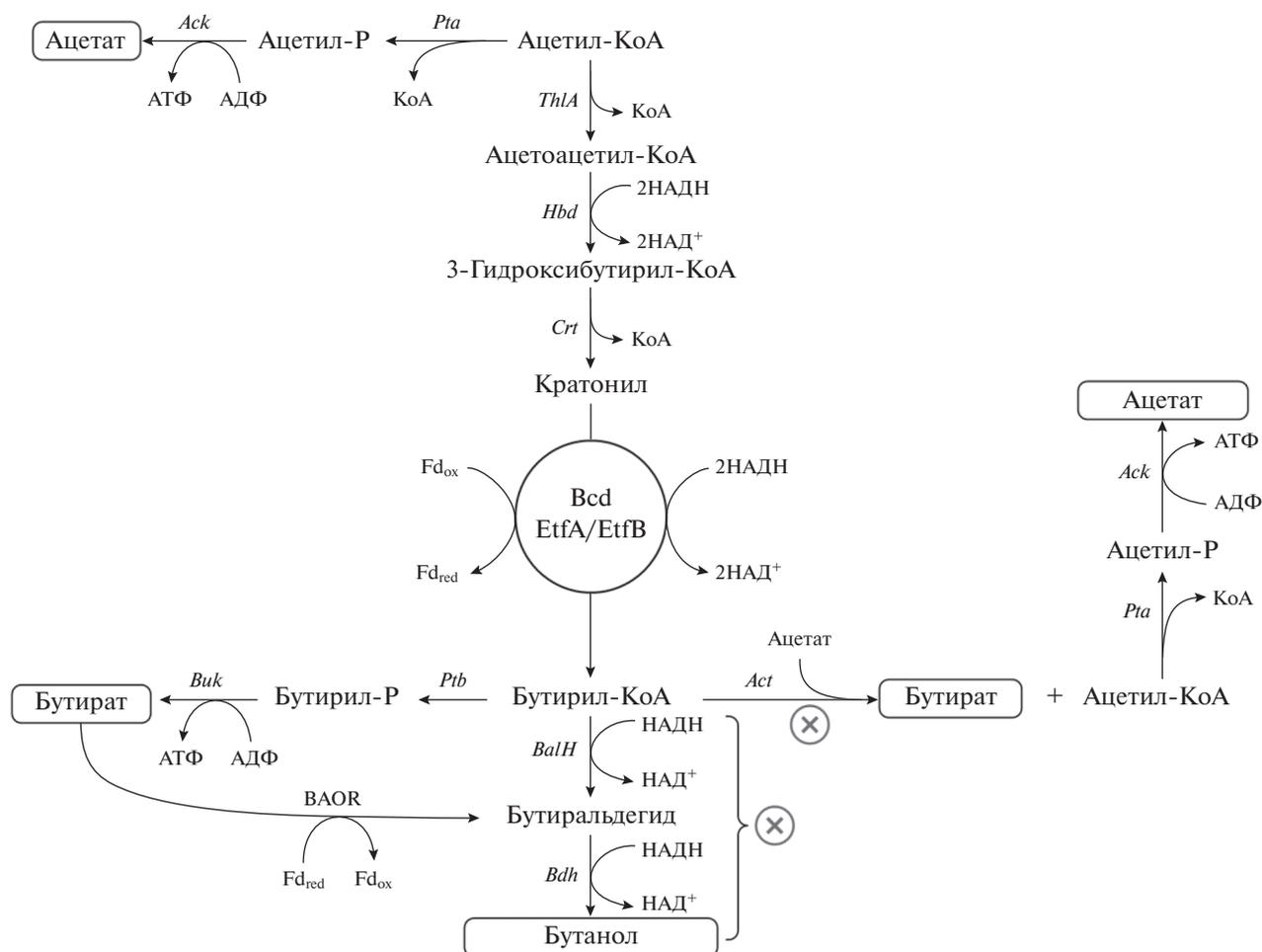


Рис. 6. Биосинтез бутанола у ацетогенов. Thl – тиолаза; Hbd – гидроксибутирил-СоА дегидрогеназа; Crt – кротоназа; Bcd – бутирил-СоА дегидрогеназа в комплексе с бифункционным комплексом двух флавопротеинов EtfA/EtfB; BalH – бутириальдегиддегидрогеназа; Bdh – бутириальдегиддегидрогеназа (у *C. autoethanogenum* BalH и Bdh заменены одним бифункциональным ферментом AdhE₂); AcT – ацетил-СоА трансфераза; Ptb – фосфотрансбутирилаза; Buk – бутирилкиназа; VAOR – бутириальдегид оксиредуктаза. ⊗ – Инактивация генов в рекомбинантных штаммах.

биосинтезом ацетогенами (см. выше) (Körke et al., 2014).

К синтезу бутанола и бутирата способен ограниченный круг ацетогенов: *C. carboxidivorans*, *C. deakei*, *C. scotologenes*, *C. regsdalei*, *Eubacterium limosum*, *Butyrobacterium methylophilicum* (Dürre, 2016).

Анализ геномов и биохимические данные говорят о том, что биосинтез бутанола и бутирата осуществляется у ацетогенов тем же путем, что и у сольватогенных бактерий, таких как *Clostridium acetobutylicum* (рис. 6). Биохимический путь начинается с объединения ферментом тиолазой (ThlA) двух молекул ацетил-СоА в ацетоацетил-СоА, который восстанавливается до 3-гидроксибутирил-СоА гидроксибутирил-СоА дегидрогеназой (Hbd). Далее кротоназа (Crt) дегидратирует 3-гидроксибутирил-СоА до кротонил-СоА, который восстанавливается до бутирил-СоА соответствующей дегидрогеназой (Bcd).

Бутирил-СоА может далее превращаться либо в бутанол, либо в бутират (рис. 6). Превращение в бутанол осуществляется последовательным восстановлением в бутиральдегид и бутанол. У *Clostridium acetobutylicum* обе реакции катализируются бифункциональным ферментом альдегид-алкогольдегидрогеназой (AdhE₂), использующей в качестве кофактора NADH.

Бутирил-СоА может превратиться в бутират двумя путями (рис. 6): либо ацетил-СоА трансфераза превращает его в бутират и ацетил-СоА, либо фосфотрансбутирилаза превращает его в бутирил фосфат и бутират киназа в бутират. В последней реакции образуется 1 моль АТФ. При превращении ацетил-СоА в ацетат также образуется 1 моль АТФ (рис. 1), так что оба пути с энергетической точки зрения равнозначны. Бутират может быть восстановлен в бутанол через бутиральдегид (ферредоксиноксиредуктазой) и бутириалько-

гольдегидрогеназой аналогично биосинтезу этанола у ацетогенов (рис. 5).

Помимо бутанола, некоторые ацетогены, например, *C. carboxidivorans*, способны синтезировать и гексанол. Титры бутанола и бутирата обычно невысоки, и были предприняты попытки оптимизировать этот процесс. Было показано, что низкие значения pH (6–4.5) и температуры (-25°C) способствуют биосинтезу бутанола. Тем не менее, максимальные выходы бутанола не превышают 14–15 мМ бутанола и 8–9 мМ гексанола (Rajagopalan et al., 2002; Phillips et al., 2015; Romio-Pujol et al., 2015, 2018), что значительно ниже титров, полученных при ферментации сольватогенных клостридий.

Учитывая привлекательность микробиологического синтеза ценных химикалий на базе восстановления CO_2 , были предприняты значительные усилия как по совершенствованию процесса ферментации с использованием газовых субстратов, так и по генетическому совершенствованию продуцентов ацетогенных бактерий.

ГЕНЕТИКА АВТОТРОФНЫХ АЦЕТОГЕНОВ

Для реализации полного биотехнологического потенциала газовой ферментации с использованием ацетогенов необходимо произвести генетические изменения в геномах этих микроорганизмов. Цель таких изменений может заключаться в перенаправлении потока углерода к нужному метаболиту или даже в организации новых биохимических путей для расширения спектра продуктов, синтезируемых ацетогенами.

Для успешного применения методологии метаболической инженерии необходимы два условия: 1) иметь хорошо обоснованные цели (целевые гены), которые следует активировать или инактивировать или внести новые гетерологичные гены и 2) иметь генетические технологии, позволяющие эффективно вносить в геном мутации, делеции и вставки.

Расшифровка геномных последовательностей большого числа ацетогенов, изучение метаболических путей, в особенности механизмов консервации энергии, сделали возможным определение целевых генов, подлежащих изменениям (Humphreys et al., 2015; Shin et al., 2016).

За последние 15 лет достигнуты определенные успехи в развитии генетических технологий применительно к автотрофным ацетогенам, хотя до сих пор эффективность этих методов недостаточно высока. На пути развития таких технологий возникает ряд трудностей. Во-первых, толстая стенка этих бактерий затрудняет доставку ДНК, что делает малоэффективными такие методы трансформации, как электропорация. Во-вторых, очень активные системы рестрикции разрушают трансформированную ДНК. В третьих, самое главное препят-

ствие – низкие частоты гомологичной рекомбинации, что требует специальных приемов обнаружения редких генетических событий.

Первая достаточно эффективная технология для бактерий рода *Clostridium* была разработана в 2005–2007 гг. и была основана на инактивации генов транспозонным мутагенезом. Технология получила название ClosTron (Heap et al., 2010) и основана на использовании интронов группы II. Интроны группы II – это каталитическая РНК, которая вырезает себя из РНК транскрипта и внедряется в новый сайт. В одной рамке считывания с интроном II кодируется белок LtrA. Этот белок много функций: определяет РНК сплайсинг, участвует в распознавании сайта интеграции, никкирует ДНК-мишень и внедряет сплайсированную РНК молекулу и, наконец, синтезирует соответствующую комплементарную нить ДНК путем обратной транскрипции. После этого ферменты хозяина удаляют РНК и лигируют разрыв.

Распознавание мишени осуществляет РНК-комплекс (LtrA-белок + РНК). За узнавание отвечают 15 нуклеотидов РНК, которые можно менять для направления транспозиции на определенный участок хромосомы, но возможны только такие изменения последовательности, которые сохраняют структуру комплекса. Существует доступ через интернет к специальному алгоритму, который позволяет определить последовательность РНК для направления транспозиции в желаемую область. Собственно этот алгоритм и называется ClosTron. Недостатком метода является то, что не для каждого гена можно подобрать подходящую последовательность РНК и то, что внедрение транспозона имеет сильный полярный эффект.

Недавно описан другой метод, основанный на транспозиции и конъюгации и позволяющий вносить в геном *Clostridium ljungdahlii* большие фрагменты ДНК, кодирующие целевые метаболические пути (Phillips et al., 2019). Метод использует конъюгативный перенос плазмид между *E. coli* и *Clostridia* и свойства транспозона Himar. Этот транспозон фланкирован обращенными повторами длиной в 27 п.н., которые служат мишенями транспозазы (ген HI). В ходе конъюгативного переноса преодолеваются рестрикционные барьеры, так как ДНК входит в реципиентную клетку в одноцепочечной форме и успевает правильно метилироваться. Кластер, предназначенный для внедрения в хромосому, располагается на конъюгативной плазмиде и ограничен инвертированными повторами. На той же плазмиде находится ген HI под контролем индуцибельного промотора (в качестве индуктора используют ксилозу). Включение в хромосому идет неспецифически по АТ последовательностям, причем возможны множественные интеграции. В качестве примера авторы перенесли в

C. ljungdahlii кластер биосинтеза ацетона размером 11 т.п.о. из *C. acetobutylicum* (Phillips et al., 2019).

Недостатком метода является неспецифическое встраивание в геном. Процесс конъюгации между *E. coli* и *Clostridia* плохо изучен и занимает от 2 суток до недели. Практическую полезность этого метода еще предстоит оценить.

Достаточно давно были описаны шаттл-плазмиды, способные поддерживаться в *E. coli* и *Clostridia*, и трансформация в *Clostridia* методами электропорации или конъюгации. Однако частоты электропорации в первых попытках были низкими — около 10^3 колоний на мкг плазмидной ДНК (Strätz et al., 1994). Впоследствии протокол электропорации был улучшен. Компетентность клеток повышается после их экспонирования в средах, содержащих DL-треонин. Частота электропорации была увеличена на порядок до 1.7×10^4 колоний на один мкг плазмидной ДНК (Leang et al., 2013).

Стандартные для микроорганизмов методы делеции и вставки генетического материала посредством гомологичной рекомбинации в случае *Clostridia* имеют низкую эффективность. Требуются приемы мощной контрелекции для обнаружения редких событий. Предложено несколько способов контрелекции для этих микроорганизмов, но, очевидно, что самый удобный способ — CRiSPR/Cas система (McAllister, Sorg, 2019).

Главное преимущество CRiSPR/Cas системы — это возможность направить нуклеазу Cas практически в любую точку генома, где она произведет двойной разрыв ДНК. Бактерии не имеют систем репарации двойного разрыва, и только гомологичная рекомбинация в области разрыва может спасти бактерию от гибели.

Система CRiSPR/Cas9 была успешно применена для делетирования генов у *C. ljungdahlii*. Эффективность делеции четырех генов *pta*, *adhE*, *ctf* и *pyrE* составила, соответственно, 100, 75, 100 и 50% (Huang et al., 2016). Система CRiSPR/Cas9 также была использована для редактирования генома промышленно значимого ацетогена *C. amyloethanogenum* (Nagaraju et al., 2019), которая, кстати, имеет и собственную CRiSPR/Cas систему (Brown et al., 2014). В качестве объекта был использован ген *2,3-bdh*, делеция которого осуществляется с 50% эффективностью (Nagaraju et al., 2019).

Род *Clostridia* характеризуется высоким содержанием в геноме АТ-пар (для *C. ljungdahlii* — 69.8%). В этой связи кажется более целесообразным использовать не систему CRiSPR/Cas9, для которой протоспейсер имеет последовательность GGN, а CRiSPR/Cas12, для которой протоспейсер TTN. Действительно, CRiSPR/Cas12 система успешно использована для делеций гена *pyrE* (оратофосфорибозинтрансфераза) (Zhao et al.,

2019). Данная работа хорошо иллюстрирует все преимущества и трудности использования CRiSPR систем. Успех и применение CRiSPR системы зависят от эффективности гомологичной рекомбинации клетки хозяина. Частоты гомологичной рекомбинации у *C. ljungdahlii* низкие, и для ее осуществления нужны плечи гомологии размером в 1000 п.о., а еще лучше и более длинные. В приведенной работе авторы усовершенствовали протокол электропорации, позволивший повысить эффективность трансформации плазмидами до 10^4 колоний на 1 мкг ДНК плазмиды. При оптимизированных условиях с использованием плеч гомологии в 1000 п.о. авторы получили 2–3 рекомбинанта в опыте и 10–17 рекомбинантов при увеличении плеч гомологии до 2500 п.о. Преимуществом метода является его высокая специфичность. При анализе 15 из 17 колоний рекомбинантов содержали ожидаемые вставки (Zhao et al., 2019).

Для успешного осуществления задач метаболической инженерии большое значение имеет наличие набора плазмид с нужными репликационными, промоторами разной силы, как конститутивными, так и индуцированными, терминаторами транскрипции, селективными и контрелективными маркерами. Такие конструкции созданы и для бактерий рода *Clostridia*, но, конечно, не в столь больших и совершенных формах, как для *E. coli* (Joseph et al., 2018).

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Метаболическая инженерия может быть использована как для оптимизации производства метаболитов, нативных для ацетогенов, таких как ацетат, этанол, 2,3-бутандиол, так и для создания рекомбинантных штаммов, способных производить метаболиты, не свойственные ацетогенам, такие как ацетон, пропанол, 3-гидроксипропанол, полигидроксипропанол (Bengelsdorf, Dürre, 2017).

Ацетон

Ацетон относится к крупнотоннажным химикатам, его мировое производство превышает 5 млн т в год (Schiel-Bengelsdorf, Dürre, 2012). В настоящее время ацетон производят на базе углеводородного сырья, но в первой половине XX века большая часть ацетона, а также бутанола производилась микробиологическим путем в так называемом АВЕ-процессе (ацетон, бутанол, этанол). АВЕ-процесс использовал в качестве сырья пищевой продукт (мука злаков или кукурузы), и было бы заманчиво реанимировать процесс на новом уровне с использованием ацетогенов и такого сырья, как синтез-газ. АВЕ-процесс был основан на близких к ацетогенам микроорганизмах — сольватогенных клостридиях.

Было предпринято несколько попыток переноса пути биосинтеза ацетона из сольватогенных

ной алкогольдегидрогеназы широкой специфичности (Körpke et al., 2014).

Продукция ацетона сильно зависит от промотора, который используется для экспрессии ASO-оперона. Так *C. ljungdahlii* не синтезирует ацетон после трансформации плазмидой с ASO-опероном под контролем промотора тиолазы *C. acetobutylicum*, но синтез обнаружен в случае, если ASO-оперон находится под контролем промотора $P_{pta-ack}$ бактерий *C. ljungdahlii*. Правда, почти весь ацетон конвертируется в 2-пропанол, и количество продукта невелико (1.4 ± 0.5 мМ) (Bengelsdorf et al., 2016).

Лучшие результаты получены при использовании индуцибельных промоторов. Так, трансформация *C. ljungdahlii* ASO-опероном под контролем индуцируемого лактозой промотора P_{lac} привело к синтезу значительного количества ацетона, как при гетеротрофном росте на фруктозе, так и при автотрофном росте на углекислом газе. Концентрация ацетона при газовой ферментации составила ~ 15.2 мМ (Banerjee et al., 2014). Неясно, почему в данной работе не обнаружен 2-пропанол, хотя он детектирован во всех последующих работах. Возможно, газовая хроматография, используемая авторами, не разделяла две субстанции — ацетон и 2-пропанол.

Запатентован штамм *C. autoethanogenum* с производительностью 300 мг л⁻¹ ацетона и 25 мг л⁻¹ 2-пропанола (Patent US, 2012).

Во всех вышеперечисленных случаях речь шла о штаммах, несущих ASO-оперон на плазидах, но с использованием транспозона Himar (Phillips et al., 2019) удалось интегрировать ASO-оперон в хромосому *C. ljungdahlii*. Оперон находился под контролем промотора, индуцируемого ксилозой. Периодическое культивирование этого штамма на синтез-газе приводит к образованию смеси 2.4 мМ ацетона и 2.4 мМ изопропанола (Phillips et al., 2019).

Интересна попытка заменить зависимый от ацетата путь превращения ацетоацетил-СоА в ацетоацетил на путь, независимый от ацетата. С этой целью на плазмиде были клонированы гены тиоэстераз *Bacillus subtilis* (*teII*) и *Haemophilus influenzae* (*ybgC*), кодирующие белки, способные отщеплять СоА от ацетоацетил-СоА. Таким образом, был создан путь биосинтеза ацетона, неизвестный в природе (Patent Germany, 2007; Schiel-Bengelsdorf, Dürre, 2012).

РНВ (полигидроксibuтират) — биодegradируемый полиэфир, который служит для некоторых бактерий резервным депо для хранения углерода и энергии (как крахмал для растений). РНВ на-

капливается внутри клеток в виде гранул иногда в очень больших количествах (до 70–80% от сухого веса клеток).

Одной из подробно изученных бактерий, синтезирующих РНВ, является *Cupriavidas necator* (прежнее название *Ralstonia eutropha*). Ацетогены не способны к синтезу РНВ. Для организации такого синтеза оперон биосинтеза РНВ, состоящий из трех генов из *Cupriavidas necator*, был перенесен на плазмиде в *C. autoethanogenum*. Оперон был предварительно модифицирован с учетом частоты использования кодонов у *Clostridia* и помещен под контроль нативного промотора одного из генов WLP пути (Lemgruber et al., 2019).

Путь биосинтеза РНВ приведен на рис. 7. Рекомбинантный штамм *C. autoethanogenum* был исследован на его способность синтезировать РНВ в проточной равновесной ферментации на газовых смесях, имитирующих синтез-газ (50% СО, 20% СО₂, 20% Н₂ и 10% аргона) и отходящие газы металлургического производства (50% СО₂, 20% СО, 2% Н₂ и 28% N₂), при разных скоростях потока и разных значениях рН. Лучшие результаты были получены при росте на синтез-газе и при рН 5.5. Интересно отметить, что сдвиг рН от 5.0 до 5.5 увеличивает синтез РНВ в 10 раз. Максимальное содержание РНВ составило 5.6% на вес сухих клеток. Синтез РНВ приводит к падению синтеза ацетата, что, в свою очередь, вызывает недостаток АТФ в клетке. Авторы провели сравнение транскриптомов рекомбинантного штамма и контрольного, содержащего плазмиду без РНВ-оперона. Оказалось, что рекомбинантные клетки увеличивают транскрипцию всех генов, участвующих в синтезе АТФ. Это гены Rnf-комплекса (активация в 2 раза), гены WLP пути (активация в 2 раза), а также гены аргинин деиминазного пути деградации аргинина (в 3–7 раз), служащего у ацетогенов альтернативным путем синтеза АТФ (Nelson et al., 2017).

Получены рекомбинантные штаммы, синтезирующие РНВ у *C. coskata* и *C. ljungdahlii*, но содержание полимера у них при ауксотрофном росте невелико (около 1% в расчете на вес сухих клеток) (Flücher et al., 2019).

При отсутствии в клетке фермента, полимеризующего 3-гидроксibuтирил-СоА, это соединение под действием эстераз клеток превращается в 3-гидроксibuтират. В недавней работе (Karim et al., 2020) биосинтез 3-гидроксibuтирата был использован в качестве примера для опробования нового подхода к конструированию полезных штаммов микроорганизмов. Так как генетические инструменты часто малодоступны или малоэффективны

для промышленных штаммов, авторы предложили проводить предварительную оптимизацию биохимических путей в системе *in vitro* (в бесклеточных экстрактах). Использовались лизаты клеток *E. coli*, в которые в определенной пропорции добавляли лизаты клеток *E. coli*, экспрессирующие определенные ферменты исследуемого пути. Метод получил название IPROBE (In vitro prototyping and rapid optimization of biosynthetic enzyme). Авторам удалось подобрать соотношение ферментов двух первых этапов на пути биосинтеза 3-гидроксибутирата (Thl и Hbd) (см. рис. 7). На базе полученных данных был сконструирован штамм *C. autoethanogenum*, который при росте на синтез-газе мог синтезировать до 15 г/л 3-гидроксибутирата со скоростью $1.5 \text{ г л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$, что намного превосходит ранее полученные результаты не только для ацетогенов, но и для *E. coli* (Karim et al., 2020).

Бутанол и бутират

Бутанол относится к крупнотоннажным химикалиям. Его мировое производство составляет около 3.5 млн тонн в год (Patent WO, 2014). Подавляющее количество бутанола сегодня производят из углеводов, хотя в первой половине прошлого века использовался микробиологический процесс АВЕ (ацетон, бутанол, этанол).

Некоторые ацетогены, такие как *Clostridium carboxidivorans*, способны синтезировать, наряду с уксусной кислотой и этанолом, и бутанол и даже гексанол (De Tissega et al., 2019). Оптимизация процесса (состав газовой смеси, pH, состав сред) позволяют повысить содержание высших спиртов в конечном продукте. Так, в работе (Phillips et al., 2015) удалось получить в конце ферментации 14.7 мМ бутанола, 9.2 мМ гексанола и 70.5 мМ этанола. Эти показатели значительно уступают АВЕ процессу, что привело к попыткам использования методов метаболической инженерии для улучшения процесса. Объектом исследования стали бактерии *C. ljungdahlii*, которые сами по себе не синтезируют бутанол, но эти бактерии лучше других ацетогенов изучены и адаптированы к генетическим модификациям.

Бактерии *C. ljungdahlii* были трансформированы плазмидой (методом электропорации), которая содержала в своем составе оперон биосинтеза бутанола из сольватогенной бактерии *C. acetobutylicum*. Оперон содержал 6 генов под контролем промотора фосфотрансбутириказы P_{ptl} (гены оперона и биохимические реакции см. на рис. 6). Рекомбинантные бактерии синтезировали бутанол. В середине фазы роста ($OD_{600} = 0.6$) концентрация бутанола составляла 0.2 мМ, однако в конце ферментации бутанол отсутствовал. Скорее всего, он

трансформировался в бутират (концентрация 0.6–0.8 мкМ) (Körke et al., 2010).

Как при синтезе ацетата, так и при синтезе бутирата образуется АТФ. Однако при синтезе ацетата образуется 1 моль АТФ на моль ацетата и только 0.5 моля АТФ при синтезе бутирата (см. рис. 6). Энергетический расчет показывает, что недостающая энергия может поступать из бифуркационного комплекса, в который входит бутирил-CoA дегидрогеназа (BclH) и два флавопротеина (EffA и EffB). Этот комплекс генерирует восстановленный ферредоксин, который далее может генерировать дополнительно АТФ через ионный мембранный градиент (Dürge, 2016).

В последующих работах в бактерии *C. ljungdahlii* и *C. autoethanogenum* вводили не только оперон биосинтеза бутанола, но и гены, кодирующие флавопротеины. Рекомбинантный штамм *C. autoethanogenum* был способен синтезировать 25.7 мМ бутанола и 3.7 мМ бутирата (Patent WO, 2012), что выше, чем у природного продуцента *C. carboxidivorans* (около 15 мМ) (Phillips et al., 2015).

В целом, применение метаболической инженерии не привело к заметному увеличению синтеза бутанола рекомбинантными штаммами по сравнению с природными ацетогенными продуцентами.

Лучшие результаты продемонстрированы при конструировании штаммов-продуцентов бутирата. Бутират (масляная кислота) не является крупномасштабным химическим продуктом, но находит достаточно широкое применение в химической, пищевой и косметической промышленности. Схема реакций биосинтеза бутирата приведена на рис. 6. В работе (Ueki et al., 2014) описано конструирование штамма на основе *C. ljungdahlii*. В штамм ввели две плазмиды с генами из *C. acetobutylicum*. На одной плазмиде находились гены *pth* и *buk*, а на другой гены *thl*, *hbd*, *crt*, *bcd*, *effA* и *effB* (см. рис. 6). На той и другой плазмидах гетерологичные гены находились под контролем промотора p_{ta} (P_{pta}) бактерий *C. ljungdahlii*. Такой рекомбинантный штамм синтезировал ацетат, этанол и бутират при росте как на фруктозе, так и на смеси газов (H_2/CO_2 или CO). Во всех случаях доминирующим продуктом был ацетат, но значительная часть углеродного субстрата оказывалась в составе бутирата (13% при росте на H_2/CO_2 и 25% при росте на CO) (Ueki et al., 2014).

Транскрипционный анализ рекомбинантного штамма показал высокую экспрессию РНК всех гетерологичных генов. Протеомный анализ подтвердил высокий уровень синтеза всех этих белков, кроме кротоназы (Crt). Модификация сайта связывания с рибосомой (RBS) этого гена увеличила синтез кротоназы и привела к некоторому увеличению синтеза бутирата.

Была предпринята попытка интегрировать генетологические гены в хромосому *C. ljungdahlii*. Авторам удалось интегрировать гены *ptb* и *buk* двойным кроссовером. Однако встроить в хромосому таким путем более длинный фрагмент из шести генов не удалось. Фрагмент был встроен в хромосому единичным кроссовером (с включением плазмиды) по сайту *pta* промотора. Штаммы с интегрированными в хромосому генами росли несколько быстрее плазмид-содержащих штаммов, но синтез бутирата заметно не увеличился.

Интересно отметить, что интеграция прошла по сайту (с его инактивацией), но синтез ацетата не только не прекратился, он оставался главным продуктом, что предполагает наличие других путей его биосинтеза. Данные результаты демонстрируют ограниченность возможностей генетических манипуляций с ацетогенами и недостаток наших знаний о биохимии и физиологии этих микроорганизмов.

Для усиления синтеза бутирата в штамме были инактивированы гены *adhE* (альдегид/алкоголь дегидрогеназа) для перекрытия пути превращения бутирил-СоА в бутанол и *act* (ацетил-СоА трансфераза) для блокировки образования ацетата из бутирил-СоА. Конечный штамм направлял большую часть углерода субстрата на синтез бутирата. Выход бутирата по углероду составлял при росте на фруктозе 71%; на СО – 71% и на Н₂/СО₂ – 42% (Ueki et al., 2014).

Интересным подходом к получению бутирата и бутанола является совместное культивирование (ко-культивирование) различных клостридий, растущих на синтез-газе. Так, было показано, что *Clostridium kluyveri* при росте на ферментационной жидкости, содержащей ацетат и этанол, синтезирует С₄–С₆ карбоновые кислоты (бутират и капроат) по механизму обращенного пути β-окисления жирных кислот (Spirito et al., 2014).

Совместное культивирование *C. ljungdahlii* и *C. kluyveri* в непрерывной ферментации на синтез-газе в оптимальных условиях привело к синтезу 40 мМ/сут/л капроата с эффективностью по углероду 90% (Gildemyn et al., 2017).

Накопление жирных кислот приводит к закислению среды и ингибированию роста и метаболической активности ацетогенов. Интересно, что можно найти узкий интервал рН, при котором образовавшиеся в процессе жирные кислоты будут восстанавливаться в соответствующие спирты – бутанол, гексанол и октанол (Richter et al., 2016a).

Описанные в литературе выходы спиртов невелики, но оптимизация условий культивирования (или разделения процесса на две последовательные стадии), подбор оптимальных пар штаммов и применение метаболической инженерии могут принципиально улучшить результаты (Jiang et al., 2018).

Метаболиты, синтезируемые из пирувата

У ацетогенов 2,3-бутандиол и лактат являются нативными метаболитами, синтезируемыми в клетке из пирувата (рис. 5) (Körke et al., 2014).

Мировой рынок 2,3-бутандиола превышает 40 млрд долларов (Dürge, Eikmanns, 2015). Фирма “LanzaTech” разрабатывает процесс получения 2,3-бутандиола путем ферментации *C. autoethanogenum* и/или *C. ljungdahlii* при росте их на СО-содержащих газах (<http://www.chemicals>). Исследователи этой фирмы разработали и запатентовали штаммы *C. autoethanogenum* и *C. ljungdahlii*, производящие метил-этил кетон (бутанон-2) и 2-бутанол – метаболиты, которые не синтезируются ацетогенами естественным путем.

Следует отметить, что 2,3-бутандиол в силу наличия двух ассиметричных атомов углерода может существовать в трех изоформах: (R,R)-2,3-бутандиол; (S,S)-2,3-бутандиол и в мезоформе (RS)-2,3-бутандиол. Ацетогены синтезируют (RR) изомер, тогда как для биосинтеза метил-этил кетона (МЕК) и 2-бутанола нужен (RS) изомер.

Для осуществления нового пути ген (R,R)-2,3-бутандиол дегидрогеназы был инактивирован, и в ацетогены ввели три новых гена: R,S-2,3-бутанолдегидрогеназу, пропирил-глицеролдегидратазу и ген, кодирующий белок, реактивирующий дегидротазу под контролем промотора P_{pta/ack}. Генетологические гены были взяты из бактерии *Klebsiella pneumoniae* и состав их кодонов был оптимизирован. Бактерии *C. autoethanogenum*, трансформированные плазмидой, содержащей вышеприведенные гены, способны синтезировать небольшие количества 2-бутанола при росте на газовой смеси (44% СО; 32% N₂; 22% СО₂ и 2% Н₂). Культуральная жидкость в конце ферментации содержала 2.97 ± 0.115 г л⁻¹ ацетата; 1.33 ± 0.06 г л⁻¹ этанола и лишь 13.33 ± 1.53 мг л⁻¹ 2-бутанола.

Интересно отметить, что рекомбинантные бактерии способны катализировать трансформацию МЕК в 2-бутанол. Так, к бактериям, растущим на газе вышеприведенного состава, в середине лаг-фазы добавляли МЕК в концентрации 5 г л⁻¹ и в конце ферментации наблюдали почти 100% трансформацию его в 2-бутанол (Patent US, 2018).

Метаболическая инженерия может быть направлена не только на конструирование продуцентов новых метаболитов, но и на улучшение биосинтеза веществ, являющихся природными продуктами биосинтеза ацетогенов, таких как этанол и ацетат.

Так, было показано, что инактивация гена альдегид/алкоголь дегидрогеназы (*AdhE*) у *C. autoethanogenum* увеличивает синтез этанола на 180% (Liew et al., 2017). Очевидно, что весь поток углерода

идет теперь через ацетат, увеличивая обеспеченность клетки АТФ (см. рис. 1).

Другой пример — это усиление синтеза ацетата бактериями *Acetobacterium woodii*. Были клонированы и сверхэкспрессированы гены фосфотрансацетилазы и ацетаткиназы, а также 4 ТНФ-зависимых гена WLP-пути. Рекомбинантный штамм при периодическом культивировании на смеси H_2/CO_2 синтезировал до 50 г л^{-1} ацетата при низкой концентрации биомассы ($1.5\text{--}2 \text{ г л}^{-1}$ на вес сухой биомассы) (Straub et al., 2014).

Метаболическая инженерия может помочь и в улучшении технологических свойств штаммов-продуцентов. Так, два близкородственных и широко используемых ацетогена *C. ljungdahlii* и *C. autoethanogenum* являются природными ауксотрофами и требуют для роста добавки в среду витаминов — пантотената, тиамин и биотин. Геномный анализ показал, что у этих бактерий отсутствует три гена, необходимых для синтеза пантотената, и пять генов, необходимых для синтеза биотина (Annan et al., 2019). Для восстановления прототрофности на плазидах были клонированы кластеры генов *panBCD*, кодирующих синтез пантотената у *C. acetobutylicum* и гены биосинтеза тиамин t_{thc} -*ruqF* — оперона из *C. regsdale*. Трансформация плазмид в бактерии *C. autoethanogenum* восстанавливает прототрофность по пантотенату и тиамину.

Для восстановления прототрофности по биотину на плазидах клонировали два кластера генов биосинтеза биотина *bioBDF* и *bioHCA* из бактерий *Desulfomaculum nigrificans*. Важно отметить, что авторам удалось интегрировать гены биосинтеза витаминов в хромосомы *C. ljungdahlii* и *C. autoethanogenum*, создав удобные для промышленного использования штаммы (Annan et al., 2019).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АЦЕТОГЕНОВ

Газовая ферментация

Существует ряд объективных трудностей, которые необходимо преодолеть для реализации замечательных свойств ацетогенов в промышленности.

Одной из таких трудностей при газовой ферментации является низкая растворимость CO и H_2 в воде, что приводит к плохому массообмену и, следовательно, к замедлению процессов. Очевидным способом преодоления этой трудности является повышение давления, что увеличивает растворимость газов (Van Hecke et al., 2019).

Вторая трудность связана с медленным ростом ацетогенов, что преодолевается либо возвратом биомассы, либо использованием мембранных биореакторов, задерживающих биомассу в непрерывном процессе. Другой подход для решения

этой проблемы — использование реакторов с иммобилизованными клетками. Хотя такие приемы усложняют и удорожают технологию, но они могут привести к ускорению процесса и к увеличению выхода продукта. Так, использование реактора с иммобилизованными клеткам при ферментации *C. aceticum* на смеси CO_2/H_2 приводит к синтезу ацетата с выходом 96% при скорости синтеза $14 \text{ mM л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$ (Riegler et al., 2019).

Разновидностью реактора и использованием иммобилизованных клеток является реактор, представляющий собой колонку с полыми волокнами из полупроницаемых мембран. Бактерии образуют на поверхности волокон биопленку, а газы и жидкости циркулируют внутри полых волокон и во внешнем контуре.

Для газовой ферментации использовали почти все известные типы реакторов. Большая часть исследований выполнена на ферментерах с механической мешалкой (Continuous stirred-tank reactor — CSTR). В этом типе ферментеров удобно контролировать pH, температуру, состав сред и скорость подачи субстратов, но большие энергетические затраты на перемешивание затрудняют использование этих аппаратов в промышленности, особенно при получении таких недорогих продуктов как ацетат или этанол.

Наиболее дешевым и легко масштабируемым реактором является колонка, через которую пробулькивают (барботируют) пузырьки газа (Bubble column reactor — BCR). В промышленности популярны аппараты, где струя газа используется для перемешивания (циркуляции) жидкости (Air-lift reactor) (Stoll et al., 2020).

Важным условием успеха газовой ферментации является отсутствие примесей в газовых смесях.

Так как ацетогены являются строгими анаэробами, желательно полное отсутствие кислорода в газовой смеси, что не всегда легко достигается. Для устранения примесей кислорода предложена ко-культивация ацетогенов с карбоксидотрофами. Так, культивирование *C. ljungdahlii* с водородокисляющей бактерией *Paregeodacillus thermoglucosidasis* на смеси газов, содержащих CO_2 , CO , H_2 и O_2 привело к успешному синтезу ацетата с выходом 63% (Mohr et al., 2019).

Синтез-газ можно получать при газификации любых углеродсодержащих субстанций, начиная от природного газа, нефти, угля, древесины и кончая муниципальным мусором. Синтез-газ, полученный из таких субстанций, часто (кроме основных компонентов CO , CO_2 , H_2 , N_2) содержит минорные примеси, такие как H_2S , NH_3 , HCN . Некоторые из перечисленных примесей могут отрицательно влиять на процессы газовой ферментации. Так, маленькая компания “INEOS-BIO”

в 2013 г. построила в штате Флорида (США) пилотный завод проектной мощностью около 20 тыс. тонн в год этанола из синтез-газа. В качестве сырья для получения синтез-газа использовались отходы деревопереработки. В конце 2013 г. компания сообщила о трудностях проведения процесса из-за наличия в составе синтез-газа синильной кислоты (HCN). Фирма объявила о реконструкции производства с целью очистки синтез-газа, но завод так не приступил к промышленному производству (<http://biomassmagazin>).

В будущем, при падении цен на электричество из возобновляемых источников, основным сырьем для ацетогенов может стать синтез-газ, получаемый электролизом воды в присутствии CO₂, который не будет содержать токсичных примесей.

Недавно ученые фирмы “Siemens” предложили использовать для электрохимического получения синтез-газа промышленный электролизер с серебряным газо-диффузионным катодом, который применяется в хлор-щелочном производстве. Продемонстрирована успешная работа в течение 1200 ч непрерывной работы с плотностью тока 300 мА см⁻². Важно отметить, что полученный синтез-газ имел низкое содержание кислорода (≤100 ppm) (Haas et al., 2018).

Проблемы газовой ферментации неоднократно освещались в обзорах (Liew et al., 2016; Molitor et al., 2017; Takors et al., 2018; De Tissera et al., 2019; Stoll et al., 2020).

Для промышленного производства крупнотоннажных химикатов, к которым относятся производства с объемом 100000 тонн в год (в английской литературе они обозначаются как commodities chemicals), нужна высокая продуктивность процесса (г л⁻¹ ч⁻¹), высокие выходы (г продукта на 1 г субстрата) и, желательно, высокий конечный титр продукта (г л⁻¹).

Промышленно значимые характеристики процесса газовой ферментации получены только для ацетата и этанола, и только для этанола развит индустриальный процесс. Для этанола сообщены высокие скорости продукции – 195 г л⁻¹ сут⁻¹ (Patent US, 2014; Molitor et al., 2016) с бактериями *C. ehtanogenum* и даже 360 г л⁻¹ сут⁻¹ с бактериями *C. ljungdahlii* (Patent US, 2007). Правда, все эти высокие цифры известны только из патентов и обзоров, где эти патенты упоминаются (Patent US, 2014; Takors et al., 2018; Norman et al., 2018).

Три компании интенсивно разрабатывали и осваивали технологию получения этанола из синтез-газа: “Coskata” (США), “INEOS-Bio” (США) и “LanzaTech” (Новая Зеландия).

Фирма “Coskata” в течение нескольких лет эксплуатировала опытную установку, но так и не построила промышленный завод. О печальной судьбе завода фирмы “INEOS-Bio” мы уже упо-

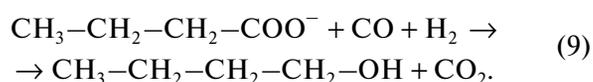
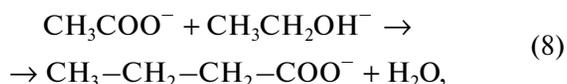
минали в нашем обзоре. Наиболее успешной оказалась деятельность фирмы “LanzaTech”, первоначально организованной в Новой Зеландии, а теперь имеющей офисы в США, Китае, Индии.

Основным сырьем для разработок фирмы “LanzaTech” являются отходящие газы металлургического производства, которые содержат CO, H₂ и CO₂, но сильно обогащены CO. В качестве микроорганизма фирма выбрала *C. autoehtanogenum* (Norman et al., 2018). Первая опытная установка была построена в Новой Зеландии в 2008 г. В 2014 г. компания построила пилотный завод мощностью 300 тонн в год с китайской компанией “Baو Steel” около Шанхая, который успешно функционирует (<http://www.lanzatech>). В настоящее время в Бельгии (г. Гент) строится промышленный завод совместно с металлургическим гигантом “Arcelormittal” мощностью 60 тыс. тонн в год стоимостью около 150 млн евро. Предполагается, что в ходе строительства будет создано 500 рабочих мест и 30 постоянных рабочих мест при эксплуатации завода (<http://belgium>). На заводе будут использованы колоночные Air-lift ферментеры. Производительность процесса будет составлять 10 г л⁻¹ ч⁻¹ (Takors et al., 2018). Пуск завода намечен на 2021 год.

Использование продуктов газовой ферментации в качестве субстратов

Главными продуктами при газовой ферментации ацетогенов являются ацетат и этанол. Оба эти вещества могут использоваться в качестве субстратов при ферментации с другими микроорганизмами.

Для получения из ацетата и этанола более дорогих продуктов – бутанола и гексанола, была использована способность *C. kluyveri* трансформировать C₂-соединения в C₄, C₆ и более высокомолекулярные органические кислоты согласно уравнению (8) и способность *C. ljungdahlii* восстанавливать органические кислоты в соответствующие спирты в присутствии H₂ и CO, согласно уравнению (9) (Dinder et al., 2016; Richter et al., 2016a):



Эти разработки были использованы при конструировании опытной установки, созданной двумя промышленными гигантами “Siemens” и “Evonik”. Установка включает электролизер для получения синтез-газа, разработанный фирмой “Siemens”, и ферментацию синтез-газа в бутанол и гек-

санол с использованием двух бактерий *C. ljungdahlii* и *C. kluyveri*. Установка будет функционировать в течение 2020 г. в Марли (Германия), и по результатам ее работы будет сделана оценка пригодности процесса для масштабирования. Самым дорогим ресурсом в этом процессе является электричество, расход которого составляет 22 кВт ч на 1 кг бутанола. При современной цене электричества около 4.5 евроцента за 1 кВт ч процесс уже может конкурировать по цене с нефтехимическим производством бутанола (<https://press.siemens>).

Большинство работ по получению соединений на базе продуктов газовой ферментации не имеют на сегодня практического значения, а скорее просто демонстрируют принципиальную возможность осуществления таких процессов. Так, финские исследователи использовали бактерию *Actinobacter baylyi*, которая хорошо растет на ацетате и способна синтезировать большое количество липидов. Эта бактерия была генетически модифицирована таким образом, что она стала способна синтезировать алканы или алкиловые эфиры жирных кислот. Количество этих соединений было очень незначительным – 90 мг л⁻¹ эфиров (Lechtien et al., 2017) и 1 мг л⁻¹ алканов (Lechtien et al., 2018).

Уксусная кислота, полученная из газовой ферментации ацетогенов, была использована для роста дрожжей с целью получения микробного белка (Single-cell protein). Получение белка одноклеточных организмов – это один из путей удовлетворения растущего спроса на кормовой и пищевой белок. Считается, что к 2050 г. население земли достигнет 9 млрд человек, и потребности в белке возрастут с 473 до 943 Мт. В предложенном двухстадийном процессе 25% углерода CO₂ оказывается в составе дрожжевой биомассы, содержащей 40–50% белка (Molitor et al., 2019).

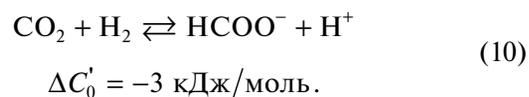
Многие бактерии могут использовать уксусную кислоту как источник углерода и энергии. Так, в СССР на заводе “Прогресс” (г. Степногорск, Казахская ССР) осуществлялся промышленный выпуск незаменимой аминокислоты L-лизина с использованием уксусной кислоты в качестве сырья и бактерий *Corynebacterium glutamicum* в качестве продуцента. Титр лизина достигал 70 г/л в аппаратах объемом 64 куб. м, а выпуск продукции составлял многие тысячи тонн в год.

Хранение водорода

Водород является перспективным энергоносителем для будущей циклической экономики. Одной из основных трудностей “водородной” энергетики является хранение и транспортировка этого высокореакционного газа, что требует построения новой и дорогой инфраструктуры.

Путем решения этой проблемы является хранение и транспортировка водорода в связанном

состоянии в виде формиата. Реакция восстановления CO₂ водородом идет по уравнению (10):



Формиат достаточно стабилен в водных растворах и может транспортироваться и храниться с использованием существующей инфраструктуры. В месте потребления водород получают из формиата достаточно просто в силу обратимости реакции (например, нагреванием раствора формиата).

В настоящее время формиат получают гидрированием CO₂ с помощью химических катализаторов при повышенных температурах и давлении. Вместе с тем реакция гидрирования CO₂ с образованием формиата – это первая реакция WLP-пути, и ацетогены осуществляют ее при комнатной температуре и нормальном давлении. К сожалению, большинство формиатдегидрогеназ, катализирующих эту реакцию, имеют в качестве кофакторов NADH и NADPH, что затрудняет использование этих ферментов для биокаталитического получения формиата.

Положение изменилось после открытия в 2013 г. у бактерий *A. woodii* фермента, осуществляющего гидрирование CO₂ с использованием только водорода. Фермент получил название водород зависимой CO₂ редуктазы (Hydrogen dependent carbon dioxide reductase, HDCR) (Schuchman, Müller, 2013). У бактерий *Thermoanaerobacter kivui* была обнаружена термостабильная HDCR (Schazz et al., 2018). Термостабильный фермент имеет оптимум действия при 70°C и катализирует как прямую, так и обратную реакции со скоростью около 930 мкмоль H₂ мин⁻¹ мг⁻¹ (Schazz et al., 2018). Была предложена технология биокатализа с использованием целых клеток для продукции формиата из синтез-газа (Schazz, Müller, 2020) и водорода из формиата (Kottenhahn et al., 2018), что снижает затраты и повышает стабильность биокатализа.

HDCR-ферменты превосходят по эффективности химические катализаторы. Так, число оборотов химического катализатора при 30°C составляет 3400 ч⁻¹ и при 80°C – 8050 ч⁻¹, а для HDCR из *T. kivui* число оборотов при 60°C достигает 9555000 ч⁻¹ (Müller, 2019). Таким образом, ацетогены имеют хорошие перспективы для развития биотехнологических процессов для получения формиата и его использования как в химической промышленности, так и в “водородной” энергетике будущего (Müller, 2019).

Электробиосинтез

Еще одним перспективным направлением практического применения ацетогенов является

электробиосинтез. Электробиосинтез – это прямое поглощение электронов бактериями с электрода (катода) и использование этих электронов в качестве восстановительных эквивалентов. Феномен был открыт 10 лет назад на примере ацетогена *Sporomusa ovata*, который поглощал электроны с катода и, восстанавливая CO_2 , синтезировал уксусную кислоту (Nevin et al., 2010). Процесс проводят при напряжении на катоде, которое не позволяет образование водорода. К электробиосинтезу кроме *S. ovata* способны еще некоторые ацетогены, например, *C. ljungdahlii*, *Sporomusa spheroides*, *Moorella thermoacetica*, но далеко не все (Shin et al., 2017).

Следует отметить, что механизм транспорта электронов для ацетогенов не известен.

Электробиосинтез осуществляется с очень высокой кулоновской эффективностью (то есть все электроны, полученные с катода, расходуются на восстановление CO_2 и формирование конечных продуктов), но скорости очень низкие. Так, электробиосинтез с *S. ovata* дикого типа приводит к накоплению около 1.8 мМ ацетата за 5 сут. Штамм был улучшен путем его адаптации к быстрому росту на метаноле (лабораторная эволюция). Такой штамм (*S. ovata* T18-2) за 5 сут синтезировал уже 13 мМ ацетата (Tremblay et al., 2015).

Совершенствование процесса связано с подбором условий процесса, особенно с подбором материала электродов. На сегодня скорости электробиосинтеза заметно увеличены и достигнуты показатели в $13.1 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$ (Aryal et al., 2018) и даже $25.2 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$ (May et al., 2016).

Высказывается предположение, что электробиосинтез хорошо бы сочетать с установками для получения электричества с помощью солнца или/и ветра. Такие установки работают неравномерно (в зависимости от силы ветра и освещенности), и возникают ситуации, когда электроэнергию хорошо бы законсервировать в виде химических связей. В этой связи важно понять, как будет вести себя электробиосинтез в случае периодического включения и выключения электрического тока. Этот случай был исследован, и оказалось, что прерывание подачи электричества даже на 64 ч не приводит к гибели микроорганизмов на катоде, и через 6 ч после возобновления подачи тока электробиосинтез восстанавливается в полном объеме (Rojas et al., 2018).

Несмотря на достигнутые успехи, биоэлектробиосинтезу присущи внутренние противоречия. Для высоких скоростей биосинтеза нужна высокая плотность тока, но в этом случае снижается кулоновская эффективность. При малой плотности тока эффективность процесса высока, но скорости малы. В целом электробиосинтез проигрывает по эффективности процессам, основанным на абиотическом электровосстановлении CO_2 в син-

тез-газ и последующей газовой ферментации (Prevotetan et al., 2020).

Миксотрофия

Многие ацетогены могут усваивать различные органические субстраты и осуществлять гетеротрофный рост. Усвоение сахаров осуществляется у них по широко распространенному пути Эмбдена–Мейергофа–Парнаса (Embden–Meyerhof–Parnas-pathway, EMP). Конечными продуктами этого пути при уксуснокислом брожении являются 2 молекулы ацетил-СoА, 2 молекулы АТФ, 2 молекулы CO_2 и 8 электронов из 1 молекулы гексозы. Теоретически, так как ацетогены имеют WLP-путь фиксации CO_2 , то они могут, используя энергию АТФ и наличие восстановительных эквивалентов, восстановить 2 молекулы CO_2 в ацетил-СoА и далее синтезировать ацетат. Таким образом, теоретически, при гетеротрофном росте на гексозах ацетогены могут синтезировать 3 моля ацетата на 1 моль гексозы. Условием такого сверхсинтеза ацетата является одновременная работа в клетке EMP и WLP путей биосинтеза. Это явление наблюдали экспериментально при росте ацетогенов на сахарах, и оно получило название анаэробная нефотосинтетическая миксотрофия – ANP (Anaerobic nonphotosynthetic mixotrophy) (Fast et al., 2015).

Хотя явление миксотрофии известно давно (Braun, Gottschalk, 1981), но оно до сих пор изучено недостаточно. Мало сведений о взаимодействии EMP и WLP путей. У некоторых ацетогенов обнаружена катаболитная репрессия, но для других отмечен равномерный рост на газовых субстратах в присутствии гексоз. В любом случае, наличие миксотрофии наблюдали в экспериментальных условиях неоднократно. Так, было исследовано 17 ацетогенных бактерий, как мезофильных, так и термофильных, и у всех отмечалось явление ANP. Наличие миксотрофии оценивается по величине отношения углерода в субстрате (гексозе) C_c к углероду в продукте C_p . Углерод в продукте – это сумма углерода в биомассе и синтезированных метаболитах. Для EMP пути $C_c/C_p = 0.67$ (что связано с выделением CO_2 в процессе). Всякое превышение C_c/C_p выше 0.67 будет означать наличие миксотрофии. Действительно, для всех изученных ацетогенов C_c/C_p колебался от 0.78 до 0.80 (Maru et al., 2018).

Явление миксотрофии можно использовать для увеличения энергообеспеченности ацетогенов при синтезе ими таких соединений как липиды или алканы. Интересным, но пока нереализованным направлением является перенос WLP-пути в промышленные гетеротрофы для увеличения выхода продуктов ферментации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Направлением современного научно-технического прогресса является движение от экономики, основанной на ископаемых ресурсах (нефть, газ, уголь) к циклической неисчерпаемой экономике, основанной на возобновляемых источниках энергии (ветер, солнце, биомассы растений, гидро- и геотермальная энергия) и замкнутом цикле использования углерода. Рецикл углерода может осуществляться через газификацию любых углеродсодержащих соединений с образованием синтез-газа. Синтез-газ в свою очередь будет субстратом для синтеза химикатов, полимеров и биотоплива.

Энергетика и химия — это гигантские и очень инерционные отрасли, и, конечно, переход их на рельсы циклической экономики займет многие десятилетия, возможно, весь оставшийся XXI век. Тем не менее, тенденция явно прослеживается. Уже сегодня цены ветровой и солнечной электроэнергии приблизились к ценам электричества, получаемого традиционными способами. К 2030 г. около 20% всей электроэнергии в мире будет получено из возобновляемых источников.

В новой циклической экономике большой удельный вес будет иметь биотехнология и, в частности, промышленная микробиология, которая будет производить различные химикаты, биотопливо, незаменимые аминокислоты, витамины, кормовой и пищевой белок, биодegradуемые биополимеры и многие другие продукты. Сегодня можно предполагать различные способы использования ацетогенов в будущей биоэкономике, несмотря на имеющиеся свойственные им ограничения. Эти ограничения связаны с бедным репертуаром синтезируемых ацетогенами метаболитов и энергетическими ограничениями, приводящими к медленному росту и невозможности синтеза энергоемких соединений, таких как алканы или высшие жирные кислоты и спирты.

Уже сегодня преодолены многие технические трудности газовой ферментации и синтез этанола из газов металлургического производства, обогащенных CO, реализован в промышленном масштабе. Нет технологических препятствий в тиражировании этой технологии. Сырьем для процесса могут быть растительная биомасса, подвергнутая газификации, или в будущем синтез-газ, получаемый электролизом воды в присутствии CO₂. Учитывая современное производство 100 млн тонн топливного этанола, легкость превращения этанола в этилен и полиэтилен, а также прогресс в технологиях получения авиационного топлива из этанола, будущий рынок этанола можно оценить в 0.5–0.8 млрд тонн в год.

Расширение состава синтезируемых ацетогенами метаболитов будет увеличиваться по мере

совершенствования методологии метаболической инженерии. Другой и очень простой подход к расширению набора синтезируемых метаболитов — это двустадийный процесс ферментации, когда на первом этапе ацетогены из синтез-газа образуют ацетат и этанол, а на втором гетеротрофы используют ацетат и этанол как источник углерода и энергии и синтезируют желаемые метаболиты. Двустадийный процесс пригоден почти для всех известных на сегодня продуктов микробиологической промышленности.

Большой и пока мало используемый потенциал заключается в явлении миксотрофии. В случае ацетогенов газовая ферментация с одновременным использованием сахаров усиливает энергообеспеченность, что делает возможным синтез энергоемких продуктов, например, алканов. Заманчива перспектива переноса WLP-пути в промышленные гетеротрофные микроорганизмы с целью повышения выхода целевых продуктов при ферментации сахаров.

В будущей “водородной” энергетике ацетогены могут найти применение в синтезе формиата из H₂ и CO₂ и в процессе разложения формиата на водород и уголекислоту. Синтез формиата может представлять и самостоятельный интерес для современной химической индустрии.

Успех всех вышеперечисленных направлений будет зависеть от прогресса в исследовании ацетогенных микроорганизмов, поиске новых представителей с уникальными свойствами, совершенствовании инструментов генетических преобразований, от успехов в понимании функционирования, регуляции и сопряжения метаболических сетей у этих микроорганизмов.

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

- Дебабов В.Г. Биоэтанол из синтез-газа // Биотехнология. 2012. Т. 28. № 3. С. 8–19.
- Annan F.J., Al-Sinawi B., Humphreys C.H., Normann R, Winzer K., Köpke M., Simpson S.D., Mitton N.P., Henstra A.M. Engineering of vitamin prototrophy in *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. P. 4633–4648.
- Arslan K., Bayer B., Abubackar H.V., Veiga M., Kennes C. Solventogenesis in *Clostridium acetivum* producing high

- concentrations of ethanol from syngas // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 292. P. 12191.
- Aryal N., Tremblay P.L., Xu M., Dangaard A.E., Zhang T.* Highly conductive poly (3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate polymer coated cathode for the microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide // *Front. Energy Res.* 2018. V. 6. P. 72.
- Bache R., Pfennig N.* Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields // *Arch. Microbiol.* 1981. V. 130. P. 255–261.
- Basen M., Müller V.* Hot acetogenesis // *Extremophiles.* 2017. V. 21. P. 15–26.
- Banerjee A., Leang C., Ueki T., Nevin K.P., Lovley D.R.* Lactose-inducible system for metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 2410–2417.
- Bengelsdorf F.R., Dürre P.* Gas fermentation for commodity chemicals and fuels // *Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 10. P. 1167–1170.
- Bengelsdorf F.R., Poehlein A., Linder S., Erz C., Hummel T., Hoffmeister S., Daniel R., Dürre P.* Industrial acetogenic biocatalysts: a comparative metabolic and genomic analysis // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1036.
- Bertsch J., Müller V.* Bioenergetic constraints for conversion of syngas to biofuels in acetogenic bacteria // *Biotechnol. Biofuel.* 2015a. V. 8. P. 210.
- Bertsch J., Müller V.* CO metabolism in the acetogene *Acetobacter woodii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015b. V. 81. P. 5949–5956.
- Braun K., Gottschalk G.* Effect of molecular hydrogen and carbon-dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium acetatum* // *Arch. Microbiol.* 1981. V. 128. P. 294–298.
- Brown S.D., Nagaraju S., Utturkar S., De Tissera S., Segovia S., Mitchell W., Land M.I., Dassanayake A., Köpke M.* Comparative single-molecule sequencing and hybrid approach for finishing the genome of *Clostridium autoethanogenum* and analysis CRISPR systems in industrial relevant clostridia // *Biotechnol. Biofuel.* 2014. V. 7. P. 40–58.
- Buckel W., Thauer R.* Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin and anaerobic respiration with proton (Ech) or NAD (Rnf) as electron acceptors: A historical review // *Front. Microbiol.* 2018a. V. 9. P. 401.
- Buckel W., Thauer R.* Flavin-based electron bifurcation. A new mechanism of biological energy coupling // *Chem. Rev.* 2018b. V. 118. P. 3862–3886.
- Burton R., Can M., Eskilsen D., Wiley S., Ragsdahl S.W.* Production and properties of enzymes that activate and produce carbon monoxide // *Methods Enzymol.* 2018. V. 613. P. 297–324.
- Classen N.J., Cotton C.A.R., Kopljar D., Bar-Even A.* Making quantitative sense of electromicrobial production // *Nat. Catal.* 2019. V. 2. P. 437–447.
- Cotton C.A.R., Claassens N.J., Benito-Vequejizo S., Bar-Even A.* Renewable methanol and formate as microbial feed stocks // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2020. V. 62. P. 168–180.
- Drake H.L., Gossner A.S., Daniel S.L.* Old acetogenes new light // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1125. P. 100–128.
- Drake H.L., Kiisel K., Matthies M.* “Acetogenic Prokaryotes” // *The Prokaryotes* / Eds. Rosenberg E., De Long E.F., Lory S., Stackelbrandt E., Tompson F. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013.
- Demmer K., Huang H., Wang S., Demmer U., Tauer R.K., Ermler U.* Insight into flavin-based electron bifurcation via the NAD-dependent reduced ferredoxin NADP oxidoreductase structure // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 21985–21995.
- De Tissera S., Köpke M., Simpson S.D., Humphreys C., Minton N.P., Dürre P.* Syngas biorefinery and syngas utilization in *Biorefineries*, Wagemann K. and Tippkötter N., Eds. // *Adv. Biochem. Biotechnol.* 2019. V. 166. P. 247–280.
- Diender M., Stams A.J., Souza D.Z.* Production of medium-chain acids and higher alcohols by a synthetic coculture grown on carbon monoxide or syngas // *Biotechnol. Biofuels.* 2016. V. 9. P. 82.
- Dürre P.* Butanol formation from gaseous substrates // *FEMS Microbiol. Lett.* 2016. V. 363. P. fnw040.
- Dürre P., Eikmanns B.* C₁-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V. 35. P. 63–72.
- Fast A.G., Papoutsakis E.T.* Stoichiometric and energetic analysis of non-photosynthetic CO₂ fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuel and chemicals // *Curr. Opin. Chem. Engin.* 2012. V. 1. P. 380–395.
- Fast A.G., Schmidt E.D., Jones W., Tray B.P.* Acetogenic mixotrophy novel options for yield improvement in biofuel and biochemical production // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 60–72.
- Flüchter S., Follonier S., Schiel-Bengelsdorf B., Bengelsdorf F.R., Zinn M., Dürre P.* Anaerobic production of poly(3-hydroxybutyrate) and its precursor 3-hydroxybutyrate from synthesis gas by autotrophic *Clostridia* // *Biomacromolecules.* 2019. V. 20. P. 3271–3282.
- Gildemyn S., Molitor B., Usack G., Nguen M., Rabaey K., Angenent L.T.* Upgrading syngas fermentation effluent using *Clostridium kluyveri* in a continuous fermentation // *Biotechnol. Biofuel.* 2017. V. 10. P. 83.
- Groher A., Weuster-Botz D.* Comparative reaction engineering analysis of different acetogenic bacteria for gas fermentation // *J. Biotechnol.* 2016. V. 288. P. 82–94.
- Haas T., Krause R., Weber R., Demler M., Schmid G.* Technical photosynthesis involving CO₂ electrolysis and fermentation // *Nature Catal.* 2018. V. 1. P. 32–39.
- He Y., Li M., Perumal V., Feng X., Fang Y., Xie Y., Sievert S.M., Wang F.* Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum *Bathyarchaeota* widespread in marine sediments // *Nature Microbiol.* 2016. V. 1. P. 16035.
- Heap J.T., Kuchne S.A., Ehsaan M., Gartman S.T., Cooksley C.M., Scott J.C., Minton N.P.* The GlosTron mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined // *J. Microbiol. Meth.* 2010. V. 80. P. 49–55.

- Herrmann G., Jayamani E., Mai G., Buckel W. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. P. 784–791.
- Hess V., Schehman K., Müller V. The ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase from acetogen *Acetobacter woodii* requires Na⁺ and reversible coupled to the membrane potential // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 288. P. 31496–31502.
- Hoffmeister S., Gerdom M., Bengelsdorf F.R., Linder S., Flüchter S., Öztürk H., Blümke W., May A., Fischer Y., Bahl H., Dürre P. Acetone production with metabolically engineered strain *Acetobacterium woodii* // *Metabolic. Engin.* 2016. V. 36. P. 37–47.
- <https://belgium/arcelormittal.com/en/> ArcelorMittal and LanzaTech break ground on €150million project to revolutionise blast furnace carbon emissions capture
- <http://biomassmagazine.com/articles/13662/ineos-bio-to-sell-ethanol-business-including-vero-beach-plant>
- <https://www.chemicals-technology.com/projects/LanzaTech-2,3-Butanediol-Demonstration-Plant>
- <https://www.lanzatech.com>
- <https://press.siemens.com/global/en/pressrelease/research-project-rheticus>
- <https://www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries/>
- Huang H., Chai C., Ci N., Rove P., Minton N.P., Yang S., Liang W., Gu Y. CRISPR/cas9-based efficient genome editing in *Clostridia ljungdahlii* an autotrophic gas-fermenting bacterium // *ACS Synt. Biol.* 2016. V. 5. P. 1355–1361.
- Humphreys C.M., McLean, S., Schatschneider M.S., Milat S., Henstra A.M., Annan F.J., Breitkopf R., Pander B., Piatek P., Rowe P., Wichlacz A.T., Woods C., Norman R., Blom J., Goesman A., Hodgman C., Barrett D., Thomas N.R., Winzer K., Minton N.P. Whole genome sequence and manual annotation of *Clostridium ethanogenum* and industrial relevant bacterium // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. P. 1085.
- Jiang Y., Zhang T., Lu J., Dürre P., Zhang W., Doung W., Zhou J., Jiang M., Xin F. Microbial co-culturing systems butanol production from organic waste through consolidated bioprocessing // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. P. 5419–5425.
- Joseph R.C., Kim N.M., Sandoval N.R. Recent development of the synthetic biology Toolkit for *Clostridium* // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 154.
- Karim A.S., Dudlen Q.M., Juminaga A., Yuan Y., Crowe S.A., Heggstad J.T., Gary S., Abdalla T., Grubbe W., Rasor R.J., Coar D.N., Torulas S.M., Krein M., Liew F.M., Qua-Tellbaum A., Jensen R.O., Stuart J.A., Simpson S.D., Köpke M., Jewett M.C. *In vitro* prototyping and rapid optimisation of biosynthetic enzymes for cell design // *Nature Chem. Biol.* 2020.
- <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0959-0>
- Köpke M., Held C., Hujer S., Liesegang H., Weizer A., Wellherr A., Ehrenreich A., Liebel W., Gottshalk G., Dürre P. *Clostridium ljungdahlii* represent a microbial production platform based on syngas // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 13087–13092.
- Köpke M., Mihalcea C., Bromley J.C., Simpson S.D. Fermentative production of ethanol from carbon monoxide // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011a. V. 22. P. 320–325.
- Köpke M., Mihalcea C., Liew F.M., Tizard J.H., Ali M.S., Konnoly J.J., Sinawi A.L., Simpson S.D. 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011b. V. 77. P. 5467–5475.
- Köpke M., Gerth M.L., Maddok D.J., Mueller A.P., Liew F.M., Simpson S.D., Patrick W.M. Reconstruction of acetogenic 2,3-butandiol pathway involving a novel NADPH-dependent primary-secondary alcohol dehydrogenase // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 3394–3403.
- Kottenhahn P., Schuchman K., Müller V. Efficient whole-cell biocatalyst formate based hydrogen production // *Biotechnol. Biofuels.* 2018. V. 11. P. 93.
- Kremp F., Poelein A., Daniel R., Müller V. Methanol metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii* // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 4369–4384.
- Latif H., Zeidan A.A., Nielson A.T., Zandler K. Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. V. 27. P. 79–87.
- Leang C., Ueki T., Nevin R., Lovley D.R. A genetic system for *Clostridium ljungdahlii* a chassis for autotrophic production of biocomodities and a model homoacetogen // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 1102–1109.
- Lechtenfeld M., Heine J., Sameith J., Kremp F., Müller V. Glycine betaine metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii* // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 4512–4525.
- Lehtinen T., Efimova E., Tremblay P.L., Santala S., Zhang T., Santala V. Production of long chain alkyl esters from carbon dioxide and electricity by a two-stage bacterial process // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 43. P. 30–36.
- Lehtinen T., Vitrauen M., Santala S., Santala V. Production of alkanes from CO₂ by engineered bacteria // *Biotechnol. Biofuels.* 2018. V. 11. P. 228.
- Lemaire O.N., Jespersen M., Wagner T. CO₂-fixation strategies in energy extremophiles: what can we learn from acetogenes? // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 486.
- Lemgruber R.S.P., Valgepea K., Tappel R., Behrendorff J.B., Palfreyman R.W., Plan M., Hodson M.P., Simpson S.D., Nielsen L.K., Köpke M., Marcellin E. System-level engineering and characterization of *Clostridium autoethanogenum* through heterologous production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) // *Metabol. Eng.* 2019. V. 53. P. 14–23.
- Liang J., Huang H., Wang S. Distribution, evolution, catalytic mechanism and physiological functions of the flavin-based bifurcating NADH-dependent reduced ferredoxin NADP oxidoreductase // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 373.
- Liew F.-M., Martin M.E., Tappel R.C., Heijstra V.D., Mihalcea C., Köpke M. Gas fermentation – a flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feed stocks // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 694.

- Liew E., Henstra A.M., Köpke M., Winzer K., Simpson S.D., Minton N. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production // *Metab. Engin.* 2017. V. 40. P. 104–114.
- Lubner C.E., Jennigs D.P., Mudler D.W., Schut G.J., Zadvornyy O.A., Hoben J.P., Tokmina-Lukaszewska M., Berry L., Nguen D.M., Lipscomb G., Bother B., Jones A.K., Miller A.F., King P.W., Adams M.W., Peters Y.W. Mechanistic insight in to energy conservation by flavin-based electron bifurcation // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. P. 655–659.
- Martin A.J., Larrazable G.O., Peretz-Ramirez Y. Towards sustainable fuels and chemicals through the electrochemical reduction of CO₂: lesson from water electrolysis // *Green Chem.* 2015. V. 17. P. 5114–5130.
- Maru B.T., Munasinghe P.C., Gilary H., Yones S.W., Tray P. Fixation of CO₂ and CO on a diverse range of carbohydrates using anaerobic, non-photosynthetic mixotrophy // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. P. 039.
- May H.D., Evans P.J., La Belle E.V. The bioelectrosynthesis of acetate // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. V. 42. P. 225–233.
- Mayer A., Weuster-Botz D. Engineering analysis of the autotrophic energy metabolism of *Clostridium aceticum* // *FEMS Microbiol. Letters.* 2017. V. 364. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx2019>
- McAllister K.N., Sorg J.A. CRISPR genome editing systems in the genus *Clostridium*: a timely advancement // *J. Bacteriol.* 2019. V. 201(16). e 00219-19.
- Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation // *FEBS Lett.* 1975. V. 59. P. 137–139.
- Mitchell P. Possible molecular mechanism of the proton motive function of cytochrome system // *J. Theor. Biol.* 1976. V. 62. P. 317–327.
- Mock J., Zheng Y., Mueller A.P., Ly S., Trau L., Segovia S., Nagaraju S., Köpke M., Dürre P., Thauer R.K. Energy conservation associated with ethanol formation from H₂ and CO₂ in *Clostridium autoethanogenum* involving electron bifurcation // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. P. 2965–2980.
- Mohr T., Intantes A., Biebinger L., Mayer P., Neuman A. Acetogenic fermentation from oxygen containing waste gas // *Front. Bioengin. Biotechnol.* 2019. V. 7. Art. 433.
- Molitor B., Richter H., Martin M.F., Jensen R.Q., Juminada A., Mihalcea C., Augenent L.T. Carbon recovery by fermentation of CO-rich gasses-turning steel mills in to biorefineris // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 15. P. 386–398.
- Molitor B., Marcellin E., Augenent L. Overcoming the energetic limitations of syngas fermentation // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017. V. 84. P. 84–92.
- Molitor B., Mishra A., Augenent L.T. Power-to-protein: converting renewable electric power and carbon dioxide into cell protein with two-stage bioprocess // *Energy Environ. Sci.* 2019. V. 12. P. 3515–3521.
- Müller V. New horizons in acetogenic conversion of one-carbon substrates and biological hydrogen storage // *Trends Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 1344–1354.
- Nagaraju S., Davis N.K., Jeffery D., Walker F., Köpke M., Simpson S.D. Genome editing *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/cas9 // *Biotechnol. Biofuel.* 2019. V. 9. P. 219–227.
- Najafpour G.D., Yones H. Ethanol and acetate synthesis from waste gas using butch culture of *Clostridium ljungdahlii* // *Enzyme. Microbiol. Technol.* 2006. V. 38. P. 223–228.
- Nelson L.K., Marcellin E., Valdepea K., Loi K.Q., Behrendorff J.B., Lemgruber R.S.P., Hodson M.P., Köpke M. Arginine deaminase pathway provides ATP and boosts growth of the gas-fermenting acetogen *Clostridium autoethanogenum* // *Metab. Engin.* 2017. V. 41. P. 202–211.
- Nevin K.P., Woodart T.L., Franks A.E., Summers Z.M., Lovley D.R. Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds // *mBio.* 2010. V. 1. e00103–e00110.
- Norman R.O.J., Millat T., Winzer K., Minton N.P., Hogman C. Progress towards platform chemical production using *Clostridium autoethanogenum* // *Biochem. Soc. Trans.* 2018. V. 46. P. 523–535.
- Patent Germany DE. № 102007052463 A1.
- Patent US. 2007. № 7285402.
- Patent US. 2012. № 0252083.
- Patent US. 2014. № 20140273115 A1.
- Patent US. 2018. № 890384132.
- Patent WO. 2012. № 2012/053905.
- Patent WO. 2014. № 2014/1132209 A1.
- Peters J.W., Beratan D.N., Bother B., Dyer R.B., Harwood S., Heiden Z.M., Hill R., Jones A.K., King P.W., Lu Ji., Lubber C.E., Minter S.D., Mudler D.W., Rangei S., Schut G.J., Seefeld L.C., Tokmina-Lukaszewska M., Zadvornyy O.A., Zhang P., Adams M.W. A new era for electron bifurcation // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018. V. 47. P. 32–38.
- Phillips J.R., Atiyeh H.K., Tanner R.S., Torres J.R., Saxena Y., Wilkins M.R., Hunke R.L. Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorus* syngas fermentation: medium development and culture techniques // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 190. P. 114–121.
- Phillips G., de Vries S., Jennevein S. Development of a metabolic pathway transfer and genomic integration system for the syngas-fermenting bacterium *Clostridium ljungdahlii* // *Biotechnol. Biofuel.* 2019. V. 12. P. 112.
- Poudel S., Dunham E.C., Lindsay M.R., Amenober M.J., Fones E.M., Colman D.R., Boyd E.S. Origin and evolution of flavin-based electron bifurcating enzymes // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1762.
- Prevotean A., Carvajal-Arroyo J.M., Ganigue R., Rabaey R. Microbial electrosynthesis from CO₂: forever a promise? // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2020. V. 62. P. 48–57.
- Rajagopalan S., Datar R.P., Lewis R.S. Formation of ethanol from carbon monoxide via new microbial catalyst // *Bioenergy.* 2002. V. 23. P. 487–493.
- Ramio-Pujol S., Ganigue R., Baneras L., Calprim J. Impact of formate on the growth and productivity of *Clostridium ljungdahlii* PETO and *Clostridium carboxidivorus* P7 grown on syngas // *Int. Microbiol.* 2014. V. 17. P. 195–204.
- Ramio-Pujol S., Ganigue R., Baneras L., Colprim J. Incubation at 25°C prevents acid crush and enhances alcohol pro-

- duction in *Clostridium carboxidivorus* P7 // Bioresour. Technol. 2015. V. 192. P. 296–303.
- Ramio-Pujol S., Ganigue R., Banaras L., Colprim J. Effect ethanol and butanol on autotrophic growth on model homoacetogenes // FEMS Microbiol. Letters. 2018. V. 365. fny084.
- Riegler P., Bieringer F., Chrousel T., Stazz T., Lowe M., Webster-Botz D. Continuous conversion CO₂/H₂ with *Clostridium acetatum* in biofilm reactors // Bioresour. Technol. 2019. V. 291. P. 121760.
- Richter H., Molitor B., Diender M., Sousa D.Z., Auguent L.T. A narrow pH range supports butanol, hexanol and octanol production from syngas in a continus co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with in-line product extaction // Front. Microbiol. 2016a. V. 7. P. 1773.
- Richter H., Molitor B., Wei H., Chen W., Aristide L., Auguent L.A. Ethanol production in syngas-fermentating *Clostridium ljungdahlii* controlled by thermodynamic rather than enzymatic expression // Energy Environ. Sci. 2016b. V. 9. P. 2392–2399.
- Rogsdale S.W., Pierce E. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1784. P. 1873–1898.
- Rogsdale S.W. Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenes // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1125. P. 129–136.
- Rojas M., Zaiat M., Gonzalez E.R., Wiver H., Pant D. Effect of the electric supply interruption on a microbial electrosynthesis system converting in organic carbon into acetate // Bioresour. Technol. 2018. V. 206. P. 203–210.
- Schwarz M.F., Schuchman K., Müller V. Hydrogenation of CO₂ at ambient pressure catalyzed by a highly active thermostable biocatalysis // Biotechnol. Biofuels. 2018. V. 11. P. 237.
- Schwarz M.F., Müller V. Whole-cell biocatalysis for hydrogen storage and syngas conversion to for mate using thermophilic acetogen // Biotechnol. Biofuels. 2020. V. 13. P. 13.
- Schoelmerich M.C., Müller V. Energy-converting hydrogenases: the link between H₂ metabolism and energy conservation // Cell Mol. Life Sci. 2019a. V. 77. P. 1461–1481.
- Schoelmerich M.C., Müller V. Energy conservation by a hydrogenase-dependent chemiosmotic mechanism in an ancient metabolic pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019b. V. 116. P. 6329–6334
- Schoelmerich M.C., Katsyv A., Dinig J., Hackmann T.J., Müller V. Energy conservation involving 2 respiratory circuits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. P. 1167–1173.
- Schiel-Bengelsdorf B., Dürre P. Pathway engineering and synthetic biology using acetogenes // FEBS Letters. 2012. V. 586. P. 2190–2198.
- Shin J., Song Y., Jeong Y., Cho B.-K. Analysis of the core genome and pangenome of autotrophic acetogenic bacteria // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 1531.
- Shin H.J., Yuang K.A., Nam C.W., Park J.M. A genetic approach for microbial electrosynthesis system as biocommodities production platform // Bioresour. Technol. 2017. V. 245. P. 1421–1429.
- Schuchman K., Müller V. Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase // Science. 2013. V. 342. P. 1380–1385.
- Schuchman K., Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life. A model for energy conservation in acetogenic bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2014. V. 12. P. 809–821.
- Shut G.J., Adams M.V. The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 4451–4457.
- Spirito C.M., Richter H., Rabaey K., Stams A.J.M., Auguent L.T. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste // Curr. Opin. Biotechnol. 2014. V. 27. P. 115–122.
- Stoll R., Boukis N., Sauer J. Syngas fermentation to alcohols: reactor technology and application // Chem. Ind. Tech. 2020. V. 92. P. 125–136.
- Strätz M., Sauer U., Kuhn A., Dürre P. Plasmid transfer into the homoacetogen *Acetobacter woodii* by electroporation and conjugation // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 1033–1037.
- Straub M., Demler M., Wenster-Botz D., Dürre P. Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii* // Biotechnol. 2014. V. 178. P. 67–72.
- Takors R., Kopf M., Mampel J., Bluemke W., Blombach B., Eikmanns B., Bengelsdorf F.R., Weuster-Botz D., Dürre P. Using gas mixture of CO, CO₂ and H₂ as microbial substrates: the do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale // Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 11. P. 606–625.
- Tremblay P.L., Zhang T., Dar S.A., Leang C., Lovley D.K. The Rnf complex *Clostridium ljungdahlii* is a proton-translocating ferredoxin:NAD oxidoreductase essential for autotrophic growth // mBio. 2012. e00406-12.
- Tremblay P.L., Höglund D., Koza A., Bonde I., Zhang T. Adaptation of the autotrophic acetogen *Sporomusa ovata* to methanol accelerate the conversion CO₂ to organic products // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 16168.
- Ueki T., Nevin K.P., Woodart T.L., Lovley D.R. Converting carbon dioxide to butyrate with engineered strain of *Clostridium ljungdahlii* // mBio. 2014. e01636-14-e4.
- Van Hecke W., Bockrath R., De Wever D. Effects of moderately elevated pressure on gas fermentation process // Bioresour. Technol. 2019. V. 293. P. 122129.
- Wang S., Huang H., Kahut Y., Mueller A.P., Köpke M., Thauer R.K. NADP-specific electron-bifurcating [Fe-Fe]-hydrogenase in functional complex with formate dehydrogenase in *Clostridium autoethanogenum* grown on CO // J. Bacteriol. 2013. V. 195. P. 4373–4386.
- Westphal L., Wiechmann A., Baker J., Minton N.A., Müller V. The Rnf complex is an energy coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the *Acetobacterium woodii* // J. Bacteriol. 2018. V. 200. e00357-18.

Zhao R., Lin Y., Zhang M., Chai C., Wang J., Yang W., Gu Y. CRISPR/gas12-mediated gene deletion and regulation in *Clostridia ljungdahlii* and its application in carbon flux redirection in synthesis gas fermentation // ACS Synth. Biol. 2019. V. 8. P. 2270–2279.

Zhu H.-F., Lin Z.Y., Zhou L., Yi J.-H., Lun Z.-M., Wang S.-N., Tang W.-Z., Li F.-L. Energy conservation and carbon flux distribution during fermentation of CO and H₂/CO₂ by *Clostridium ljungdahlii* // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 416.

Acetogens: Biochemistry, Bioenergetics, Genetics, and Biotechnological Potential

V. G. Debabov*

*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”,
Moscow, 117545 Russia*

**e-mail: debabov13@yandex.ru*

Received December 30, 2020; revised January 25, 2021; accepted January 25, 2021

Abstract—The review discusses the present-day data on the biochemistry, bioenergetics, and genetics of acetogens, as well as their biotechnological potential. Acetogens are anaerobic gram-positive bacteria capable of growth on gaseous substrates: CO₂, CO, H₂. These bacteria have a characteristic biochemical pathway of CO₂ reduction to acetyl-CoA, termed the reductive acetyl-CoA pathway or a the Wood–Ljungdahl pathway. This is the only pathway of CO₂ fixation coupled to energy storage. Due to their efficient non-photosynthetic CO₂ fixation acetogens may be used for production of chemicals and biofuel in the expected economy based on renewable energy and resources. The shortcoming of acetogens growing on gaseous substrates are low energy provision and a narrow spectrum of terminal metabolites, primarily acetic acid and ethanol with low amounts of butanol and butyric acid. Acetogens are capable of heterotrophic growth on such substrates as sugars, lactate, or alcohols. Mixotrophy, i.e., simultaneous utilization of different substrates by acetogens, is a promising approach to increasing the energy provision. Application of the methods of metabolic engineering is required both for successful coupling of different metabolic pathways and for broadening the range of synthesized products. Genetic tools for the transformation of genomes of acetogens have been considerably improved in recent years.

Keywords: acetogens, CO₂ fixation, Wood–Ljungdahl pathway, electron bifurcation, genetic tools, metabolic engineering, biofuel, hydrogen storage

МИКРООРГАНИЗМЫ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ БАЙКАЛА – САМОГО ГЛУБОКОГО И ДРЕВНЕГО ОЗЕРА МИРА

© 2021 г. Т. И. Земская^а, * С. В. Букин^а, А. В. Ломакина^а, О. Н. Павлова^а

^аЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: tzema@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 09.12.2020 г.

После доработки 24.12.2020 г.

Принята к публикации 25.12.2020 г.

В обзоре обобщены результаты исследования микробных сообществ в донных осадках озера Байкал, полученные в последние десятилетия с помощью разных подходов. С использованием метабаркодинга в осадках районов со спокойным осадконакоплением показано доминирование представителей *Alpha-*, *Gamma*proteobacteria (включая *Betaproteobacteriales*), *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Thaumarchaeota*, характерных обитателей других пресноводных озер. Структура микробных сообществ изменялась в зонах разгрузки газосодержащих минерализованных флюидов в зависимости от наличия акцепторов электронов, интенсивности и компонентного состава газосодержащих флюидов, обеспечивающих миграцию микроорганизмов из глубинной зоны в поверхностные слои донных отложений и наоборот. В осадках Байкала детектированы археи, способные образовывать метан по всем четырем известным катаболическим путям: гидрогенотрофному, ацетокластическому, метилотрофному и водород-зависимому метилотрофному. В сообществах архей доминировали гидрогенотрофные метаногены семейства *Methanoregulaceae* (род *Methanoregula*, *Methanosphaerula* и некультивируемые), водород-зависимые метилотрофные археи порядка *Methanomassiliicoccales* и ацетокластические метаногены семейства *Methanosaetaceae* (род *Methanothrix* (*Methanosaeta*)), составляющие ядро метаногенных сообществ в донных отложениях других пресноводных озер. Экспериментально доказано протекание процесса анаэробного окисления метана (АОМ) по нитрат- и нитритзависимому пути с участием архей подкластера ANME-2d и бактерий филума NC10, с высокой степенью идентичности структур генов 16S рРНК, *mcrA* и *pmoA* пресноводным участникам этого процесса. Разнообразие микробных сообществ в районах естественных выходов нефти отличалось на уровне семейств и порядков, а также наличием в геномах культивируемых видов алкангидроксилаз.

Ключевые слова: озеро Байкал, донные осадки, микроорганизмы, разнообразие, функциональные гены, образование и окисление метана и нефти

DOI: 10.31857/S0026365621030174

ДОННЫЕ ОТЛОЖЕНИЯ ОЗЕРА БАЙКАЛ КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Озеро Байкал – самое глубокое и древнее озеро мира, общий объем его донных отложений составляет около 75 тыс. км³, их максимальная мощность превышает 9 км (Логачев, 2003). Байкальская впадина с максимальной глубиной 1642 м расположена в центре тектонически активной рифтовой зоны, самые древние отложения датируются олигоценным возрастом (Hutchinson et al., 1992; Мац и соавт., 2001). Впадина разделена на три котловины – южную, среднюю и северную, отделенные друг от друга подводными возвышенностями – Бугульдейской перемычкой и Академическим хребтом (рис. 1). Осадки в трех глубоководных частях озера имеют идентичный химический состав в результате гомогенизации

мелких фракций, поступающего терригенного материала, переносимого установившимися течениями (Гвоздков, 1998). Вся центральная часть дна озера занята диатомовыми илами, концентрация биогенного кремния в поверхностных илах пелагиали в среднем составляет 19%. До 90% дна покрыто осадками, с содержанием SiO₂биог. более 10% (Гранина, 2008). Средняя концентрация C_{орг} в осадках Байкала 1.9%, в отложениях Южного и Среднего Байкала 1.5–2.5%, в северной котловине – 1.0–1.3% (Выхристюк, 1980), что сопоставимо с отмечаемыми значениями в океанических отложениях в высокопродуктивных континентальных окраинах (Qiu et al., 1993). По данным Л.А. Выхристюк (1980) в состав захороненного органического вещества (ОВ) входят гуминовые кислоты и целлюлоза, сильно разложившиеся остатки вышедших наземных растений и фитопланктона, обла-

дающие высокой устойчивостью к дальнейшей деградациии.

Геохимические процессы в донных отложениях Байкала были предметом исследований многих авторов (Мизандронцев, 1975; Погодаева и соавт., 2007; Гранина, 2008; Och et al., 2012; Pogodaeva et al., 2017). Одной из важнейших особенностей озера Байкал является широко представленная окислительная стадия раннего диагенеза (Гранина, 2008). Глубина проникновения кислорода в осадки от менее 2 до более 50 мм, толщина окисленного слоя от 0.2 до >30 см. Величины pH в осадке в основном находятся в интервале 6.9–7.4, при диапазоне от 6 до >8 (Мизандронцев, 1975; Гранина, 2008). По данным И.Б. Мизандронцева (1978) глубокое проникновение кислорода обусловлено медленным накоплением осадков в Байкале, причем поверхностные осадки окислены на большей части дна (Гранина, 2008). Скорости осадконакопления в открытом Байкале меняются от 0.015 до более 1 мм/год (Колман и соавт., 1993; Vologina et al., 2000).

Поровые воды донных отложений в районах со спокойным осадконакоплением наследуют химический состав озерных вод и характеризуются однородным солевым составом. Наиболее распространенными растворенными ионами в озере Байкал являются HCO_3^- и Ca^{2+} . Что касается цепных биогеохимических процессов, наиболее важным отличием от морской воды является очень малая концентрация растворенного SO_4^{2-} в водах озера Байкал (0.05 мМ) по сравнению с морской водой (28.9 мМ) (Aloisi et al., 2019). Другие ионы, которые составляют большую часть растворенных солей в морской воде (Cl^- , Na^+ , Mg^{2+} и K^+), присутствуют в водах озера Байкал в очень малых концентрациях (≤ 0.15 мМ) (Погодаева и соавт., 2007; Pogodaeva et al., 2017). При диагенетических преобразованиях суммарные концентрации ионов в поровых водах увеличиваются с глубиной осадка за счет увеличения концентрации ионов бикарбоната и кальция. Из-за нехватки акцепторов электронов SO_4^{2-} и NO_3^- , большая часть растворенного неорганического вещества, образующегося в результате разложения ОВ и последующих окислительно-восстановительных реакций, находится в форме CO_2 , а не HCO_3^- , что приводит к более низким pH в диагенетической среде (Мизандронцев, 1975). Пополнение ОВ ежегодно происходит в весенний и осенний периоды за счет массового развития диатомовых водорослей (Вотинцев и соавт., 1975), в летний период — пикопланктона (Nagata et al., 1994). С использованием седиментационных ловушек показано присутствие раковин диатомовых водорослей и органического вещества автотонного происхождения на всех глу-

бинах водной толщи (Вологина, Штурм, 2017), тогда как лишь 10% пикопланктона достигает дна.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Микробиологические исследования донных отложений озера Байкал проводятся с начала прошлого столетия с использованием подходов и методов, широко используемых в водной микробиологии. Направления исследований и основные результаты приведены в монографиях и многочисленных статьях (Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ, 1985; Намсараев, Земская, 2000; Микробиологическое наследие XX века, 2004). На Байкале работала целая плеяда ведущих микробиологов России, включая С.И. Кузнецова, А.Е. Крисса, Ю.И. Сорокина, А.П. Романову, А.Г. Родину, Г.А. Дубинину, В.Н. и Э.А. Максимовых, Б.Б. Намсараева. В публикациях приведены сведения о количестве микроорганизмов в осадках озера Байкал с различными геохимическими обстановками, проанализировано распространение физиологических групп микроорганизмов в разных районах и глубинах осадочной толщи, дана оценка метаболической активности микробных сообществ, в том числе в районах с повышенным антропогенным воздействием (Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ, 1985; Намсараев, Земская, 2000; Микробиологическое наследие XX века, 2004). Новый этап исследований роли микробных сообществ в донных отложениях был начат в период масштабных геолого-геофизических работ, проводимых международными коллективами ученых на Байкале с конца 90-х годов прошлого столетия. В эти годы основное внимание было уделено исследованию микроорганизмов, участвующих в разных этапах деструкции ОВ, оценке скоростей процессов деструкции органического вещества в осадочной толще Байкала (Максимова, Максимов, 1989; Намсараев, Земская, 2000; Пименов и соавт., 2014). Было установлено, что развитие определенных физиологических групп микроорганизмов в донных отложениях определяется доступностью субстратов, окисленными или восстановленными условиями на определенных глубинах осадочной толщи и поступлением газосодержащих минерализованных флюидов из глубинных осадков. Ежегодное поступление в осадки органического вещества и низкие концентрации сульфат иона обеспечивают доминирование процесса метангенерации на конечных этапах деструкции.

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Особый прогресс по оценке разнообразия микробных сообществ достигнут с применением молекулярно-биологических методов и подходов. С помощью методов секвенирования генов 16S рРНК и *mcrA* получены данные о разнообразии и функционировании микроорганизмов в осадках с различным составом поровых вод (Шубенкова и соавт., 2005; Kadnikov et al., 2012; Черницына и соавт., 2016; Lomakina et al., 2018). Как и в других пресноводных озерах, таксономический состав микробных сообществ по глубине осадка в Байкале неодинаков и определяется наличием окислителей, концентрацией и составом доступного ОВ и других жизненно важных элементов (Кузнецов, 1970; Заварзин, 2003; Huang et al., 2019; Han et al., 2020). В одних случаях микробиомы в осадках одного района и со сходными условиями различались вкладом доминирующих таксонов (Земская и соавт., 2018; Zakharova et al., 2018), а в других отмечалось их сходство с микробиомами из других районов и слоев донных отложений (Шубенкова и соавт., 2005; Kadnikov et al., 2012; Zemskaya et al., 2015a; Черницына и соавт., 2016; Bukin et al., 2016; Lomakina et al., 2018). В сообществах окисленных осадков и до нижней границы проникновения кислорода (2 см) доминировали типичные для пресноводных озер органотрофные бактерии (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*), для которых показано участие в первых этапах деградации органических соединений (Newton et al., 2011). Большой вклад представителей двух первых филумов в бактериальные сообщества характерен для окисленных слоев всех исследованных нами осадков Байкала, тогда как доминирование в сообществах представителей филума *Verrucomicrobia* отмечалось не везде (Kadnikov et al., 2012; Zemskaya et al., 2015a; Земская и соавт., 2018; Zakharova et al., 2018). Согласно данным по структуре геномов микроорганизмов из тех же таксономических групп, которые были выявлены в аэробной зоне осадков Байкала (в основном *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*), а также их ближайших известных родственников, в окисленной зоне обитают аэробные и факультативно анаэробные бактерии, окисляющие углеводы, аминокислоты и жирные кислоты (Yoon et al., 2008; Pujalte et al., 2014; Sun et al., 2016), и аэробные нитрифицирующие археи (MGI и SCG) (Cabello-Yeves et al., 2020; Han et al., 2020; Spang et al., 2012). На границе аэробной и анаэробной зон, при высоком вкладе таксонов, доминирующих в вышерасположенных слоях осадка, как правило, увеличивался вклад представителей *Bacteroidetes*, принадлежащих семействам *Flavobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae*, а также неклассифицированных микроорганизмов. В анаэробной зоне осад-

ка, в частности, в зоне залегания железо-марганцевого слоя (ЖМС), преобладали последовательно с неустановленной таксономической принадлежностью, положительно коррелирующие с концентрацией ионов марганца, и последовательности *Alpha*- и *Betaproteobacteria*, сопряженные с содержанием ионов железа (Земская и соавт., 2018). Согласно данным Н.Т. Торрес и соавт. (2014), Mn(IV) (и потенциально Fe(III)) могут действовать как окислители для микробиологически опосредованного процесса нитрификации. Действительно, в сообществах исследованного нами керна, ниже границы проникновения кислорода, наблюдалось увеличение вклада нитритоксилирующих бактерий филума *Nitrospirae*, а также присутствие архей филума *Thaumarchaeota*, обеспечивающих процессы окисления аммония до нитрита. Их участие в метаболизме азота было подтверждено при метагеномном анализе геномов (MAGs) из глубинной зоны Южного Байкала (Cabello-Jeves et al., 2020). В геномах микроорганизмов, в том числе принадлежащих этим таксонам, выявлены гены окисления аммония и нитрита, разложения мочевины и цианата или ассимиляции нитратов/нитритов, денитрификации. Представители филума *Firmicutes*, для культивируемых штаммов которых показано участие в окислении Fe(II) и Mn(II) в Байкале (Захарова и соавт., 2010), составляли незначительный процент в сообществе из верхнего слоя ЖМС и более значимый вклад в нижнем слое (7.6%). Среди них большая часть принадлежит родам *Bacillus* и *Clostridium*, идентичность которых культивируемым железо-марганцевым бактериям из озера Байкал не подтверждена. Изменения в структуре микробного сообщества при смене окисленных условий на восстановленные отмечены при исследовании микробных сообществ донных осадков в озере Штехлин и в пяти озерах Центральной Швейцарии (Wurzbacher et al., 2017; Han et al., 2020). Как полагают авторы, разнообразие сообществ в этих зонах определялось изменениями источников ОВ, реакциями дыхания и избирательным выживанием микроорганизмов. Поэтому таксоны, которые уже присутствовали в осадках во время седиментации, могут быть лучше приспособлены к выживанию в условиях низкой доступности источников энергии и должны доминировать с увеличением глубины отложений (Lever et al., 2015; Starnawski et al., 2017; Rissanen et al., 2019). Это согласуется с нашими данными по исследованию разнообразия микробных сообществ донных осадков Южного Байкала. Мы отмечали увеличение вклада представителей *Bacteroidetes*, *Alpha*-, *Betaproteobacteria* в микробное сообщество осадка, на глубине 8–9 см, минорное присутствие которых регистрировалось в поверхностном слое этого осадка. Согласно данным (Колман и соавт., 1993; Vologina et al., 2000) возраст осадка на этой глубине оценивается

в 100–500 лет, и вполне вероятно, что именно представители этих таксонов оказались более адаптированными к существованию в низкоэнергетических условиях. Культивируемые представители таксонов из этой зоны являются хемоорганотрофами, хемолитотрофами и факультативными фотогетеротрофами и встречаются в различных биотопах. Следует отметить разнообразное бактериальное сообщество и в более глубоких (до 4 м) слоях донных отложений озера Байкал (Zemskaya et al., 2015a; Черницына и соавт., 2016; Bukin et al., 2016; Lomakina et al., 2018).

Важной частью микробных сообществ в осадках озера Байкал являются археи. Их присутствие зафиксировано уже в первых сантиметрах окисленных осадков, и увеличение разнообразия в захороненных окисленных осадках и в слоях с повышенными концентрациями марганца и железа (Земская и соавт., 2018). Одним из доминирующих таксонов в осадках Байкала являются представители филума *Thaumarchaeota* (линии Marine Group I), широко распространенные в почвенных и водных экосистемах и участвующие в аэробном окислении аммония (Walker et al., 2010). В осадках из разных районов Байкала идентифицированы кластеры последовательностей родственные культивируемому виду *Nitrosopumilus maritimus* линии MGI и некультивируемым представителям данного филума (Lomakina et al., 2018). В осадках фоновых районов обнаружены представители филумов *Euryarchaeota* (Uncultured *Methanomicrobia*), *Bathyarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Woesearchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Hadesarchaeota* (ранее известные как SAGMEG-1). Выявлены также представители некультивируемой линии Marine Bentic Group D (MBG-D) порядка *Thermopfundales*, ранее относящиеся к *Thermoplasmatales* и широко распространенные в пресноводных и морских местах обитания (Schubert et al., 2011). Их большой вклад отмечался в сообществах метановых сипов (Beal et al., 2009), осадков из озера Павин (Borrel et al., 2012). Предполагается, что они могут осуществлять деструкцию белков в морских осадках, а также участвовать в процессах метаногенеза или анаэробного окисления метана (АОМ) (Schubert et al., 2011).

Иной состав архей наблюдался в осадочных толщах, приуроченных к зонам высачивания минерализованных газосодержащих флюидов. Поровые воды в таких местах характеризуются как гидрокарбонатно-сульфатные, сульфатные или хлоридные (Мизандронцев, 1975; Клеркс и соавт., 2003; Гранина 2008; Minami et al., 2010; Zemskaya et al., 2015a; Pogodaeva et al., 2020). На состав поровых вод значительное влияние оказывали интенсивность флюидопотоков и конкретный состав химических компонентов (Aloisi et al., 2019). Как оказалось, механизмы миграционных флюидопотоков в районах грязевых вулканов и метано-

вых сипов влияют также на состав и структуру микробных сообществ (Шубенкова и соавт., 2005; Kadnikov et al., 2012; Ломакина и соавт., 2014; Zemskaya et al., 2015a; Черницына и соавт., 2016; Bukin et al., 2016; Lomakina et al., 2018). В частности, в районе метанового сипа “Красный Яр” показано поступление насыщенных кислородом поверхностных осадков и аэробных микроорганизмов на глубину более 1 м, а в осадках сипа на поднятии Посольская Банка – поступление глубинной микрофлоры на поверхность осадка за счет функционирования “флюидной петли” (Nauds et al., 2012; Черницына и соавт., 2016; Pogodaeva et al., 2020). Особые пути миграции флюидных потоков, циркулирующих в зоне стабильности газовых гидратов (400 м) объясняют присутствие в значительных количествах последовательностей филумов *Chloroflexi* и *Acidobacteria*, филумов-кандидатов *Aminicenantes* и *Atribacteria* в поверхностных слоях донных отложений, а филума *Deinococcus–Thermus* в глубинных донных отложениях. В зонах с особо интенсивными потоками минерализованных флюидов и газов отмечено формирование микробных матов двух типов: с доминированием бесцветных серных бактерий (Кузнецов и соавт., 1991) или метанотрофных бактерий (Zemskaya et al., 2015b). Микробные сообщества, функционирование которых основано на метанотрофии, характерны для лесных почв, лугов, рисовых полей, водно-болотных угодий и донных отложений в пресных, соленых или щелочных озерах (Ding, Valentine, 2008). Наличие больших полей микробных матов было обнаружено над массивными слоями гидратов метана в батипелагиали Среднего Байкала с помощью ГОА “Мир”, где они обеспечивали жизнедеятельность широкого спектра бентосных животных (Zemskaya et al., 2012; Ситникова и соавт., 2017). Интенсивные потоки метана, образующегося как за счет растворения гидратов метана, так и за счет деятельности гидрогетеротрофных метаногенов, обеспечивали развитие в аэробном слое микробных матов метано- и метилотрофных бактерий (Kadnikov et al., 2012; Zemskaya et al., 2015b), которые потреблялись бентосными животными, что подтверждено результатами изотопного состава углерода бентосных животных из данного района (Zemskaya et al., 2012). В сообществе микробных матов выявлены представители родов *Methylobacter*, *Methylophilus*, *Methylotenera*, обитающие в различных холодноводных экосистемах (Dedysh et al., 2001; Pacheco-Oliver et al., 2002) и обладающие ферментными системами, обеспечивающими различные шаги окисления метана до CO₂ и биомассы. Под слоем матов, в поверхностных слоях осадка этого района доля археи составляла около 2/3 всего микробного сообщества (Kadnikov et al., 2012), включая анаэробных метанотрофов *Candidatus Methanoperedens* sp. (ANME-2d) и гидрогетеротрофных метаногенов рода *Methanosphaerula*. В

районе интенсивных минерализованных потоков в других районах Байкала также формировались микробные маты, где доминирующая роль принадлежит бесцветным серным бактериям, относящимся к роду *Thioploca* (Кузнецов и соавт., 1991; Земская и соавт., 2001). Аналогично морским представителям данного рода, обитающие в Байкале серные бактерии, осуществляют процесс окисления сульфидов за счет редукции нитратов и являются хемоорганогетеротрофами (Земская и соавт., 2001). Функционирование сообщества бактериальных матов в этом районе, как и в районах морских метановых сипов, обеспечивается за счет хемосинтеза и метанотрофии (Намсараев, Земская, 2000; Ding, Valentine, 2008).

МИКРООРГАНИЗМЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ПРОЦЕССЕ МЕТАНГЕНЕРАЦИИ

Ранее было показано, что основным конечным продуктом деструкции органического вещества в донных отложениях Байкала является метан (Намсараев, Земская, 2000; Дагурова и соавт., 2004), а процессы его биогенного образования могут распространяться на сотни метров вглубь осадочной толщи озера (Кузьмин и соавт., 2001). В зонах разгрузок углеводородов, илах низкотемпературного вента Фролиха и отложениях ряда районов с повышенным содержанием органического вещества, генерировалось 5.0–534.7 мкл $\text{CH}_4/\text{кг}$ в сутки, что соответствует скоростям метангенерации в других олиготрофных и мезотрофных пресноводных озерах (Duc et al., 2010; Fuchs et al., 2016; Yang et al., 2020), однако интенсивность метаногенеза в фоновых районах пелагической зоны озера была ниже (0.01–32.29 мкл $\text{CH}_4/\text{кг}$ в сутки) и сопоставима с таковой в осадках высокопродуктивных районов океана и соленых меромиктических озер Ширы и Шунет (Carone, Kiene, 1988; Каллистова и соавт., 2006). Как и во многих других пресноводных озерах, из-за низких концентраций SO_4^{2-} в поровых водах, верхняя граница зоны метангенерации в осадках Байкала определяется только глубиной проникновения O_2 (Намсараев, Земская, 2000; Koizumi et al., 2003; Conrad et al., 2007). Так, в районах сипов, грязевых вулканов и подводного низкотемпературного источника зафиксировано активное образование метана уже в первом сантиметре восстановленных с поверхности донных отложений (Намсараев, Земская, 2000; Дагурова и соавт., 2004), а метан и этан, поступающие с глубинным флюидом и связанные в структуре газовых гидратов, имели биогенное, термогенное или смешанное биогенно-термогенное происхождение (Клеркс и соавт., 2003; Калмычков и соавт., 2006). Паттерн вертикального распределения метангенерации в таких районах различался, но зачастую повышенные значения

скоростей метаногенеза фиксировались в поверхностных илах до глубин 20–30 см, с последующим всплесками активности в отдельных глубинных слоях (Намсараев, Земская, 2000; Дагурова и соавт., 2004). Исследования, проведенные в зонах, не подверженных влиянию разгрузок углеводородов, показали почти линейное увеличение содержания метана в осадках до глубин 2–2.5 м, что коррелировало с содержанием гидрокарбонат-иона, высвобождающегося в ходе диагенеза органического вещества (Pogodaeva et al., 2017). Однако в ряде случаев, от 2.5 м и до самых нижних вскрытых слоев, при переходе к серо-голубым глинам отмечалось резкое возрастание концентраций метана и скоростей его образования, что также подтверждает наличие активных метаногенных сообществ в глубинах осадочной толщи озера Байкал (Намсараев, Земская, 2000).

Как известно, метаногенные археи способны использовать в качестве источников углерода и энергии весьма ограниченный спектр субстратов, образующихся на первых этапах анаэробной деструкции органического вещества. Среди них выделяют H_2 : CO_2 , ацетат, C_1 -метилированные соединения (метанол, метиламины, метилсульфиды и др.), которые потребляются гидрогенотрофными, ацетокластическими и метилотрофными метаногенами соответственно (Thauer et al., 2008). В донных отложениях глубоководных зон стратифицированных озер зачастую отмечается увеличение вклада ацетокластического метаногенеза, что обусловлено деятельностью гомоацетогенных микроорганизмов (Schulz, Conrad, 1996; Nozhevnikova et al., 2007). В психрофильных условиях гомоацетогены способны эффективно конкурировать с гидрогенотрофными метаногенами за H_2 , осуществляя редукцию CO_2 до ацетата, который накапливается в осадке и далее диспропорционируется до метана ацетокластическими метаногенами (Kotsyurbenko et al., 2005). Однако в озере Байкал доминирование ацетокластического метаногенеза установлено только в осадках мелководных районов, тогда как в донных отложениях глубоководной зоны 75–100% метана образовывалось из H_2 : CO_2 , а концентрация ацетата варьировала от 4 до 98 мкмоль/л (Намсараев, Земская, 2000). Высокий вклад гидрогенотрофного метаногенеза (99%) был отмечен даже в районе низкотемпературного вента Фролиха, где содержание ацетата в поровых водах может достигать 1 ммоль/л, а среди архей выявлена большая доля (25%) ацетокластических метаногенов (Lomakina et al., 2018). Точная причина данного феномена не выяснена. Концентрации H_2 в составе газа осадочной толщи озера Байкал не превышает 0.0632 об. % (Кузьмин и соавт., 2001), а температура донных отложений в глубоководной части озера ($\leq 4^\circ\text{C}$) делает термодинамически не выгодным синтрофное окисление ацетата, что

не позволяет объяснить доминирование гидрогенотрофного пути дополнительным подтоком водорода или утилизацией ацетата в обход ацетокластического метаногенеза, как в озерах Киву и Кинерет (Nulsslein et al., 2001; Pasche et al., 2011). Возможно, высокий вклад CO_2 -редукции может быть обусловлен ее большей термодинамической выгодностью в условиях осадочной толщи пелагической зоны, в сравнении с ацетокластическим метаногенезом, в совокупности с наличием в сообществах пула активных психротолерантных гидрогенотрофных метаногенов и потребляющих ацетат сульфатредуцирующих бактерий (Букин и соавт., 2018). Следует отметить, что преимущественное образование метана в ходе CO_2 -редукции происходит также в осадках холодноводных антарктических (Wand et al., 2006) и альпийских озер (Mandic-Mulec et al., 2012), озер Тибетского нагорья (Liu et al., 2017).

Кроме H_2 : CO_2 важную роль в процессах образования метана в донных отложениях озера Байкал могут играть и метилированные субстраты. При культивировании природного осадка из поверхностного слоя на среде с метанолом в анаэробных условиях наблюдалось активное образование метана из метанола при участии метилотрофных архей семейства *Methanosarcinaceae* (Букин и соавт., 2018).

С применением методов иммунофлуоресцентного окрашивания (Намсараев, Земская, 2000), культивирования (Павлова и соавт., 2014; Букин и соавт., 2018) и секвенирования генов 16S рРНК и *mcrA* (Шубенкова и соавт., 2005; Kadnikov et al., 2012; Ломакина и соавт., 2014; Черницына и соавт., 2016; Lomakina et al., 2018) установлено, что в осадках озера присутствуют археи, способные образовывать метан по всем четырем известным катаболическим путям: гидрогенотрофному (*Methanoregulaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanocellaceae*, *Methanocaldococcaceae*, Ca. "Methanoflorentaceae"), ацетокластическому (*Methanosaetaceae*), метилотрофному (*Methanosarcinaceae*) и водород-зависимому метилотрофному (*Methanomassiliicoccales*, *Methanomethylaceae*, *Methanofastidiosaceae*). По данным метабаркодинговых исследований, наибольшая доля выявляемых метаногенных микроорганизмов в осадках Байкала относится к гидрогенотрофным представителям семейства *Methanoregulaceae* (р. *Methanoregula*, р. *Methanospharula* и некультивируемые), водород-зависимым метилотрофным археям порядка *Methanomassiliicoccales* и ацетокластическим метаногенам семейства *Methanosaetaceae* (р. *Methanothrix* (*Methanosaeta*)), составляющих ядро метаногенных сообществ в донных отложениях пресноводных озер по всему миру, вне зависимости от их лимнологических и гидрохимических свойств (Wen et al., 2017). В Байкале представители дан-

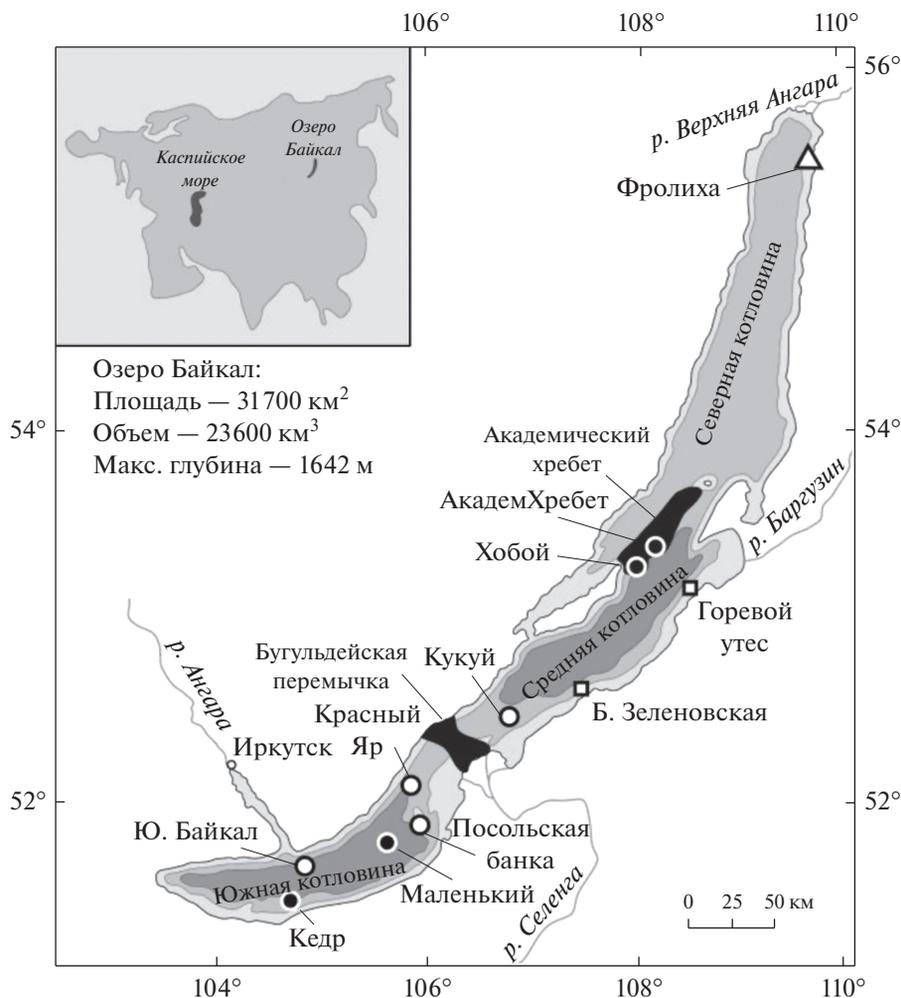
ных таксонов обнаруживаются как в зонах метановых сипов и грязевых вулканов (Zemskaya et al., 2010; Kadnikov et al., 2012; Черницына и соавт., 2016; Lomakina et al., 2018), так и в осадках фоновых районов (Земская и соавт., 2018; Zakharova et al., 2018). Большая доля архей семейств *Methanoregulaceae* и *Methanosaetaceae* может быть связана с их высокой конкурентоспособностью в условиях существования при низких концентрациях субстратов, а также способностью создавать устойчивые синтрофные ассоциации при разложении летучих жирных кислот (Borrel et al., 2011). Микроорганизмы порядка *Methanomassiliicoccales* (*Thermoplasmata*), выявляемые в Байкале как в сообществах поверхностных, так и глубинных слоев, нацелены на утилизацию широкого спектра метилированных субстратов, включая метанол, метиламины и метилсульфиды, концентрации которых в пресноводных экосистемах ранее считались незначительными (Congrad, Claus, 2005). Обычно метилотрофные метаногены обнаруживаются в пищеварительном тракте насекомых и животных, гиперсоленых водоемах, где основными метилированными субстратами для них являются метиламины, образующиеся в результате разложения осмопротекторов, выделяемых галофильными протеобактериями (Liu, Whitman, 2008). В осадках пресноводных экосистем основным субстратом для них может служить метанол, образующийся при деструкции пектина и лигноцеллюлозы, входящих в состав клеточных стенок водорослей и растений (Sollinger, Urich, 2019). Однако, несмотря на обширное присутствие молекулярных маркеров представителей данного семейства в сообществах донных отложений Байкала, они не были выявлены в составе метаногенных накопительных культур при культивировании на среде с метанолом (Букин и соавт., 2018). Одной из причин может служить несоответствие условий культивирования, и другой – возможное использование "байкальскими" *Methanomassiliicoccales* не метанола, а других C_1 -метилированных соединений. Их наличие в верхних слоях осадков в зонах разгрузок в Байкале может обеспечиваться миграцией этих соединений из глубинных осадков с потоками глубинных высокоминерализованных флюидов. Это согласуется с изотопными характеристиками растворенного биогенного метана ($\delta^{13}\text{C}_1 \approx -41.0 \dots -67.3\text{‰}$, $\delta\text{DC}_1 = -311 \dots -300\text{‰}$), которые характерны для этого газа, образованного преимущественно по пути восстановления метильных групп (Калмычков и соавт., 2006; Nachikubo et al., 2010). Учитывая низкие скорости ацетокластического метаногенеза в глубоководной зоне озера, образование метана с использованием метильных групп C_1 -метилированных соединений вполне вероятно.

МИКРООРГАНИЗМЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В АНАЭРОБНОМ ОКИСЛЕНИИ МЕТАНА

Наиболее очевидное различие между биогеохимическими процессами в местах высачиваний минерализованных газосодержащих флюидов в Байкале от процессов в океанических областях заключается в содержании сульфат-иона. В поровых водах большинства исследованных нами районов концентрация сульфат-ионов была недостаточной для осуществления сульфатзависимого АОМ (Пименов и соавт., 2014). Исключительными в этом отношении являются районы высачиваний сульфатных и сульфидсодержащих глубинных флюидов – Кукуйский каньон и грязевой вулкан “Маленький”, где содержание сульфат-иона достигало 15 мМ. Процесс сульфатредукции регистрировался в осадках разных районов озера Байкал непосредственно под слоем окисленных отложений, но его роль в процессах деструкции ОВ была вторичной (Намсараев, Земская, 2000; Пименов и соавт., 2014), что подтверждалось сравнением интегральных скоростей метаноокисления и сульфатредукции. Несмотря на незначительные концентрации сульфат-иона (от 0.05 до 0.16 мМ) в большинстве донных отложений на озере Байкал, анализ профилей концентраций метана свидетельствовал о протекании процесса АОМ. Сравнение интегральных скоростей аэробного и анаэробного окисления метана в отложениях озера Байкал, показало, что их значения сопоставимы по величине, а в некоторых районах (метанового сипа “Посольская Банка”, нефтяного сипа “Горевой Утес” и грязевого вулкана “Большой”) АОМ было значительно выше скорости окисления метана (МО) в аэробной зоне. Однако типичных для морских осадков метанооксиляющих архей кластеров ANME-1, 2 и 3 в исследованных осадках не выявлено (Zemskaya et al., 2010; Черницына и соавт., 2016; Lomakina et al., 2018). Было высказано предположение о возможности осуществления АОМ в осадках озера Байкал представителями других таксонов, в частности, археями подкластера ANME-2d и бактериями NC10 (Raghoebarsing et al., 2006; Haroon et al., 2013). Представители ANME-2d изначально обнаруживались вместе с представителями кандидатного бактериального филума NC10 – *Ca. Methyloirabilis oyufera* в накопительных культурах, полученных из пресноводных осадков (Raghoebarsing et al., 2006). Эти уникальные бактерии считаются первыми анаэробными метанотрофами, которые способны производить кислород внутриклеточно из нитрита и использовать его для активации метана, аналогично аэробным метанотрофам (Ettwig et al., 2010). Представители архей подкластера ANME-2d и бактерий филума NC10 широко распространены в пресноводных экосистемах, почвах, рисовых полях, очистных сооружениях (Raghoebarsing et al., 2006; Haroon et al., 2013; Fu et al., 2016; Welte et al.,

2016; Timmers et al., 2017). Ранее их участие в процессе АОМ также было экспериментально подтверждено при культивировании пресноводных осадков (озер Чоаху, Тайху, Китай), лагун повторного использования воды (Luggage Point, Brisbane, Australia) на среде, обогащенной нитрат- и нитрит-ионами (Hu et al., 2009; Ettwig et al., 2010; Haroon et al., 2013). Протекание процесса АОМ по нитратзависимому пути в осадках Южного Байкала было подтверждено нами при культивировании природного микробного сообщества из грязевого вулкана “Песчанка” на среде с добавлением нитрат-ионов (Ломакина и соавт., 2018). В экспериментальных образцах отмечалась убыль метана и формирование консорциумов микроорганизмов, в составе которых с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации со специфичными зондами детектированы представители бактерий филума NC10 и археи подкластера ANME-2d. Проведенный филогенетический анализ библиотек генов 16S рРНК показал сходство байкальских архей подкластера ANME-2d с последовательностями из пресноводных осадков альпийского озера, осадков озера Монун, биореакторов, где также зафиксированы процессы АОМ. Еще одним участником процесса АОМ в осадках озера Байкал являются представители филума NC10. Последовательности этого филума выявлены в микробных сообществах всех исследованных нами осадков, включая грязевые вулканы “Маленький” и “Кедр”, метановые сипы “Посольская Банка” и “Красный Яр”. Филогенетически представители этого таксона не были полностью идентичными, они группировались в 4 OTUs и имели сходство с последовательностями из осадков озер Констанс и Бива, а также с *Ca. Methyloirabilis* sp. из накопительных культур, осуществляющих нитритзависимое АОМ. Известно, что в цепи трофических взаимодействий с участием нитрат- и нитритзависимых микроорганизмов, осуществляющих АОМ, могут вовлекаться ANAMMOX-бактерии, аэробные аммоний- и нитрит-окисляющие бактерии (Welte et al., 2016). В результате синтрофного взаимодействия при наличии аммония в среде и ANAMMOX-бактерий или бактерий филума NC10 и нитрита, образованного в процессе нитратзависимого АОМ, последний восстанавливается до газообразного азота (Zhu et al., 2010; Haroon et al., 2013).

Следует заметить, что механизм АОМ и количество его участников в осадках озера Байкал до конца не выяснен. Ведь даже в районах разгрузки минерализованных флюидов содержание нитрат-ионов в поровых водах не превышало 0.0096 мМ, а нитрит-ионы не детектировались использованными методами (Zemskaya et al., 2015a; Pogodaeva et al., 2020). Можно предположить, что недостаток концентраций нитрат-ионов восполняется деятельностью аммоний-окисляющих архей филума *Thaumarchaeota*, способных окислять аммо-



ний до нитрата (Zhu et al., 2010). Действительно, представители этого филума в осадках озера Байкал составляли значительную долю (до 26%) в глубинных осадках районов разгрузок газосодержащих флюидов и до 100% в глубинных осадках нефтяного сипа “Горевой Утес” (Kadnikov et al., 2012; Черницына и соавт., 2016; Lomakina et al., 2018). Возможность участия микроорганизмов в процессах нитрат- и нитритзависимого АОМ в осадках озера Байкал подтверждено наличием в суммарной ДНК маркерных генов – *mcrA* для подкластера архей ANME-2d и *pmoA* для филума NC10. Аминокислотные последовательности гена *mcrA* из разных районов озера Байкал были идентичны последовательностям *Ca. Methanopore-redens* sp. из осадков очистных сооружений и био-реакторов, а аминокислотные последовательности гена *pmoA* – некультивируемым представителям NC10 из осадков озер Бива, Констанс, денитрифицирующих резервуаров.

Нельзя исключить в качестве еще одного возможного участника процессов цикла метана в осадках озера Байкал – представителей филума *Bathyarchaeota*. Недавно проведенные метагеномные исследования двух геномов филума *Bathyarchaeota* (ранее Miscellaneous Crenarchaeota Group) показали наличие генов, которые кодируют комплекс метил-кофермент М-редуктаза (MCR), в том числе гена *mcrA* (Evans et al., 2015). Авторы не исключают участие *Bathyarchaeota* не только в процессе метангенерации, а также в процессе АОМ по механизму обратного метаногенеза. Каков метаболизм архей этого филума в природе, в том числе и осадках Байкала, еще предстоит определить. По результатам высокопроизводительного секвенирования, представители этого филума в осадках Байкала составляли от 28 до 76% от всех проанализированных последовательностей 16S рРНК архей в районах грязевых вулканов и метановых сипов. Кроме того, ферменты метил-редуцирующего метаногенеза обна-

ружены у представителей филума *Verstraetearchaeota*, что указывает на их участие в метаболизме метана (Vanwonterghem et al., 2016). Последовательности *Verstraetearchaeota*, у которых обнаружены гены *mcrA*, были выделены из мезофильного метаногенного реактора и осадков пресноводного озера Павин (Франция). Однако в осадках озера Байкал последовательности данного филума являются минорными компонентами исследованных микробных сообществ.

В публикациях (Och et al., 2012; Torres et al., 2014; Aloisi et al., 2019) рассматривалось участие оксидов Mn(IV) и Fe(III) в процессе АОМ, приводящего к образованию HCO_3^- в осадках озера Байкал. Повышенные концентрации ионов железа в поровых водах при недостаточных для протекающего АОМ значениях SO_4^{2-} и NO_3^- отмечались в поверхностных осадках (первые сантиметры) в разных районах озера Байкал (Granina et al., 2004; Och et al., 2012; Zemskaya et al., 2015a). Ранее протекание этого процесса отмечено в осадках озера Эрн, где в зонах с низким содержанием нитратов и сульфатов, и при наличии ионов Fe, детектированы представители ANME-2d (Norgi et al., 2013; Weber et al., 2017). Микроорганизмы, осуществляющие данный процесс достоверно не установлены, хотя в процессе железозависимого АОМ предполагается и участие представителей ANME-2d (Cai et al., 2018). Поэтому, в настоящее время представители подкластера ANME-2d рассматриваются как универсальные анаэробные метанотрофы, которые используют различные ионы в качестве акцепторов электронов для АОМ и, тем самым, играют важную роль в эмиссии метана (Shen et al., 2019).

В океанических осадках холодных сипов отмечаются повышенные потоки HCO_3^- , образующиеся в результате сульфатзависимого АОМ и приводящие к повсеместному осаждению аутигенных карбонатов в виде конкреций в осадках и карбонатных корок (Bohrmann et al., 1998; Luff et al., 2004; Aloisi et al., 2019). В отличие от морских экосистем, районы формирования аутигенных карбонатов встречаются не по всему Байкалу, а имеют локальное расположение. В этих районах обнаруживаются небольшие по размерам (до 0.5 см) включения аутигенного сидерита и родохрозита (Мизандронцев, 1975; Гранина, 2008; Klylov et al., 2018), что может быть следствием низкой концентрации ионов HCO_3^- в таких зонах. Отсутствие аутигенных карбонатов на большей площади отложений предполагает, что скорости этих процессов недостаточны высоки, чтобы значительно сместить равновесие растворенного неорганического углерода в пользу осаждения карбонатных минералов. Наконец, ограниченное выпадение карбонатных минералов в отложениях

холодных сипов на Байкале также связано с концентрацией растворенного кальция, содержание которого в 20 раз ниже, чем в океане. Для формирования аутигенных карбонатов необходимы повышенные величины карбонатной щелочности в поровых водах/флюидах и наличие процессов АОМ или метангенерации. В байкальских осадках, где присутствовали аутигенные карбонаты, действительно отмечалось увеличение щелочности. Концентрации гидрокарбонат-ионов в поровой воде составляли более 8.19 мМ, что значительно выше значений, отмечаемых в осадках фоновых районов (1.09 мМ) (Zemskaya et al., 2015a; Pogodaeva et al., 2017). Анализ библиотек генов 16S рРНК карбонатсодержащих осадков, показал присутствие последовательностей архей подкластера ANME-2d и представителей других филумов. Так, в сообществах архей из олигонита ($\text{Fe}(\text{Mn}, \text{Zn})(\text{CO}_3)_2$), отобранного из осадков грязевого вулкана “Маленький”, доминировали *Euryarchaeota* (до 99%), среди которых 20% составляли последовательности подкластера ANME-2d и 73% порядка *Thermoplasmatales* (Lomakina et al., 2018). В районе, где карбонат идентифицирован как сидерит (FeCO_3), доминировали последовательности *Bathyarchaeota* (от 33 до 76.6%), доля представителей подкластера ANME-2d была около 16% (Lomakina et al., 2020). Следует также отметить в бактериальных сообществах из этих же образцов высокий процент представителей бактериальных филумов *Chloroflexi* и *Atribacteria*, являющихся типичными представителями морских карбонатных осадков (Yanagawa et al., 2019). Очевидно, что данные о таксономическом составе сообществ не позволяют расшифровать механизм образования карбонатов в осадках озера Байкал, но могут быть использованы для планирования дальнейших исследований в этом направлении.

МИКРООРГАНИЗМЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ОКИСЛЕНИИ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ

В число уникальных характеристик озера Байкал входит не только его возраст, глубины и высокое разнообразие биоты озера, а также природные выходы нефти. Кроме оз. Байкал, данным феноменом характеризуются рифтовое глубоководное озеро Танганьика и мелководное озеро Чапала (Simoneit et al., 2000; Zarate-del Valle et al., 2006). На оз. Байкал известны два района естественных нефтепроявлений: один расположен в устье р. Большая Зеленая (БЗ) и известен с конца XVIII века; второй – у м. Горовой Утес (ГУ) (открыт в 2005 г.). В 2005 г. нефть в районе ГУ характеризовалась экстремально высоким содержанием *n*-алканов и была идентифицирована как небiodeградированная парафинистая нефть, в районе БЗ – как биодеградированная ароматико-

нафтенная нефть (Конторович и соавт., 2007). Микробиологические исследования района нефтепроявлений в районе устья БЗ были начаты в 80-е гг. XX в. С.Д. Талиевым и соавт. (1985). В воде и донных осадках изучено распределение углеводородоокисляющих микроорганизмов, способных усваивать углеводороды солярового масла, метановой нефти и индивидуальные углеводороды C_3H_8 , C_4H_{10} , C_5H_{12} , C_9H_{20} (Петрова, Мамонтова, 1985; Талиев и соавт., 1985).

Открытие в 2005 г. нового района естественно-го выхода углеводородов позволило в режиме онлайн следить за явлениями, происходящими в данной акватории, и *in situ* наблюдать за качественными и количественными изменениями в составе нефти, структуре микробных сообществ и их адаптационными возможностями. В первые годы исследований отмечалось увеличение численности углеводородоокисляющих микроорганизмов (УВОМ) как в водной толще, так и в донных отложениях. В зоне нефтяных slickов, образующихся на поверхности водной толщи, количество культивируемых УВОМ в 12 раз превышало значения в воде фоновых районов. Наблюдения за численностью культивируемых микроорганизмов, окисляющих нефть и *n*-алканы в донных осадках ГУ, в течение 15 лет показали ее увеличение в первые два года (2005–2007 гг.) до 250 ± 27 тыс. КОЕ/г) и последующее уменьшение к 2017–2019 гг. до 90 ± 1 тыс. КОЕ/г (Павлова и соавт., 2020). Увеличение количества углеводородоокисляющих бактерий после техногенного разлива нефти отмечается во многих исследованиях (King et al., 2015). Так, через месяц после аварии нефтяной платформы Deepwater Horizon, общая численность микроорганизмов в глубоководном нефтяном шлейфе в Мексиканском заливе составляла $5.51 \pm 0.33 \times 10^4$ кл./мл, вне его – $2.73 \pm 0.33 \times 10^4$ кл./мл (Hazen et al., 2010). Высокие показатели численности культивируемых УВОМ (до 170 ± 13 тыс. КОЕ/г) зарегистрированы в битумных постройках, обнаруженных в районе ГУ с помощью ГОА “Мир” в 2008 г. Они формируются из парафиновых нефтяных битумов и населены большим количеством разнообразных бентосных животных. Основой их пищевой цепи являются микроорганизмы, осуществляющие аэробное и анаэробное окисление углеводородов (Zemskaya et al., 2012; Kadnikov et al., 2013; Ситникова и соавт., 2017). Микробное сообщество битумных построек на 80% состояло из представителей филума *Proteobacteria*, среди которых около 40% принадлежат некультивируемым представителям *Alpha*- и *Beta**proteobacteria*. Археи представлены типичными ацетокластическими и гидрогенотрофными метаногенами порядков *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* и *Methanobacteriales* (Kadnikov et al., 2013).

Анализ структуры микробных сообществ в донных осадках из районов нефтепроявлений ГУ и БЗ с помощью высокопроизводительного секвенирования выявил доминирование представителей тех же филумов – *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* и *Proteobacteria*, что и в районах со спокойным осадко-накоплением (Земская и соавт., 2018). Состав бактериальных сообществ в донных осадках БЗ и ГУ совпадал на уровне крупных таксонов, за исключением представителей филума *Actinobacteria*, которые более разнообразно представлены в осадках ГУ (Zemskaya et al., 2015a). Среди *Proteobacteria* доминировали представители классов *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- и *Deltaproteobacteria*, присутствие которых характерно для метаногенных углеводородоокисляющих сообществ, включая метаногенные нефтяные хвосты, загрязненные углеводородами водные экосистемы и донные осадки (Johnson et al., 2015).

Наиболее очевидные различия наблюдались в составе архейных сообществ. В сообществах осадков ГУ доминировали представители *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota*, что характерно для байкальских осадков районов метановых сипов и грязевых вулканов. В окисленных слоях осадка БЗ среди архей выявлены представители *Crenarchaeota* (47%) и *Thaumarchaeota* (53%), в восстановленных – последовательности филумов *Euryarchaeota* (52%), *Thaumarchaeota* (26%), *Bathyarchaeota* (20%) и *Crenarchaeota* (2%). Филум *Euryarchaeota* представлен гидрогенотрофными археями порядка *Methanomicrobiales* и ацетокластическими метаногенами порядка *Methanosarcinales*, а также последовательностями подкластера ANME-2d (Lomakina et al., 2018). Более высокое разнообразие архей в осадках района БЗ, скорее всего, обусловлено достаточно длительным периодом их существования в среде с нефтью, служащей дополнительным источником углерода. Это было показано ранее для морских экосистем, где хроническое загрязнение нефтью приводило к более высокому разнообразию микроорганизмов в результате индуцированной устойчивости, вызванной длительным воздействием углеводородов (Jeanbille et al., 2016). Следует отметить, что представители филумов *Bathyarchaeota* и *Crenarchaeota* присутствовали только в сообществах района БЗ, где нефть глубоко биodeградирована. Предполагается, что представители филума *Bathyarchaeota* могут быть вовлечены в процесс АОМ (Evans et al., 2015) и деградацию ароматических соединений (Jeanbille et al., 2016). Филум *Crenarchaeota* в донных осадках района нефтепроявления БЗ был представлен некультивируемыми представителями порядка *Desulfurococcales*, класс *Thermoprotei*. В автотрофных условиях эти микроорганизмы получают энергию путем окисления водорода с использованием элементарной серы, тиосульфата, нитрата или нитрита в качестве акцептора электронов и используют CO_2

в качестве источника углерода (Huber, Stetter, 2006). Доминирование представителей филумов *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota* в донных осадках нефтепроявления ГУ может быть обусловлено не только более разнообразным составом нефти, в которой присутствуют *n*-алканы, алкилциклогексаны, изопреноиды, ПАУ и другие соединения, но и присутствием метана. Показано, что представители метаногенных архей семейств *Methanomicrobiaceae*, *Methanosarcinaceae*, *Ca. Methanofastidiosa* и порядка *Thermoplasmatales* способны не только к генерации метана и его анаэробному окислению, но и к деградации нефти в нефтезагрязненных почвах (Miettinen et al., 2019). В биодegradации нефти также могут участвовать и представители филума *Thaumarchaeota*, у которых предполагается гетеротрофный тип метаболизма с использованием соединений, полученных из сырой нефти (Mussmann et al., 2011).

Мониторинговые исследования состава байкальской нефти в районе нефтепроявления у м. Горовой Утес в течение 15 лет свидетельствуют о ее биодegradации (Gorshkov et al., 2020). Очевидно, что в водной толще, насыщенной кислородом, и в поверхностных донных осадках с высоким содержанием O_2 доминируют аэробные процессы окисления углеводородов нефти. Исследования микроорганизмов, участвующих в деградации нефти в анаэробной зоне осадочной толщи озера Байкал, пока находятся на начальном этапе. Получены первые экспериментальные данные о способности микробных сообществ из донных осадков ГУ в анаэробных условиях деградировать углеводороды нефти в присутствии различных акцепторов электронов. В поверхностных осадках конверсия *n*-алканов наиболее интенсивно протекала в накопительных культурах, на среде, обогащенной сульфат-ионом, в глубинных – гидрокарбонат-ионом. В глубинных осадках микробное сообщество более ориентировано на анаэробное окисление полициклических ароматических углеводородов, о чем свидетельствует высокая степень их биодegradации (до 46%), вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. Анализ клональных библиотек генов 16S рРНК бактерий и архей в накопительных культурах показал идентичность (97–99%) полученных последовательностей некультивируемым микроорганизмам из термофильных местообитаний, осадков грязевых вулканов и загрязненных углеводородами сред. В библиотеках генов 16S рРНК бактерий доминировали представители филумов *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Caldiserica* (OP5), классов *Delta*- и *Epsilonproteobacteria* (Pavlova et al., 2020). Филогенетическое разнообразие анаэробных микроорганизмов, участвующих в биодegradации нефти, сходно по составу микроорганизмам, входящих в “ядро микробиома” нефтяных резервуаров, где наиболее представлены три класса бактерий

(*Gammaproteobacteria*, *Clostridia* и *Bacteroidia*) и архей класса *Methanomicrobia*. Функционирование сообществ в нефтяных коллекторах обеспечивается синтрофным взаимодействием этих микроорганизмов (Sierra-Garcia et al., 2017; Pannekens et al., 2019). Мы не исключаем наличие синтрофных взаимоотношений для микробных сообществ донных осадков озера Байкал, поскольку во всех экспериментальных образцах развивались микроорганизмы, осуществляющие взаимозависимые последовательные реакции в общем метаболическом процессе.

Способность деградировать углеводороды закреплена в геномах байкальских микроорганизмов (Ломакина и соавт., 2014; Likhoshvay et al., 2014). Анализ нуклеотидных последовательностей *alk*-генов, кодирующих алкан-1-монооксигеназу, показал, что у большинства культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов (76%), выделенных из водной толщи и донных осадков в районах естественных выходов нефти в оз. Байкал, содержатся *alkB*-гены, идентичные в большинстве случаев *alkB*-генам, обнаруженным ранее у *Rhodococcus erythropolis* (Ломакина и соавт., 2014). Наличие *alk*-генов подтверждено метагеномным анализом геномов микроорганизмов, обитающих в батипелагиали Южного Байкала (Caballo-Yeves et al., 2020). Особенно активным деструктором *n*-алканов оказался штамм *Rhodococcus erythropolis* № 4–08, изолированный из битумной постройки оз. Байкал, в геноме которого показано четыре типа *alkB*-генов, кодирующих алкан-1-монооксигеназу (Likhoshvay et al., 2013, 2014). Скорость роста *Rhodococcus erythropolis* увеличивалась в 2–16 раз при культивировании на среде с добавлением стимулятора роста, что делает его перспективным для биотехнологических целей (Павлова и соавт., 2019; Pavlova et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осадки озера Байкал населены микроорганизмами с различным метаболизмом, обеспечивающим их участие в деструкции широкого спектра субстратов, включая фотосинтезированное ОВ, газообразные и нефтяные углеводороды. Наиболее значимые изменения в структуре сообществ и смена доминирующих таксонов микроорганизмов наблюдались в осадках с выраженным градиентом физико-химических параметров, но и в этих экотопах выявлены таксоны бактерий и архей, характерные для пресноводных экосистем (Newton et al., 2011). Низкая минерализация среды, доступность источников углерода и энергии обеспечивают развитие микроорганизмов, участвующих как в образовании метана, так и его анаэробном окислении по метаболическим путям, характерным для микроорганизмов пресноводных экосистем. Разнообразие микробных сообществ в

осадках озера Байкал перекрывается на уровне филумов и демонстрирует возрастающее несходство микроорганизмов ниже уровня класса и рода. В этом плане очевидна необходимость более широкого метагеномного анализа геномов и исследование метаболизма уникальных видов микроорганизмов, в том числе поступающих из глубинной зоны донных отложений озера Байкал. Древний возраст озера Байкал, мощная осадочная толща и наличие метана разного генезиса, в том числе в форме газовых гидратов, служат основанием для продолжения исследований роли микроорганизмов, участвующих в цикле этого парникового газа, особенно в период глобальных изменений климата.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0279-2021-0006 “Изучение функционирования гидратных, нефтяных и газообразных углеводородных систем...” и гранта РФФИ № 1804-00-244.

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

- Букин С.В., Павлова О.Н., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Погодаева Т.В., Галачьянц Ю.П., Букин Ю.С., Хабуев А.В., Земская Т.И. Субстратная специфичность метаногенных сообществ из донных отложений оз. Байкал, ассоциированных с разгрузками углеводородных газов // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 409–420.
- Bukin S.V., Pavlova O.N., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Galachyants Yu.P., Bukin Yu.S., Khabuev A.V., Zemskaya T.I. Substrate specificity of methanogenic communities from Lake Baikal bottom sediments associated with hydrocarbon gas discharge // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 549–558.
- Вологина Е.Г., Штурм М. Потоки осадочного вещества в Южном Байкале: результаты экспериментов с седиментационными ловушками // Геология и геофизика. 2017. Т. 58. С. 1314–1323.
- Vologina E.G., Sturm M. Particulate fluxes in South Baikal: evidence from sediment trap experiments // Russ. Geol. Geophys. 2017. V. 58. P. 1045–1052.
- Вотинцев К.К., Мещерякова А.И., Поповская Г.И. Круговорот органического вещества в озере Байкал. Новосибирск: Наука, 1975. 189 с.
- Выхристюк Л.А. Органическое вещество донных осадков Байкала // Труды ЛИИ СО АН СССР. Новосибирск: Наука, 1980. Т. 32. С. 80.
- Гвоздков А.Н. Геохимия современных донных осадков озера Байкал. Автореферат дис. ... канд. геол.-минер. наук, 07.10.1998. Иркутск: Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН, 1998. 28 с.
- Гранина Л.З. Ранний диагенез донных осадков озера Байкал. Новосибирск: ГЕО, 2008. 160 с.
- Дагурова О.П., Намсараев Б.Б., Козырева Л.П., Земская Т.И., Дулов Л.Е. Бактериальные процессы цикла метана в донных осадках озера Байкал // Микробиология. 2004. Т. 74. С. 248–257.
- Dagurova O.P., Namsaraev B.B., Kozyreva L.P., Zemskaya T.I., Dulov L.E. Bacterial processes of the methane cycle in bottom sediments of Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2004. V. 74. P. 202–210.
- Заварзин Г.А. Становление системы биогеохимических циклов // Палеонтол. журн. 2003. Т. 37. № 6. С. 16–24.
- Zavarzin G.A. Formation of the system of biogeochemical cycles // Paleontol. J. 2003. V. 37. P. 576–583.
- Захарова Ю.Р., Парфенова В.В., Гранина Л.З., Кравченко О.С., Земская Т.И. Распределение культивируемых железом и марганецоксилирующих бактерий в донных осадках озера Байкал // Биология внутренних вод. 2010. № 4. С. 22–30.
- Zakharova Y.R., Parfenova V.V., Granina L.Z., Kravchenko O.S., Zemskaya T.I. Distribution of iron- and manganese-oxidizing bacteria in the bottom sediments of Lake Baikal // Inland Water Biol. 2010. V. 3. P. 313–321.
- Земская Т.И., Намсараев Б.Б., Дульцева Н.М., Ханаева Т.А., Голобокова Л.П., Дубинина Г.А., Дулов Л.Е., Вада Э. Экофизиологические особенности матообразующей бактерии *Thioploca* в донных осадках бухты Фролиха, Северный Байкал // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 391–397.
- Zemskaya T.I., Namsaraev B.B., Dul'tseva N.M., Khanaeva T.A., Golobokova L.P., Dubinina G.A., Dulov L.E., Wada E. Ecophysiological characteristics of the mat-forming bacterium *Thioploca* in bottom sediments of the Frolikha Bay, Northern Baikal // Microbiology (Moscow). 2001. V. 70. P. 335–341.
- Земская Т.И., Ломакина А.В., Мамаева Е.В., Захаренко А.С., Лихошвай А.В., Галачьянц Ю.П., Миллер Б. Состав микробных сообществ в осадках южного Байкала, содержащих Fe/Mn конкреции // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 291–302.
- Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Zakharenko A.S., Likhoshvai A.V., Galachyants Yu.P., Miller B. Composition of microbial communities in sediments from southern Baikal containing Fe/Mn concretions // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 382–392.
- Каллистова А.Ю., Кевбрина М.В., Пименов Н.В., Русанов И.И., Рогозин Д.Ю., Верли Б., Ножевникова А.Н. Сульфатредукция и метаногенез в меромиктических озерах Ширы и Шунет (Хакасия) // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 828–835.
- Kallistova A.Y., Kevbrina M.V., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Rogozin D.Y., Wehrli B., Nozhevnikova A.N. Sulfate reduction and methanogenesis in the Shira and Shunet meromictic lakes (Khakasia, Russia) // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 720–726.
- Калмычков Г.В., Егоров А.В., Кузьмин М.И., Хлыстов О.М. Генетические типы метана озера Байкал // Докл. АН. 2006. Т. 411. № 5. С. 672–675.

- Kalmychkov G.V., Egorov A.V., Kuz'min M.I., Khlystov O.M.* Genetic types of methane from Lake Baikal // *Dokl. Earth Sci.* 2006. V. 411. P. 1462–1465.
- Клеркс Я., Земская Т.И., Матвеева Т.В., Хлыстов О.М., Намсараев Б.Б., Дагурова О.П., Голобокова Л.П., Воробьева С.С., Погодаева Т.П., Гранин Н.Г., Калмычков Г.В., Пономарчук В.А., Шоджи Х., Мазуренко Л.Л., Каулио В.В., Соловьев В.А., Грачев М.А.* Гидраты метана в поверхностном слое глубоководных осадков озера Байкал // *Докл. АН.* 2003. Т. 393. № 6. С. 822–826.
- Klerkx J., Zemskaya T.I., Matveeva T.V., Khlystov O.M., Namsaraev B.B., Dagurova O.P., Golobokova L.P., Vorobyeva S.S., Pogodaeva T.P., Granin N.G., Kalmychkov G.V., Ponomarchuk V.A., Shoji H., Mazurenko L.L., Kaulio V.V., Soloviev V.A., Grachev M.A.* Methane hydrates in surface layer of deep-water sediments in Lake Baikal // *Dokl. Earth Sci.* 2003. V. 393. P. 822–826.
- Колман С.М., Купцов В.М., Джойнс Г.А., Картер С.Д.* Радиоуглеродное датирование байкальских осадков // *Геология и геофизика.* 1993. Т. 34. № 10–11. С. 68–77.
- Конторович А.Э., Каширцев В.А., Москвин В.И., Бурштейн Л.М., Земская Т.И., Калмычков Г.В., Костырева Е.А., Хлыстов О.М.* Нефтегазосность отложений оз. Байкал // *Геология и геофизика.* 2007. Т. 48. С. 1346–1356.
- Kontorovich A.E., Kashirtsev V.A., Moskvina V.I., Burshtein L.M., Zemskaya T.I., Kostyreva E.A., Kalmychkov G.V., Khlystov O.M.* Petroleum potential of Baikal deposits // *Russ. Geol. Geophys.* 2007. V. 12. P. 1046–1053.
- Кузнецов С.И.* Микрофлора озер и ее геохимическая деятельность. Л.: Наука, 1970. 440 с.
- Кузнецов А.П., Стрижов В.П., Кузин В.С., Фиалков В.А., Ястребов В.С.* Новое в природе Байкала. Сообщество, основанное на бактериальном хемосинтезе // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1991. № 5. С. 766–772.
- Кузьмин М.И., Карабанов Е.Б., Каваи Т., Вильямс Д., Бычинский В.А., Кербер Е.В., Кравчинский В.А., Безрукова Е.В., Прокопенко А.А., Гелетий В.Ф., Калмычков Г.В., Горегляд А.В., Антипин В.С., Хомутова М.Ю., Сошина Н.М., Иванов Е.В., Хурсевич Г.К., Ткаченко Л.Л., Солотчина Е.П., Йошида Н., Гвоздков А.Н.* Глубоководное бурение на Байкале – основные результаты // *Геология и геофизика.* 2001. Т. 42. С. 8–34.
- Логачев Н.А.* История и геодинамика Байкальского рифта // *Геология и геофизика.* 2003. Т. 44. С. 391–406.
- Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Морозов И.В., Земская Т.И.* Микробные сообщества зоны разгрузки газонефтеосодержащих флюидов ультрапресного озера Байкал // *Микробиология.* 2014. Т. 83. С. 355–365.
- Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Morozov I.V., Zemskaya T.I.* Microbial communities of the discharge zone of oil- and gas-bearing fluids in low-mineral Lake Baikal // *Microbiology (Moscow).* 2014. V. 83. P. 278–287.
- Ломакина А.В., Мамаева Е.В., Погодаева Т.В., Калмычков Г.В., Хальзов И.А., Земская Т.И.* Окисление метана в анаэробных условиях при культивировании накопительных культур из глубинных осадков района грязевого вулкана Песчанка (Южный Байкал) // *Микробиология.* 2018. Т. 87. С. 242–251.
- Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Pogodaeva T.V., Kalmychkov G.V., Khalzov I.A., Zemskaya T.I.* Anaerobic methane oxidation in enrichment cultures from deep sediments of a mud volcano Peschanka (South Baikal) // *Microbiology (Moscow).* 2018. V. 87. P. 317–325.
- Максимова Э.А., Максимов В.Н.* Микробиология вод Байкала. Иркутск: Иркут. ун-т, 1989. 168 с.
- Мац В.Д., Уфимцев Г.Ф., Мандельбаум М.М., Алакишин А.М., Поспеев А.В., Шимараев М.Н., Хлыстов О.М.* Кайнозой Байкальской рифтовой впадины: строение и геологическая история. Новосибирск: Гео, 2001. 252 с.
- Мизандронцев И.Б.* К геохимии грунтовых растворов // *Труды ЛИН СО АН СССР.* 1975. Т. 21. № 41. С. 203–230.
- Мизандронцев И.Б.* Осадкообразование // *Труды ЛИН СО АН СССР.* 1978. Т. 16. № 36. С. 33–46.
- Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ /* Под ред. Дрюккера В.В. Новосибирск: Наука, 1985. 115 с.
- Микробиологическое наследие XX века /* Под ред. Виноградовой Т.П. Иркутск: Изд-во Ин-та географии СО РАН, 2004. 93 с.
- Намсараев Б.Б., Земская Т.И.* Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал. Новосибирск: Гео, 2000. 160 с.
- Павлова О.Н., Букин С.В., Ломакина А.В., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Морозов И.В., Погодаева Т.В., Пименов Н.В., Земская Т.И.* Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков оз. Байкал // *Микробиология.* 2014. Т. 83. С. 694–702.
- Pavlova O.N., Bukin S.V., Lomakina A.V., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Morozov I.V., Pogodaeva T.V., Pimenov N.V., Zemskaya T.I.* Production of gaseous hydrocarbons by microbial communities of Lake Baikal bottom sediments // *Microbiology (Moscow).* 2014. V. 83. P. 798–804.
- Павлова О.Н., Адамович С.Н., Мирскова А.Н., Земская Т.И.* Стимулятор роста клеток углеводородокисляющих бактерий *Rhodococcus erythropolis* (варианты). Патент РФ № 2694593. 2019.
- Павлова О.Н., Изосимова О.Н., Горшков А.Г., Новикова А.С., Букин С.В., Иванов В.Г., Хлыстов О.М., Земская Т.И.* Современное состояние глубоководного выхода нефти у мыса Горевого Утес (Средний Байкал) // *Геология и геофизика.* 2020. Т. 61. С. 1231–1240.
- Pavlova O.N., Izosimova O.N., Gorshkov A.G., Novikova A.S., Bukin S.V., Ivanov V.G., Khlystov O.M., Zemskaya T.I.* Current state of deep oil seepage near cape Gorevoi Utes (Central Baikal) // *Russ. Geol. Geophys.* 2020. V. 61. P. 1007–1014.
- Петрова В.И., Мамонтова Л.М.* Изменение численности бактерий в экспериментах с добавками нефти // *Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ.* Новосибирск, 1985. С. 144–150.
- Пименов Н.В., Захарова Е.Е., Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П., Погодаева Т.В., Калмычков Г.В., Земская Т.И.* Активность и структура сообщества сульфат-редуцирующих бактерий в осадках южной котловины оз. Байкал // *Микробиология.* 2014. Т. 83. С. 180–190.
- Pimenov N.V., Zakharova E.E., Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Kuznetsov B.B., Tourova T.P., Pogodaeva T.V., Kalmychkov G.V., Zemskaya T.I.* Activity and structure of the sulfate-reducing bacterial community in the sediments of the southern part of Lake Baikal // *Microbiology (Moscow).* 2014. V. 83. P. 47–55.

- Погодаева Т.В., Земская Т.И., Голобокова Л.П., Хлыстов О.М., Минами Х., Сакагами Х. Особенности химического состава поровых вод донных отложений различных районов озера Байкал // Геология и геофизика. 2007. Т. 48. С. 1144–1160.
- Ситникова Т.Я., Сиделева В.Г., Кияшко С.И., Земская Т.И., Механикова И.В., Хлыстов О.М., Хальзов И.А. Сравнительный анализ сообществ макробеспозвоночных и рыб, ассоциированных с метановым и нефте-метановым сипами в абиссали оз. Байкал // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. С. 373–386.
- Талиев С.Д., Кожова О.М., Моложавая О.А. Углеводородокисляющие микроорганизмы в биосеннозах некоторых районах Байкала // Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ. Новосибирск, 1985. С. 64–74.
- Черницына С.М., Мамаева Е.В., Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Галачъянц Ю.П., Букин С.В., Пименов Н.В., Хлыстов О.М., Земская Т.И. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ в донных отложениях Посольской банки, оз. Байкал // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 652–662.
- Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Galach'yants Yu.P., Bukin S.V., Pimenov N.V., Khlystov O.M., Zemskaya T.I. Phylogenetic diversity of microbial communities of the Posolsk Bank bottom sediments, Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 672–680.
- Шубенкова О.В., Земская Т.И., Черницына С.М., Хлыстов О.М., Трибой Т.И. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 370–377.
- Shubenkova O.V., Zemskaya T.I., Chernitsyna S.M., Khlystov O.M., Tribol T.I. The first results of an investigation into the phylogenetic diversity of microorganisms in southern Baikal sediments in the region of subsurface discharge of methane hydrates // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 314–320.
- Aloisi G., Pogodaeva T.V., Poort J., Khabuev A.V., Kazakov A.V., Akhmanov G.G., Khlystov O.M. Biogeochemical processes at the Krasniy Yar seepage area (Lake Baikal) and a comparison with oceanic seeps // Geo-Mar. Lett. 2019. V. 39. P. 59–75.
- Beal E.J., House C.H., Orphan V.J. Manganese and iron-dependent marine methane oxidation // Science. 2009. V. 325. P. 184–187.
- Bohrmann G., Greinert J., Suess E., Torres M. Authigenic carbonates from the Cascadia subduction zone and their relation to gas hydrate stability // Geology. 1998. V. 26. P. 647.
- Borrel G., Jézéquel D., Biderre-Petit C., Morel-Desrosiers N., Morel J.-P., Peyret P., Fonty G., Lehours A.-C. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems // Res. Microbiol. 2011. V. 162. P. 832–847.
- Borrel G., Lehours A.C., Crouzet O., Jézéquel D., Rockne K., Kulczak A., Duffaud E., Joblin K., Fonty G. Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: vertical shift from methanogenic to uncultured archaeal lineages // PLoS One. 2012. V. 7. e43346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043346>
- Bukin S.V., Pavlova O.N., Manakov A.Y., Kostreva E.A., Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Pogodaeva T.V., Zemskaya T.I. The ability of microbial community of Lake Baikal bottom sediments associated with gas discharge to carry out the transformation of organic matter under thermobaric conditions // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 690.
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Zakharenko A.S., Sankirko M.V., Ivanov V.G., Ghai R., Rodriguez-Valera F. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat // Limnol. Oceanogr. 2020. V. 65. P. 1471–1488.
- Cai C., Leu A.O., Xie G.J., Guo J., Feng Y., Zhao J.X., Tyson G.W., Yuan Z., Hu S. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction // ISME J. 2018. V. 12. P. 1929–1939.
- Capone D.G., Kiene R.P. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments: Contrasts in anaerobic carbon catabolism // Limnol. Oceanogr. 1988. V. 33. P. 725–749.
- Conrad R., Claus P. Contribution of methanol to the production of methane and its ¹³C-isotopic signature in anoxic rice field soil // Biogeochem. 2005. V. 73. P. 381–393.
- Conrad R., Chan O.-C., Claus P., Casper P. Characterization of methanogenic Archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany) // Limnol. Oceanogr. 2007. V. 52. P. 1393–1406.
- Dedysh S.N., Derakshani M., Liesack W. Detection and enumeration of methanotrophs in acidic Sphagnum peat by 16S rRNA fluorescence in situ hybridization, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris* // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4850–4857.
- Ding H., Valentine D. Methanotrophic bacteria occupy benthic microbial mats in shallow marine hydrocarbon seeps, Coal Oil Point, California // J. Geophys. Res. 2008. V. 113. G-1. <https://doi.org/10.1029/2007jg000537>
- Duc N.T., Crill P., Bastviken D. Implications of temperature and sediment characteristics on methane formation and oxidation in lake sediments // Biogeochem. 2010. V. 100. P. 185–196.
- Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M., Schreiber F., Dutilh B.E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H.J., van Alen T., Luessen F., Wu M.L., van de Pas-Schoonen K.T., Op den Camp H.J., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.J., Stunnenberg H., Weissenbach J., Jetten M.S., Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // Nature. 2010. V. 464. P. 543–548.
- Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W. Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics // Science. 2015. V. 350. P. 434–438.
- Fu L., Li S.W., Ding Z.W., Ding J., Lu Y.Z., Zeng R.J. Iron reduction in the DAMO/*Shewanella oneidensis* MR-1 coculture system and the fate of Fe(II) // Water Res. 2016. V. 88. P. 808–815.

- Fuchs A., Lyautey E., Montuelle B., Casper P.* Effects of increasing temperatures on methane concentrations and methanogenesis during experimental incubation of sediments from oligotrophic and mesotrophic lakes // *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 2016. V. 121. P. 1394–1406.
- Gorshkov A.G., Pavlova O.N., Khlystov O.M., Zemskaya T.I.* Fractioning of petroleum hydrocarbons from seeped oil as a factor of purity preservation of water in Lake Baikal (Russia) // *J. Great Lakes Res.* 2020. V. 46. P. 115–122.
- Granina L., Muller B., Wehrli B.* Origin and dynamics of Fe and Mn sedimentary layers in Lake Baikal // *Chem. Geol.* 2004. V. 205. P. 55–72.
- Hachikubo A., Khlystov O., Krylov A., Sakagami H., Minami H., Nunokawa Y., Yamashita S., Takahashi N., Shoji H., Nishio S., Kida M., Ebinuma T., Kalmychkov G., Poort J.* Molecular and isotopic characteristics of gas hydrate-bound hydrocarbons in southern and central Lake Baikal // *Geo-Mar. Lett.* 2010. V. 30. P. 321–329.
- Han X., Schubert C.J., Fiskal A., Dubois N., Lever M.A.* Eutrophication as a driver of microbial community structure in lake sediments // *Environ. Microbiol.* 2020. V. 22. P. 3446–3462.
- Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W.* Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // *Nature.* 2013. V. 500. P. 567–570.
- Hazen T.C., Dubinsky E.A., DeSantis T.Z., Andersen G.L., Piceno Y.M., Singh N., Jansson J.K., Probst A., Borglin S.E., Fortney J.L., Stringfellow W.T., Bill M., Conrad M.E., Tom L.M., Chavarria K.L., Alusi T.R., Lamendella R., Joyner D.C., Spierer C., Baelum J., Auer M., Zemla M.L., Chakraborty R., Sonnenthal E.L., D'haeseleer P., Holman H.-Y.N., Osman S., Lu Z., Van Nostrand J.D., Deng Y., Zhou J., Mason O.U.* Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria // *Science.* 2010. V. 330. P. 204–208.
- Hu S., Zeng R.J., Burow L.C., Lant P., Keller J., Yuan Z.* Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms // *Environ. Microbiol. Rep.* 2009. V. 1. P. 377–384.
- Huang W., Chen X., Wang K., Chen J., Zheng B., Jiang X.* Comparison among the microbial communities in the lake, lake wetland, and estuary sediments of a plain river network // *Microbiol. Open.* 2019. V. 8. e644. <https://doi.org/10.1002/mbo3.644>
- Huber H., Stetter K.O.* *Desulfurococcales* // *The Prokaryotes* / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. New York: Springer, 2006. P. 52–68.
- Hutchinson D.R., Golmshtok A.J., Zonenshain L.P., Moore T.C., Scholz C.A., Klitgord K.D.* Depositional and tectonic framework of the rift basins of Lake Baikal from multichannel seismic data // *Geology.* 1992. V. 20. C. 589–592.
- Jeanbille M., Gury J., Duran R., Tronczynski J.K., Ghiglione J.-F., Agogue H., Said O.B., Taib N., Debroas D., Garnier C., Auguet J.-C.* Chronic polyaromatic hydrocarbon (PAH) contamination is a marginal driver for community diversity and prokaryotic predicted functioning in coastal sediments // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 1303.
- Johnson J.M., Wawrik B., Isom C., Boling W.B., Callaghan A.V.* Interrogation of Chesapeake Bay sediment microbial communities for intrinsic alkane-utilizing potential under anaerobic conditions // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2015. V. 91. № 2. P. 1–14.
- Kadnikov V.V., Mardanov A., Beletsky A.V., Shubenkova O.V., Pogodaeva T.N., Zemskaya T.I., Ravin N.V., Skryabin K.G.* Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2012. V. 79. № 1. C. 348–358.
- Kadnikov V.V., Lomakina A.V., Likhoshvai A.V., Gorshkov A.G., Pogodaeva T.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Zemskaya T.I., Ravin N.V.* Composition of the microbial communities of bituminous constructions at natural oil seeps at the bottom of Lake Baikal // *Microbiology (Moscow).* 2013. V. 82. P. 373–382.
- King G.M., Kostka J.E., Hazen T.C., Sobecky P.A.* Microbial responses to the Deepwater Horizon Oil Spill: from Coastal Wetlands to the deep sea // *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2015. V. 7. P. 377–401.
- Koizumi Y., Takii S., Nishino M., Nakajima T.* Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003. V. 44. Art. 101e108.
- Kotsyurbenko O.R.* Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 53. P. 3–13.
- Krylov A.A., Hachikubo A., Minami H., Pogodaeva T.V., Zemskaya T.I., Krzhizhanovskaya M.G., Poort J., Khlystov O.M.* Authigenic rhodochrosite from a gas hydrate-bearing structure in Lake Baikal // *Int. J. Earth Sci.* 2018. V. 107. P. 2011–2022.
- Lever M.A., Rogers K.L., Lloyd K.G., Overmann J., Schink B., Thauer R.K., Jørgensen B.B.* Life under extreme energy limitation: a synthesis of laboratory- and field-based investigations // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. V. 39. P. 688–728.
- Likhoshvai A., Khanaeva T., Gorshkov A., Zemskaya T., Grachev M.* Do oil-degrading Rhodococci contribute to the genesis of deep water bitumen mounds in Lake Baikal? // *Geomicrobiol. J.* 2013. V. 30. P. 209–213.
- Likhoshvai A., Lomakina A., Grachev M.* The complete *alk* sequences of *Rhodococcus erythropolis* from Lake Baikal // *Springer Plus.* 2014. V. 3. Art. 621.
- Liu Y., Whitman W.B.* Metabolic, phylogenetic and ecological diversity of the methanogenic *Archaea* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1125. P. 171–189.
- Liu Y., Conrad R., Yao T., Gleixner G., Claus P.* Change of methane production pathway with sediment depth in a lake on the Tibetan plateau // *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2017. V. 474. P. 279–286.
- Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Galachyants Y.P., Petrova D.P., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V., Khabuev A.V., Morozov I.V., Zemskaya T.I.* Diversity of *Archaea* in bottom sediments of the discharge areas with oil- and gas-bearing fluids in Lake Baikal // *Geomicrobiol. J.* 2018. V. 35. P. 50–63.
- Lomakina A., Pogodaeva T., Kalmychkov G., Chernitsyna S., Zemskaya T.* Diversity of NC10 bacteria and ANME-2d Ar-

- chaeta in sediments of fault zones at Lake Baikal // *Diversity-Basel*. 2020. V. 12.
<https://doi.org/10.3390/d12010010>
- Luff R., Wallmann K., Aloisi G. Numerical modeling of carbonate crust formation at cold vent sites: significance for fluid and methane budgets and chemosynthetic biological communities // *Earth Planet. Sci. Lett.* 2004. V. 221. P. 337–353.
- Mandic-Mulec I., Gorenc K., Petrišič M.G., Faganeli J., Ogrič N. Methanogenesis pathways in a stratified eutrophic alpine lake (Lake Bled, Slovenia) // *Limnol. Oceanogr.* 2012. V. 57. P. 868–880.
- Miettinen H., Bomberg M., Nyysönen M., Reunamo A., Jørgensen K.S., Vikman M. Oil degradation potential of microbial communities in water and sediment of Baltic Sea coastal area // *PloS One*. 2019. V. 17. e0218834.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218834>
- Minami H., Pogodaeva T., Sakagami H., Hachikubo A., Krylov A., Harada D., Saito C., Tatsumi K., Hyakutake K., Yamashita S., Nishio S., Takahashi N., Shoji H., Khlystov O., Zemskaya T., Grachev M., Naudts L., Poort J. Traces of original gas hydrate-forming fluid observed in subsurface gas hydrates retrieved from Lake Baikal, Russia // 10th Int. Conf. on Gas in Marine Sediments. Listvyanka, Russia. 2010. P. 129.
- Musmann M., Brito I., Pitcher A., Sinninghe Damste J.S., Hatzenpichler R., Richter A., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Muller A., Daims H., Wagner M., Head I.M. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express *amoA* but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 16771–16776.
- Nagata T., Takai K., Kawanobe K., Kim D.-S., Nakazato R., Guselnikova N., Bondarenko N., Mologaway O., Kostornova T., Drucker V., Satoh Y., Watanabe Y. Autotrophic picoplankton in southern Lake Baikal: abundance, growth and grazing mortality during summer // *J. Plankton Res.* 1994. V. 16. P. 945–959.
- Newton R.J., Jones S.E., Eiler A., McMahon K.D., Bertilsson S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. R.* 2001. V. 75. P. 14–49.
- Norgi K.A., Thamdrup B., Schubert C.J. Anaerobic oxidation of methane in an iron-rich Danish freshwater lake sediment // *Limnol. Oceanogr.* 2013. V. 58. P. 546–554.
- Nozhevnikova A.N., Nekrasova V., Ammann A., Zehnder A.J.B., Wehrli B., Holliger C. Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in lake sediment slurries // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. V. 62. P. 336–344.
- Och L.M., Muller B., Voegelin A., Ulrich A., Göttlicher J., Steiniger R., Mangold S., Vologina E., Sturm M. New insight into the formation and burial of Fe/Mn accumulations in Lake Baikal sediments // *Chem. Geol.* 2012. V. 330–331. P. 244–259.
- Pacheco-Oliver M., McDonald I., Groleau D., Murrell J.C., Miguez C. Detection of methanotrophs with highly divergent *pmoA* genes from Arctic soils // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. V. 209. P. 313–319.
- Pannekens M., Kroll L., Müller H., Mbow F.T., Meckenstock R.U. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms // *New Biotechnol.* 2019. V. 49. P. 1–9.
- Pasche N., Schmid M., Vazquez F., Schubert C. J., Wüest A., Kessler J. D., Pack M.A., Reeburgh W.S., Bürgmann H. Methane sources and sinks in Lake Kivu // *J. Geophys. Res.* 2011. V. 116. G03006.
- Pavlova O.N., Adamovich S.N., Novikova A.S., Gorshkov A.G., Izosimova O.N., Ushakov I.A., Oborina E.N., Mirskova A.N., Zemskaya T.I. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from Lake Baikal, Russia // *Biotechnol. Rep.* 2019. V. 24. e00371.
- Pavlova O.N., Izosimova O.N., Chernitsyna S.M., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Gorchkov A.G. Process of anaerobic oxidation of oil in bottom sediments of Lake Baikal // *Limnol. Freshwater Biol.* 2020. № 3. P. 1006–1007.
- Pogodaeva T.V., Lopatina I.N., Khlystov O.M., Egorov A.V., Zemskaya T.I. Background composition of pore waters in Lake Baikal bottom sediments // *J. Great Lake Res.* 2017. V. 43. P. 1030–1043.
- Pogodaeva T.V., Poort J., Aloisi G., Bataillard L., Makarov M.M., Khabuev A.V., Kazakov A.V., Chensky A.G., Khlystov O.M. Fluid migrations at the Krasny Yar methane seep of Lake Baikal according to geochemical data // *J. Great Lakes Res.* 2020. V. 46. P. 123–131.
- Pujalte M.J., Lucena T., Ruvira M.A., Arahal D.R., Macian M.C. The family *Rhodobacteraceae* // *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2014. P. 439–512.
- Qiu L., Williams D.F., Gvozdkov A., Karabanov E., Shimaraeva M. Biogenic silica accumulation and paleoproductivity in the northern basin of Lake Baikal during the Holocene // *Geology*. 1993. V. 21. P. 25–28.
- Raghoebarsing A.A., Pol A., van de Pas-Schoonen K.T., Smolders A.J., Ertwig K.F., Rijpstra W.I., Schouten S., Damsté J.S.S., Op den Camp J.M., Jetten M.S., Strous M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification // *Nature*. 2006. V. 440. P. 918–921.
- Rissanen A.J., Peura S., Mänttä P.A., Taipale S., Tiirola M., Biasi C., Mäki A., Nykanen H. Vertical stratification of bacteria and archaea in sediments of a small boreal humic lake // *FEMS Microbiol. Lett.* 2019. V. 366. № 5. fnz044.
- Schubert C.J., Vazquez F., Losekann-Behrens T., Knittel K., Tonolla M., Boetius A. Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno) // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011. V. 76. P. 26–38.
- Schulz S., Conrad R. Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1996. V. 20. P. 1–14.
- Shen L., Ouyang L., Zhu Y., Trimmer M. Active pathways of anaerobic methane oxidation across contrasting riverbeds // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 752–766.
- Sierra-Garcia I.N., Dellagnezze B.M., Santos V.P., Chaves M.R., Capilla R., Neto S., Gray N., Oliveira V.M. Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and

- comparison across oil reservoirs at local and global scales // *Extremophiles*. 2017. V. 21. P. 211–229.
- Simoneit B.R.T., Aboul-Kassim T.A.T., Tiercelin J.J.* Hydrothermal petroleum from lacustrine sedimentary organic matter in the East African Rift // *Appl. Geochem.* 2000. V. 15. P. 355–368.
- Söllinger A., Urich T.* Methylophilic methanogens everywhere – physiology and ecology of novel players in global methane cycling // *Biochem. Soc. Trans.* 2019. V. 47. P. 1895–1907.
- Spang A., Poehlein A., Offre P., Zumbragel S., Haider S., Rychlik N., Nowka B., Schmeisser C., Lebedeva E.V., Rattei T., Böhm C., Schmid M., Galushko A., Hatzenpichler R., Weinmaier T., Daniel R., Schleper C., Spieck E., Streit W., Wagner M.* The genome of the ammonia-oxidizing *Candidatus Nitrososphaera gargensis*: Insights into metabolic versatility and environmental adaptations // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. P. 3122–3145.
- Starnawski P., Bataillon T., Ettema T.J.G., Jochum L.M., Schreiber L., Chen X., Lever M.A., Polz M.F., Jørgensen B.B., Schramm A., Kjeldsen K.U.* Microbial community assembly and evolution in subseafloor sediment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 2940–2945.
- Sun L.W., Toyonaga M., Ohashi A., Tourlousse D.M., Matsura N., Meng X.Y., Tamaki H., Hanada S., Cruz R., Yamaguchi T., Sekiguchi Y.* *Lentimicrobium saccharophilum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium representing a new family in the phylum *Bacteroidetes*, and proposal of *Lentimicrobiaceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 2635–2642.
- Thauer R.K., Kaster A.K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R.* Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 579–591.
- Timmers P.H., Welte C.U., Koehorst J.J., Plugge C.M., Jetten M.S., Stams A.J.* Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea // *Archaea*. 2017. V. 2017. 1654237.
- Torres N.T., Och L.M., Hauser P.C., Furrer G., Brandl H., Vologina E., Sturm M., Bürgmann H., Müller B.* Early diagenetic processes generate iron and manganese oxide layers in the sediments of Lake Baikal, Siberia // *Environ. Sci.* 2014. V. 16. P. 879–889.
- Vanwonterghem I., Evans P.N., Parks D.H., Jensen P.D., Woodcroft B.J., Hugenholtz P., Tyson G.W.* Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verrucomicrobiota* // *Nature Microbiol.* 2016. V. 1. P. 16170.
- Vologina E.G., Sturm M., Vorobyova S.S., Granina L.Z.* New results of high-resolution studies of surface sediments of Lake Baikal // *Terra Nostra*. 2000. № 9. P. 115–131.
- Walker C.B., de la Torre J.R., Klotz M.G., Urakawa H., Pinnel N., Arp D.J., Brochier-Armanet C., Chain P.S., Chan P.P., Gollabgir A., Hemp J., Hugler M., Karr E.A., Konneke M., Shin M., Lawton T.J., Lowe T., Martens-Habbena W., Sayavedra-Soto L.A., Lang D., Sievert S.M., Rosenzweig A.C., Manning G., Stahl D.A.* *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 8818–8823.
- Wand U., Samarkin V.A., Nitzsche H.-M., Hubberten H.-W.* Biogeochemistry of methane in the permanently ice-covered Lake Untersee, central Dronning Maud Land, East Antarctica // *Limnol. Oceanogr.* 2006. V. 51. P. 1180–1194.
- Weber H.S., Habicht K.S., Thamdrup B.* Anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-2d cluster are active in a low-sulfate, iron-rich freshwater sediment // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 619.
- Welte C.U., Rasigraf O., Vaksmaa A., Versantvoort W., Arshad A., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Lüke C., Reimann J.* Nitrate- and nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane // *Environ. Microbiol. Rep.* 2016. V. 8. P. 941.
- Wen X., Yang S.Z., Horn F., Winkel M., Wagner D., Liebner S.* Global biogeographic analysis of methanogenic Archaea identifies community-shaping environmental factors of natural environments // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 1339.
- Wurzbacher C., Nilsson R.H., Rautio M., Peura S.* Poorly known microbial taxa dominate the microbiome of permafrost thaw ponds // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 1938–1941.
- Yanagawa K., Shiraishi F., Tanigawa Y., Maeda T., Mustapha N.A., Owari S., Tomaru H., Matsumoto R., Kano A.* Endolithic microbial habitats hosted in carbonate nodules currently forming within sediment at a high methane flux Site in the Sea of Japan // *Geosciences*. 2019. V. 9. P. 463.
- Yang Y., Chen J., Tong T., Xie S., Liu Y.* Influences of eutrophication on methanogenesis pathways and methanogenic microbial community structures in freshwater lakes // *Environ. Pollut.* 2020. V. 260. Art. 114106.
- Yoon J., Matsuo Y., Katsuta A., Jang J.H., Matsuda S., Adachi K., Kasai H., Yokota A.* *Haloferula rosea* gen. nov., sp. nov., *Haloferula harenae*, sp. nov., *Haloferula phyci* sp. nov., *Haloferula helveola* sp. nov. and *Haloferula sargassicola* sp. nov., five marine representatives of the family *Verrucomicrobiaceae* within the phylum “*Verrucomicrobia*” // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 2491–2500.
- Zakharova Y.R., Petrova D.P., Galachyants Y.P., Bashenkhaeva M.Y., Kurilkina M.I., Likhoshway Y.V.* Bacterial and archaeal community structure in the surface diatom sediments of deep freshwater Lake Baikal (Eastern Siberia) // *Geomicrobiol. J.* 2018. V. 35. P. 635–647.
- Zarate-del Valle P.F., Rushdi A.I., Simoneit B.R.T.* Hydrothermal petroleum of Lake Chapala, Citala Rift, western Mexico: Bitumen compositions from source sediments and application of hydrous pyrolysis // *Appl. Geochem.* 2006. V. 21. P. 701–712.
- Zemskaya T.I., Sitnikova T.Y., Kiyashko S.I., Kalmychkov G.V., Pogodaeva T.V., Mekhanikova I.V., Naumova T.V., Shubenkova O.V., Chernitsina S.M., Kotsar O.V., Chernyaev E.S., Khlystov O.M.* Faunal communities at sites of gas- and oil-bearing fluids in Lake Baikal // *Geo-Mar. Lett.* 2012. V. 32. P. 437–451.
- Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Zakharenko A.S., Pogodaeva T.V., Petrova D.P., Galachyants Yu.P.* Bacterial communities in sediments of Lake Baikal from ar-

eas with oil and gas discharge // *Aquat. Microbiol. Ecol.* 2015a. V. 75. P. 95–109.

Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Shubenkova O.V., Pogodaeva T.V., Morozov I.V., Chernitsina S.M., Sitnikova T.Ya., Khlystov O.M., Egorov A.V. Jelly-like microbial mats over subsurface fields of gas hydrates at the St. Petersburg meth-

ane Seep (Central Baikal) // *Geomicrobiol. J.* 2015b. V. 32. P. 89–100.

Zhu G., Jetten M.S.M., Kuschik P., Ettwig K.F., Yin C. Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. P. 1043–1055.

Bottom Sediment Microorganisms of Lake Baikal, the Deepest and Oldest Lake in the World

T. I. Zemskaya¹*, S. V. Bukin¹, A. V. Lomakina¹, and O. N. Pavlova¹

¹*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

*e-mail: tzema@lin.irk.ru

Received December 9, 2020; revised December 24, 2020; accepted December 25, 2020

Abstract—The review summarizes the results of recent studies of microbial communities of the Lake Baikal bottom sediments obtained using diverse techniques. In the sediments of the areas of stable sedimentation metabarcoding revealed predominance of members of the phyla *Alpha-* and *Gammaproteobacteria* (including *Betaproteobacteriales*), *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, and *Thaumarchaeota*, which are also common in other freshwater lakes. In the areas of discharge of gas-bearing mineralized fluids, the structure of microbial communities varied depending on the presence of electron acceptors and intensity and component composition of gas-bearing fluids responsible for microbial migration from the deep zone to the upper sediment layers and vice versa. Methanogenic archaea detected in Baikal sediments belonged to the groups capable of all four known catabolic pathways of methanogenesis: hydrogenotrophic, acetoclastic, methylotrophic, and hydrogen-dependent methylotrophic ones. Predominant members of the Baikal archaeal community, hydrogenotrophic methanogens of the family *Methanoregulaceae* (genera *Methanoregula* and *Methanosphaerula*, as well as uncultured lineages), hydrogen-dependent methylotrophic archaea of the order *Methanomassiliicoccales*, and acetoclastic methanogens of the family *Methanosaetaceae* (genus *Methanothrix* (*Methanosaeta*)), were the same as in methanogenic communities of other freshwater lakes. Experimental evidence was obtained for anaerobic methane oxidation (AOM) via the nitrate- and nitrite-dependent pathways by archaea of the ANME-2d subcluster and bacteria of the phylum NC10. Structures of the 16S rRNA genes, *mcrA*, and *pmoA* exhibited high identity to those of the known freshwater organisms performing this process. Diversity of microbial communities at the sites of natural oil seepage differed at the order and family levels, as well as by the presence of alkane hydroxylases in the genes of the cultured species.

Keywords: Lake Baikal, bottom sediments, microorganisms, diversity, functional genes, formation and oxidation of methane and oil

МЕТАНОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АЭРОБНЫХ МЕТАНОТРОФОВ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ОСАДКАХ МОРЯ ЛАПТЕВЫХ

© 2021 г. Е. Н. Тихонова^{а, *}, В. В. Кадников^б, И. И. Русанов^а, А. В. Белецкий^б, Е. Е. Захарова^а,
О. С. Самылина^а, Н. В. Равин^б, Н. В. Пименов^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^бИнститут биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: katerina_inmi@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2021 г.

После доработки 22.01.2021 г.

Принята к публикации 23.01.2021 г.

Исследованы интенсивность процесса окисления метана и разнообразие метанооксиляющих микроорганизмов в поверхностных слоях донных отложений моря Лаптевых в районе метановых сипов, в авандельте р. Лены, краевого шельфа и верхнего участка склона вне прямого влияния сипов и речного выноса. Наибольшие концентрации метана и величины скорости метаноокисления были выявлены на сиповых станциях и составляли до 1.16 мкмоль CH_4 дм⁻³ сут⁻¹. Основным продуктом микробного окисления метана для всех исследованных образцов являлась углекислота. На основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК выявлены организмы, относящиеся к классу *Gamma*proteobacteria, порядку *Methylococcales*. В местах непрерывного газовыделения доля метанотрофов в составе бактериального сообщества была высока (до 1.93% от общего количества прочтений), что позволяло выявлять их методом секвенирования нативных образцов. Филогенетическое разнообразие метанооксиляющих бактерий было невелико, все детектированные последовательности принадлежали организмам, входящим в кластер “Deep-Sea” 1. На филогенетическом дереве последовательности формировали отдельный кластер вместе с родом *Methyloprofundus*. В накопительных культурах, полученных из образцов осадков прибрежных станций, были обнаружены представители родов *Methylomonas* и *Methylobacter*, близкие к метанотрофам, населяющим пресноводные экосистемы.

Ключевые слова: метанооксиляющие бактерии, интенсивность микробного окисления метана, высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК, накопительные культуры, метановые сипы, море Лаптевых

DOI: 10.31857/S0026365621030150

Одной из серьезных экологических проблем современности является постоянное и значительное увеличение в атмосфере концентрации метана (CH_4), который обладает существенно большей способностью к формированию парникового эффекта, чем углекислый газ.

Эмиссия метана с поверхности океанов составляет в среднем 14 (от 5 до 25 по оценкам разных исследователей) Тг (миллионов тонн) С/год (Saunio et al., 2016). Это примерно 4% от общих выбросов из естественных источников и 1.9% от общей эмиссии метана в атмосферу.

Было показано, что важнейшим источником эмиссии метана в атмосферу являются мелководные шельфовые моря Восточной Арктики (МВА):

Лаптевых, Восточно-Сибирское и Чукотское (Shakhova et al., 2010, 2014).

Шельф морей Восточной Арктики характеризуется целым рядом особенностей, которые делают его исключительным с точки зрения цикла углерода. Благодаря географическому положению и особенностям седиментации, МВА являются регионом, особенно благоприятным для накопления в их донных отложениях огромных запасов органического углерода (Гинсбург, Соловьев, 1994). Мощные осадочные бассейны, которые формируются в условиях пассивной континентальной окраины, создают благоприятные условия для метаногенеза и формирования залежей метана в донных отложениях. Благодаря длительному суб-аэральному промерзанию и формированию зон

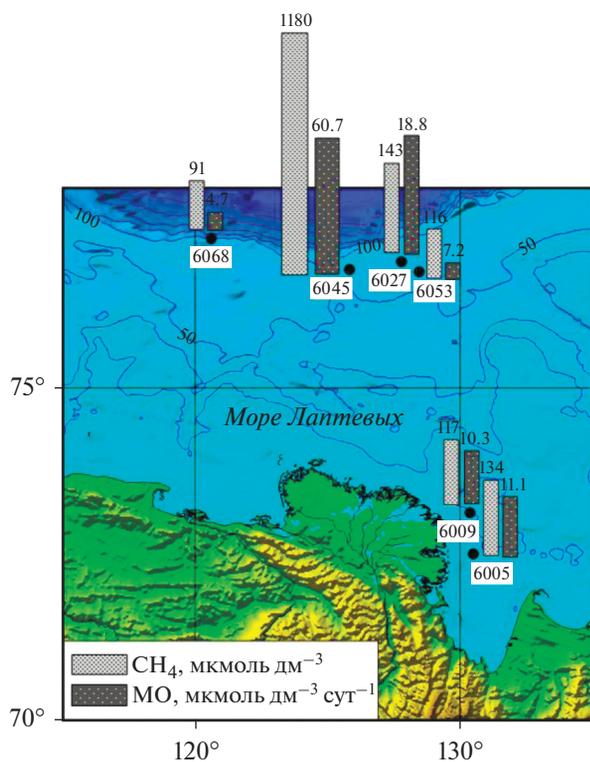


Рис. 1. Карта-схема расположения исследованных станций, распределение интегральных величин (расчитанных под 1 м² для верхних 10 см осадка) (1) концентрации метана (CH₄, мкмоль/дм³) и (2) интенсивности микробного окисления метана (МО, мкмоль/дм³сут) в море Лаптевых.

стабильности газогидратов, сохранение метана в таких залежах определяется состоянием мерзлоты (Romanovskii et al., 2005). Глобальное потепление климата в арктическом регионе сопровождается уменьшением зоны мерзлоты осадочной толщи и высвобождением метана в виде локальных сипов (Shakhova et al., 2014).

Значительная часть метана окисляется в верхних слоях осадка и толще воды, не достигая атмосферы (James et al., 2016). Относительно низкий суммарный поток метана в атмосферу из морских экосистем напрямую связан с эффективным микробным фильтром, функционирующим в морских отложениях и водной толще, способным окислять более 80% выделяющегося метана. Процессы метанобразования и метаноокисления в биогеохимически активных зонах Северного Ледовитого океана активно изучаются на протяжении более 30 лет (Охотское, Баренцево, Карское, Лаптевых, Белое, Чукотское моря) (Леин и соавт., 1994, 1996; Pimenov et al., 1999; Леин и соавт., 2000; Саввичев и соавт., 2000, 2004, 2007). Результаты этих исследований позволили количественно оценить интенсивности микробных процессов метаногенеза в донных осадках и сопоставить их со скоростями микробного окисления метана в осадках и водной

толще других морских регионов. Однако данные о таксономическом разнообразии и функциональной активности отдельных филогенетических групп метанооксиляющих бактерий фрагментарны.

В связи с этим целью данной работы была оценка разнообразия и активности аэробных метанооксиляющих микроорганизмов в поверхностных осадках моря Лаптевых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов. Пробы донных осадков были отобраны в ходе 73-го рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” в октябре 2018 г. в море Лаптевых. Для данной работы взяты поверхностные осадки на 6 станциях из 3 различных районов (рис. 1). Две станции (АМК6005 и АМК6009) располагались в районе влияния дельты р. Лены. Три станции находились в районе краевого шельфа. Из них две располагались в районе метановых сипов (АМК6027 и АМК6045), а одна (АМК6053) являлась фоновой, не подверженной прямому влиянию сипов. Еще одна станция (АМК6068) отобрана в верхней части континентального склона. Координаты отбора и описание исследованных осадков приведены в табл. 1.

В работе использован комплекс радиоизотопных, газо-геохимических, микробиологических и молекулярно-биологических методов. Немедленно после подъема на борт судна коробчатого дночерпателя типа “Vox-corer” вставляли в осадок пластиковую трубку диаметром 15 см и отбирали осадочный керн. Затем в судовой лаборатории послойно отбирали образцы донных осадков для измерения содержания и скорости окисления метана, проведения молекулярно-биологического анализа и посевов на селективную минеральную среду для метанотрофов.

Концентрацию метана в придонной воде и донных отложениях измеряли на газовом хроматографе Кристалл-2000-М (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором методом фазово-равновесной дегазации (Egorov, Ivanov, 1998). Погрешность измерения не превышала 5%.

Измерение скорости окисления метана радиоизотопным методом. Скорость окисления метана (МО) определяли радиоизотопным методом с ¹⁴C-метаном, растворенным в дегазированной дистиллированной воде. Из каждого горизонта ненарушенные осадки в количестве 2.5 см³ отбирали пластиковыми шприцами (общий объем 5 см³) с резиновым поршнем и обрезанным краем, герметично закрывали пробкой из бутиловой резины. 0.2 мл меченого ¹⁴C-метана (1 мКи на пробу) вносили туберкулиновым шприцем, прокалывая резиновую пробку иглой по центру и равномерно

Таблица 1. Характеристика станций отбора образцов, исследованных в ходе 73 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш”

Место отбора пробы, горизонт, см	Координаты	Глубина, м	Краткая характеристика осадков	Хлорид, мг/л	Сульфат, мг/л
АМК73-6005 0–4 см	72°30' с.ш. 130°29.94' в.д.	14	Песчано-алевритовый ил с небольшой примесью мелкозернистого песка, окисленный, темно-коричневый Гетерогенный слой алеврита	8040	1190
4–20 см				10550	1550
АМК73-6009 0–2 см	73°6.9' с.ш. 130°22.44' в.д.	23	Пелитовый алеврит, сметанообразный, окисленный. Граница с нижележащим слоем постепенная Пелитовый алеврит темно-серый, мягкий, со следами биотурбации и рыжими пятнами. Граница плавная	11670	1700
2–10 см				10100	1400
АМК73-6027 (метановый сип) 0–1 см	76°53.52' с.ш. 127°47.82' в.д.	64	Алевритово-песчаный наилок, коричневый, окисленный Алевритово-песчаный ил серого цвета с трубками вестиментифер. Граница с нижележащим слоем постепенная	14250	2100
1–6 см				9850	1700
АМК73-6045 (метановый сип) 0–3 см	76°46.44' с.ш. 125°50.16' в.д.	72	Песчанистый алеврит, полужидкий, окисленный, коричневого цвета. Граница с нижележащим слоем резкая Песчанистый алеврит светло-серого цвета, мягкий. Граница с нижележащим слоем резкая	12700	2100
3–7 см				13670	2230
АМК73-6053 (фоновая станция) 0–4 см	76°44.34' с.ш. 128°27.18' в.д.	65	Пелитовый алеврит коричневого цвета, окисленный, полужидкий. Граница с нижележащим слоем постепенная Пелитовый алеврит мягкий, однородный	13500	2390
4–10 см				12850	2180
АМК73-6068 0–1 см	77°14.76' с.ш. 120°36.84' в.д.	185	Алевритовый песок, полужидкий, окисленный. Граница с нижележащим слоем постепенная Песчаный алеврит мягкий, с неравномерными включениями линз более плотного осадка. Граница с нижележащим слоем постепенная	11600	1800
2–5 см				11900	1850

распределяя субстрат по длине шприца с осадком. Контролем служили пробы, фиксированные 1 мл 0.5 н раствора КОН и выдержанные в холодильнике 6 ч до внесения меченого субстрата. После внесения меченого метана образцы донных осадков инкубировали в течение 2 сут при температуре, близкой к температуре *in situ*. После инкубации пробы фиксировали и транспортировали в стационарную лабораторию для дальнейшего определения продуктов микробного окисления и трансформации С-метана: в углекислоту (CO₂), в биомассу микроорганизмов (БМ) и в растворенный органический углерод (РОУ) в составе растворенного органического вещества (РОВ). Обработку проб и расчеты интенсивности метаноокисления

проводили по ранее описанной методике (Русанов и соавт., 1998; Ivanov et al., 2002). Радиоактивность (¹⁴C) продуктов микробного процесса МО измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике PackardTRI-CarbTR 2400 (США). Для расчетов численных показателей интенсивности образования продуктов микробного окисления и трансформации углерода метана использовали среднюю величину, полученную из двух повторностей измерений для каждого образца.

Определение состава микробных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рНК. Суммарная ДНК была выделена из 3 г осадка с помощью DNeasy PowerMax Soil Kit (“Qiagen”, Carlsbad, CA, США). ПЦР фрагменты

гена 16S рРНК были получены с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGG-GDBGWCWSCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVG-GGTHTCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР фрагменты были баркодированы с помощью Nextera XT Index Kit v.2 ("Illumina", США) и очищены с использованием Agencourt AMPure beads ("Beckman Coulter", Brea, CA, США). Концентрация полученных ПЦР продуктов была подсчитана с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit ("Invitrogen", Carlsbad, CA, США). Затем все ПЦР фрагменты были смешаны в равных количествах и секвенированы на Illumina MiSeq (2 × 300 нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). 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 с использованием алгоритма Usearch. Таксономическая идентификация была выполнена по базе SILVA v.132 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016). Полученные последовательности были депонированы в GenBank NCBI в рамках проекта PRJNA679168.

Получение и анализ накопительных культур.

Для получения накопительных культур метанотрофных бактерий использовали минеральную среду следующего состава: (г/л): KNO_3 – 0.25; NH_4Cl – 0.25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; CaCl_2 – 0.1; NaCl – 20.0; KCl – 1.5; Na_2HPO_4 – 0.358; KH_2PO_4 – 0.13. Микроэлементы 1 мл/л состава: (мг/100 мл): нитрилтриуксусная кислота (НТА) – 150; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 50; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10; CoCl_2 – 10; ZnSO_4 – 10; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ – 1; H_3BO_3 – 1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1; pH готовой среды составлял 6.8–7.2.

Во флаконы объемом 120 мл помещали 10 мл среды, 0.5 г образца осадка, герметично закрывали резиновой пробкой. В газовую фазу шприцем добавляли 30% метана. Инкубировали статично при 15°C в течение 1 мес.

После инкубации отбирали аликвоты накопительных культур объемом 2 мл. Выделение тотальной ДНК и секвенирование фрагментов гена 16S рРНК проводили аналогично описанной выше методике.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика районов исследования и микробного окисления метана. На рис. 1 представлено расположение станций отбора образцов. Две станции располагались в авандельте р. Лены (ст. АМК73-6005 и АМК73-6009), две станции в районе метановых сипов (АМК73-6027 и АМК73-

6045) и две станции были условно фоновыми, не подверженными прямому влиянию выноса реки или метановых сипов – в районе краевого шельфа (АМК73-6053) и верхнего склона (АМК73-6068). На каждой станции было исследовано 3–4 горизонта осадка от поверхности до глубины 8–10 см. Глубины станций отбора, а также некоторые характеристики исследованных осадков представлены в табл. 1. Верхние 2–4 см всех осадков были представлены окисленными алеврито-песчанистыми или алеврито-пелитовыми илами. Глубже осадки приобретали сероватый оттенок, характерный для слабо окисленных или слабо восстановленных илов.

Содержание метана в верхних горизонтах большинства исследованных станций характеризовалось достаточно высокими величинами и варьировало в интервале 1–2 мкмоль дм^{-3} . Исключение составляют осадки станции АМК73-6045, расположенной в зоне сипа. Концентрация метана на этой станции уже в верхнем горизонте осадка составляла 2.6 мкмоль дм^{-3} , а к 10 см практически линейно увеличилась на порядок до 20.3 мкмоль дм^{-3} (рис. 1 и 2, табл. 2).

Послойное распределение концентрации метана по горизонтам, в верхнем 10 см слое, также различалось для осадков из разных районов отбора. На станциях авандельты (АМК73-6005 и АМК73-6009) и на станции (АМК73-6068) верхней части склона после поверхностного относительного максимума следовал подповерхностный минимум (рис. 2). Затем с глубиной концентрация метана плавно нарастала. Это может объясняться схожестью в скоростях осадконакопления, наличием лабильного органического вещества на поверхности и интенсивностью микробиологических процессов. В осадках краевого шельфа, как в районе сипов (ст. АМК73-6027 и АМК73-6045), так и на фоновой станции АМК73-6053, слабо подверженной влиянию сипов, наблюдался другой профиль в распределении метана. Начиная от поверхности, концентрация метана практически линейно, плавно или резко, нарастала с глубиной осадка. Максимальное увеличение детектировано на "сиповой" станции АМК73-6045 (рис. 2).

Наибольшие величины скорости МО выявлены в поверхностных окисленных горизонтах 0–1 и 1–3 см осадочной толщи (рис. 2). Ниже окисленной зоны активность метанотрофов резко снижалась на всех исследованных станциях. Максимальные значения величин МО зафиксированы на сиповой станции АМК73-6045, где от поверхностных горизонтов к глубине 1–3 см скорость процесса возрастала в 2 раза от 0.56 до 1.16 мкмоль $\text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, а затем на глубине 3–7 см резко уменьшалась до 0.4 мкмоль $\text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ (рис. 2).

Профиль распределения продуктов микробного окисления и трансформации углерода мета-

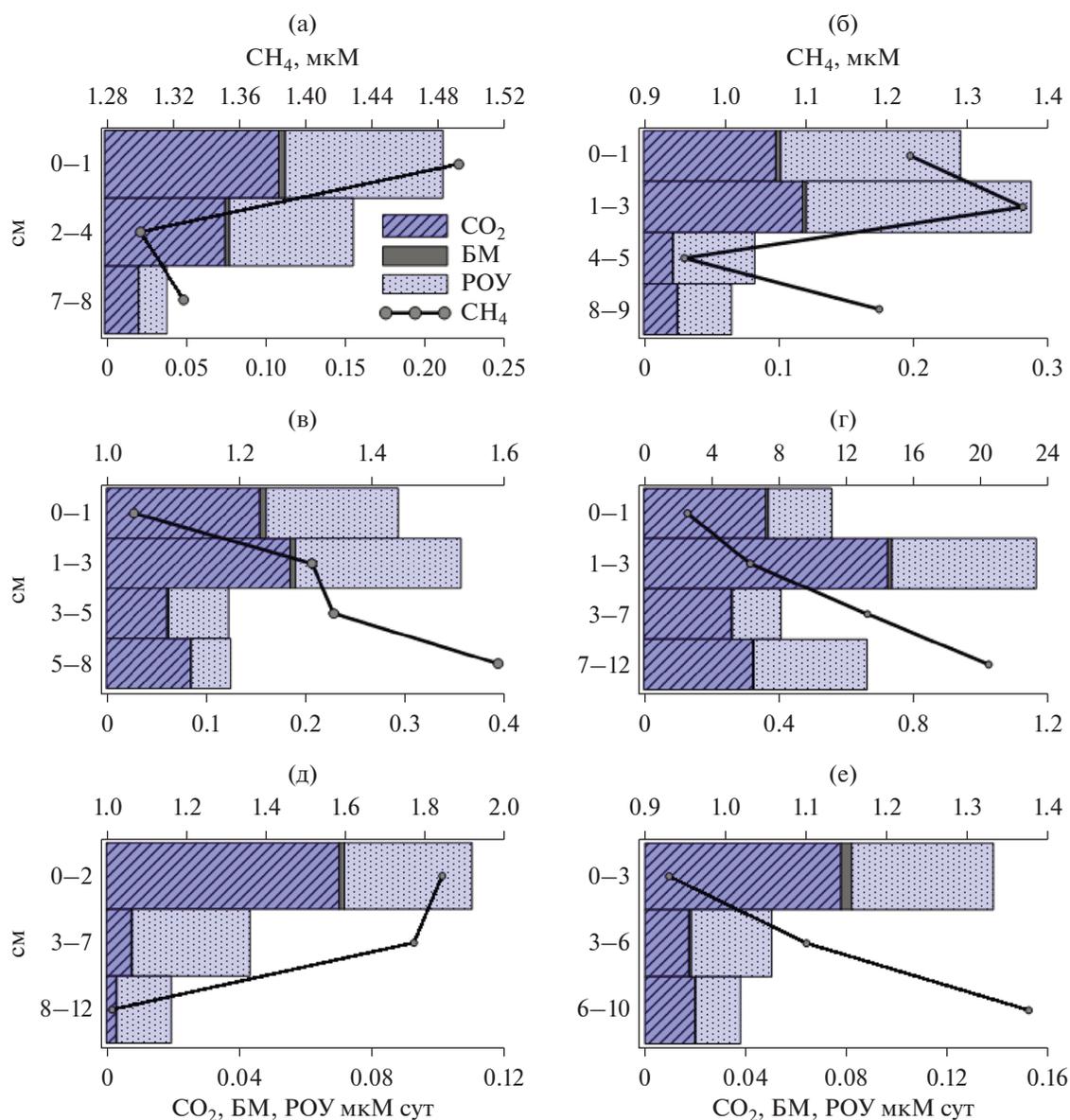


Рис. 2. Профили распределения величин концентрации метана (мкмоль/дм^3) и интенсивности микробного окисления метана ($\text{мкмоль/дм}^3 \text{сут}$) в верхних горизонтах исследованных станций в море Лаптевых: а, б – авандельта р. Лены (ст. АМК73-6005 и АМК73-6009); в, г – станции над сипами (АМК73-6027 и АМК73-6045); д, е – станция верхнего склона (АМК73-6068) и фоновая станция на шельфе (АМК73-6053).

на (до HCO_3^- , БМ и РОУ) на большинстве станций различался между собой. При этом во всех исследованных осадках наблюдалась общая закономерность. Основным продуктом микробной утилизации метана для всех исследованных образцов являлся HCO_3^- (до 68%), в экзотомолиты (РОУ) переходит 30–60% углерода метана, а в биомассу включается до 2%. Исключение составляет осадок с глубины 10 см станции АМК73-6068, где до CO_2 окисляется лишь 17% метана.

Характеристики накопительных культур. Первичные накопительные культуры содержали

большое количество минеральных частиц из образца осадка, поэтому визуально оценить рост метанооксилюющих микроорганизмов было практически невозможно. Последующие пересевы на минеральную среду с метаном в качестве источника углерода показали стабильный рост для культур, полученных из образцов осадков со станций АМК73-6005 и АМК73-6009. Равномерный рост характерен для культуры 11L и хлопьевидный рост для культур 13L, 14L и 16L. В фазах экспоненциального и линейного роста преобладали одиночные клетки или диплоформы, в фазе замедленного роста и стационарной фазе за счет

Таблица 2. Содержание метана и активность его окисления в образцах осадков, отобранных в ходе 73 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш”

Место отбора пробы, горизонт, см	Содержание метана, мкМ	Скорость окисления метана, мкМ сут	Включение C-CH ₄ в CO ₂ , мкМ сут (%)	Включение C-CH ₄ в БМ, мкМ сут (%)	Включение C-CH ₄ в РОУ, мкМ сут (%)
АМК73-6005					
0–1 см	1.49	0.21	0.109 (52)	0.004 (2)	0.098 (46)
2–4 см	1.30	0.16	0.076 (48)	0.003 (2)	0.077 (50)
7–8 см	1.33	0.04	0.021 (54)	0.000 (1)	0.018 (45)
АМК73-6009					
0–1 см	1.23	0.197	0.098 (50)	0.004 (2)	0.095 (48)
1–3 см	1.37	0.227	0.117 (52)	0.003 (1)	0.106 (47)
4–5 см	0.95	0.042	0.021 (51)	0.000 (1)	0.020 (48)
АМК73-6027					
0–1 см	1.04	0.293	0.154 (53)	0.006 (2)	0.133 (45)
1–3 см	1.31	0.356	0.185 (52)	0.005 (2)	0.166 (47)
3–5 см	1.34	0.123	0.61 (50)	0.002 (1)	0.060 (49)
5–8 см	1.59	0.125	0.85 (68)	0.001 (1)	0.040 (32)
АМК73-6045					
0–1 см	2.58	0.554	0.359 (65)	0.008 (1)	0.187 (34)
1–3 см	6.27	1.155	0.718 (62)	0.012 (1)	0.425 (37)
3–7 см	13.17	0.404	0.257 (64)	0.003 (1)	0.143 (36)
АМК73-6053					
0–3 см	0.93	0.138	0.078 (56)	0.004 (3)	0.56 (41)
3–6 см	1.10	0.050	0.017 (35)	0.001 (2)	0.32 (63)
6–10 см	1.38	0.038	0.020 (52)	0.000 (1)	0.18 (47)
АМК73-6068					
0–1 см	1.8	0.110	0.070 (64)	0.002 (1)	0.038 (35)
10 см	1.0	0.020	0.003 (17)	0.000 (1)	0.016 (82)

выделяемой метанотрофами слизи образовывались скопления, которые выглядели как хлопья.

Идентификация метанотрофов в нативных осадках и накопительных культурах. В результате секвенирования фрагментов генов 16S рРНК для нативных образцов и первичных накопительных культур было получено 4202726 и 187820 последовательностей соответственно. Дальнейшая их кластеризация и анализ по базе SILVA выявили метанотрофных бактерий, относящихся к порядку *Methylococcales* класса *Gammaproteobacteria* (рис. 3).

Таксономическое разнообразие метанотрофов в нативных образцах оказалось невелико, были выявлены представители *Methylococcaceae*, отнесенные только к 4 ОТЕ (табл. 3). Их доля составляла от 0.01 до 1.93% от общего числа последовательностей всех микроорганизмов. На филогенетическом дереве последовательности формировали отдельный кластер вместе с родом *Methyloprofundus* (рис. 3).

В результате секвенирования и филогенетического анализа первичных накопительных культур

после инкубирования в среде с метаном были выявлены метанооксиляющие бактерии, отличные от организмов в нативных осадках (рис. 3).

Для накопительных культур 11L (культура получена из образца со станции АМК73-6005, 0–1 см), 13L (АМК73-6005, 7–8 см), 14L (АМК73-6009, 0–1 см) и 16L (АМК73-6009, 4–5 см) было получено дополнительно 5 ОТЕ, относящихся к метанотрофам (табл. 4).

В накопительных культурах обнаружены метанотрофы родов *Methylomonas* (0.01–18.78% от общего числа прочтений) и *Methylobacter* (9.64–61.88% от общего числа последовательностей). Представители рода *Methyloprofundus* выявлены не были (в отличие от данных секвенирования для нативных образцов).

ОБСУЖДЕНИЕ

Микробные сообщества осадков Арктических морей активно изучаются с применением мето-

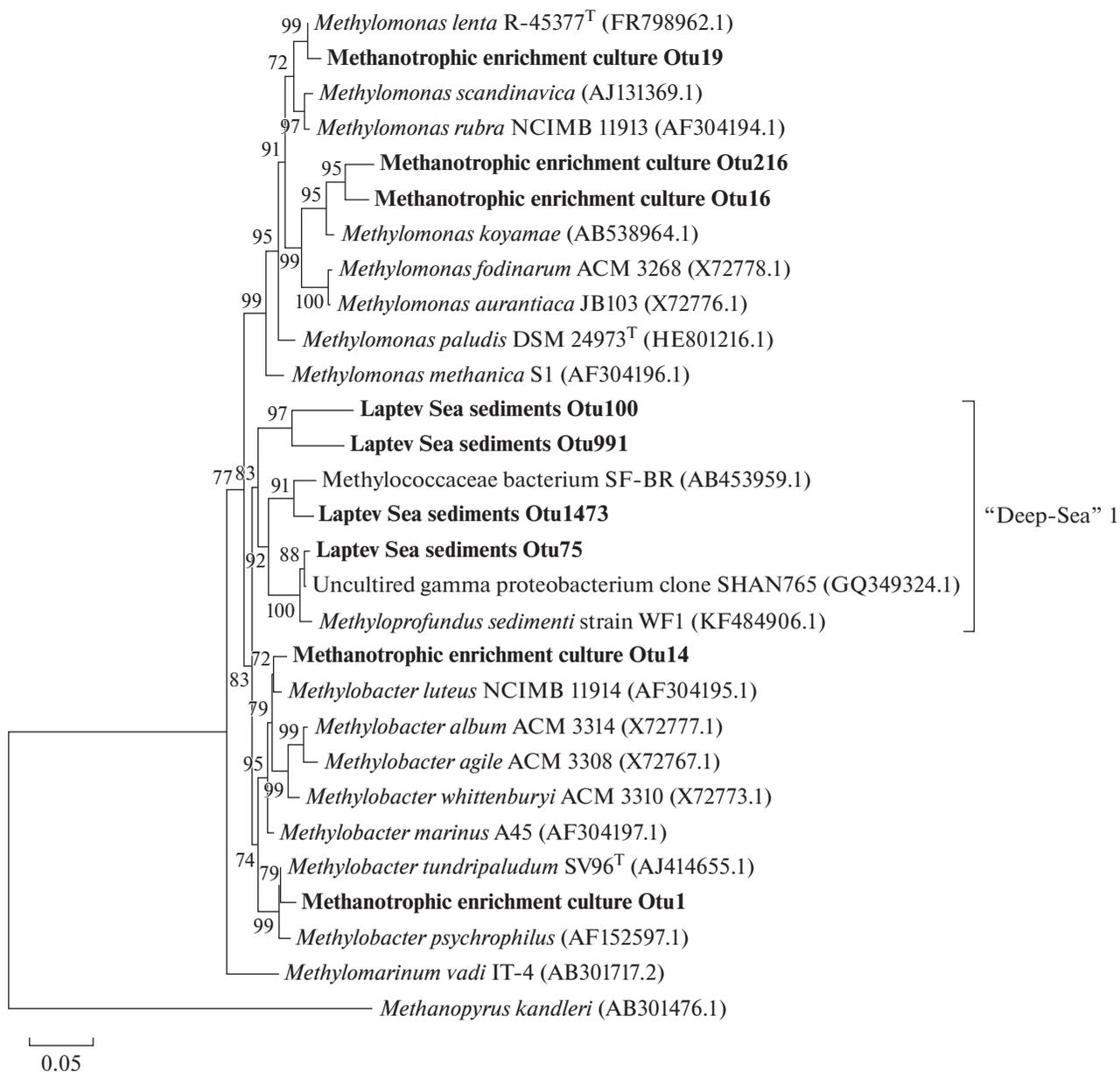


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа частичных последовательностей гена 16S рНК и отображающее положение выявленных в ходе данного исследования ОТЕ.

дов молекулярной биологии (Koch et al., 2009; Kirchman et al., 2010; Zeng et al., 2013; Lin et al., 2017). При анализе результатов секвенирования гена 16S рНК основное внимание, как правило, уделяется крупным таксонам на уровне семейств и выше (Bienhold et al., 2012; Yergeau et al., 2017; Savvichev et al., 2018). Детекция метанотрофов методом секвенирования гена 16S рНК в сложных микробных сообществах затруднена ввиду того, что эти физиологические группы не являются монофилетическими, и их доля в сообществе обычно невелика (Baptiste, 2005; Knittel, 2009).

Микробиологические исследования метановых сипов в Арктических морях вызывают особый интерес, поскольку в районах газовых высачиваний формируются уникальные бентосные сообщества, основу трофической цепи которых составляют метанотрофные бактерии и археи (Pimenov et al., 1999; Pimenov et al., 2000; Lösekann et al., 2007; Savvichev et al., 2018).

Для сравнения на каждой станции нами были рассчитаны интегральные величины для верхнего 10-сантиметрового слоя с площадью 1 м². Распределение интегральных величин концентрации метана и интенсивности его микробного окисления были

Таблица 3. Таксономическое разнообразие и относительное обилие метанотрофов в образцах ила моря Лаптевых (% от всего сообщества)

Организм (ОТЕ)	АМК73-6005		АМК73-6009		АМК73-6027			АМК73-6045			АМК73-6053			АМК73-6068		
	горизонт, см															
	0–1	7–8	0–1	3–7	0–1	3–5	5–8	0–1	1–3	3–7	0–3	3–6	6–10	0–2	10	
ОТЕ75	0.01	–	0.02	0.01	1.04	0.66	1.93	0.96	0.48	0.14	0.02	0.01	–	–	–	
ОТЕ1473	0.01	–	–	–	0.39	0.01	0.01	0.13	0.02	–	0.11	–	–	0.06	–	
ОТЕ991	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.01	–	–	–	–	–	
ОТЕ1000	–	–	–	–	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	

Примечание. ОТЕ, принадлежащие метанотрофам, не выявлены.

Таблица 4. Таксономическое разнообразие и относительное обилие метанотрофов в первичных накопительных культурах (% от всего сообщества)

Организм (ОТЕ)	Ближайший культивируемый родственник	% сходства	11L	13L	14L	16L
ОТЕ19	<i>Methylomonas lenta</i>	99	11.37	2.05	0.00	0.01
ОТЕ216	<i>Methylomonas koyamae</i>	96	0.02	2.51	0.00	0.00
ОТЕ16	<i>Methylomonas koyamae</i>	97	7.39	0.02	0.00	0.00
ОТЕ14	<i>Methylobacter marinus</i>	98	0.12	0.14	0.20	22.75
ОТЕ1	<i>Methylobacter tundripaludum</i>	99	9.53	43.17	53.76	39.13

сходными на станциях авандельты р. Лены (ст. АМК73-6005 и АМК73-6009), фоновой станции краевого шельфа (АМК73-6053) и станции верхнего склона (АМК73-6068). На “сиповой” станции АМК73-6027 эти величины были несколько выше, а на ст. АМК73-6045 многократно превосходили значения, полученные на других станциях (рис. 1).

Присутствие метанотрофных бактерий было показано на всех исследованных станциях в результате секвенирования последовательностей гена 16S рРНК. Их доля в сообществе резко возрастала в осадках, отобранных в районах метановых сипов (станции АМК73-6027 и АМК73-6045), что обусловлено высоким содержанием метана глубинного происхождения. Данные о процентном соотношении метанотрофов в сообществах согласуются с высокими скоростями микробного метаноокисления в этих районах.

Наибольшая доля метанотрофов и интенсивности окисления метана выявлены на сиповой станции АМК73-6045. Осадки этой станции характеризуются резким увеличением количества метана с увеличением глубины осадочной толщи. В условиях разгрузки глубинного метана здесь формируется микробное сообщество, в котором метанотрофы составляют до 1%, что является весьма высоким показателем для этой группы организмов в зонах газопроявления.

Заметному влиянию метановых сипов подвержено микробное сообщество станции АМК73-6027, расположенной на расстоянии 30 миль от станции АМК73-6045. Здесь содержание метана и интегральные интенсивности процесса МО в поверхностных осадках были почти в 2 раза ниже. Однако метанотрофы составляли на этой станции также значительную величину (до 1.94% от всех бактерий), что может быть обусловлено как разгрузкой глубинного метана, так и распространением метана в составе придонных течений на значительные расстояния от площадок активных газовыделений (Shakhova et al., 2010, 2014, 2015). С увеличением расстояния уменьшается влияние сипов: для станций АМК73-6053 и АМК73-6068 зафиксированы невысокие скорости процесса МО и низкая доля метаноокисляющих бактерий в микробном сообществе, что согласуется с низким содержанием метана в поверхностных осадках этих станций.

В образцах нативных осадков для всех станций были обнаружены последовательности генов 16S рРНК, принадлежащие метаноокисляющим организмам (рис. 3), входящим в кластер “Deep-Sea” 1 (Luke, Frenzel, 2011). Обнаруженные метанотрофы являются филогенетически близкими и характерны для морских экосистем, в том числе для районов, где наблюдаются разгрузки метановых сипов (Bessette et al., 2017; Тихонова и соавт., 2020). Единственным культивируемым организ-

мом в кластере “Deep-Sea” 1 на данный момент является *Methyloprofundus sedimenti* WF1 (Tavormina et al., 2014), который детектируется во многих морских экосистемах. Этот организм микроаэрофил, способен расти при низких температурах и высоких значениях солености. Кроме того, показана его способность к образованию эндосимбиотических связей с морскими моллюсками.

Большее таксономическое разнообразие аэробных метанооксиляющих бактерий было выявлено методом культивирования для станций АМК73-6005 и АМК73-6009. Здесь количество метана не возрастает с увеличением глубины осадка, процессы его микробного окисления не превышают $0.22 \text{ мкмоль } \text{CH}_4 \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-3}$. Метанооксиляющие бактерии в составе сообщества не превышали 0.02%, однако их разнообразие оказалось выше, чем в глубоководных станциях. Помимо найденных в нативных образцах представителей кластера “Deep-Sea” 1, характерных для глубоководных морских экосистем, в накопительных культурах были обнаружены организмы, близкие к метанотрофам, населяющим пресноводные экосистемы. В накопительных культурах, полученных из образцов осадков, отобранных на станциях АМК73-6005 и АМК73-6009, обнаружены представители родов *Methylomonas* и *Methylobacter*. Их количество в нативных образцах было ниже уровня детекции молекулярно-биологическими методами. Обнаружение этих организмов стало возможным лишь в результате анализа первичных накопительных культур. Вероятно, пресноводные микроорганизмы попадают в осадочную толщу на частицах речной взвеси и сохраняют жизнеспособность в условиях значительного распреснения районов, подверженных влиянию речного стока. Однако низкое содержание метана в поверхностных осадках этих станций не позволяет метанотрофным микроорганизмам активно развиваться и составлять значительную долю в структуре микробного сообщества.

Неожиданным оказалось отсутствие достоверного роста в накопительных культурах из образцов осадков станций АМК73-6027, АМК73-6045, АМК73-6053, АМК73-6068, где наблюдались высокое содержание метана, скорости его микробного окисления, а также в нативных образцах выявлено присутствие метанотрофов. По-видимому, нам не удалось подобрать условия для получения активных накопительных культур этих микроорганизмов. Известно, что представители рода *Methyloprofundus* и близкие к ним организмы, являются трудно культивируемыми и для получения накопительных культур этих метанотрофов требуется не менее 12 месяцев (Tavormina et al., 2014).

Результаты наших исследований позволяют заключить, что метанотрофные бактерии кластера “Deep-Sea” 1, филогенетически близкие к един-

ственному культивируемому представителю организму *Methyloprofundus sedimenti*, доминируют в составе сообщества метанотрофов в поверхностных осадках районов газопроявления в море Лаптевых.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность руководителю 73-го рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” чл.-корр. РАН И.П. Семилетову, а также всему научному коллективу и команде судна за предоставленные возможности и всестороннюю помощь при отборе образцов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ А 20-04-00126, а также из средств государственного задания ФИЦ Биотехнологии РАН.

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.

ВКЛАД АВТОРОВ

Подбор площадок для проведения исследований, проведение отбора, первичной обработки и описание образцов проведено И.И. Русановым и О.С. Самылиной. Измерение концентрации и скоростей окисления метана проведено Е.Е. Захаровой и И.И. Русановым. Выделение ДНК из нативных образцов, секвенирование гена 16S рРНК и построение филогенетического дерева выполнено В.В. Кадниковым. Получение накопительных культур, выделение ДНК выполнено Е.Н. Тихоновой. Текст статьи написан Н.В. Пименовым, Е.Н. Тихоновой и И.И. Русановым. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гинсбург Г.Д., Соловьев В.А. Субмаринные газовые гидраты. СПб.: ВНИИОкеангеология, 1994. 199 с.
- Лейн А.Ю., Миллер Ю.М., Намсараев Б.Б., Павлова Г.А., Пименов Н.В., Русанов И.И., Саввичев А.С., Иванов М.В. Биогеохимические процессы цикла серы на ранних стадиях диагенеза осадков на профиле река Енисей—Карское море // Океанология. 1994. Т. 34. С. 681—692.
- Lein A. Yu., Miller Yu. M., Namsaraev B. B., Pavlova G. A., Pimenov N. V., Rusanov I. I., Savvichev A. S., Ivanov M. V. Biogeochemical processes of sulfur cycling in the early stages of sediments diagenesis along the profile from the Yenisei River to the Kara Sea // Oceanology. 1994. V. 34. P. 681—692.

- Lein A.Yu., Pimenov N.V., Savvichev A.S., Pavlova G.A., Rusanov I.I., Miller Y.M., Ivanov M.V. Геохимические особенности диагенеза голоценовых отложений в районе архипелага Шпицберген // *Океанология*. 2000. Т. 40. С. 247–256.
- Lein A.Yu., Pimenov N.V., Savvichev A.S., Pavlova G.A., Rusanov I.I., Miller Y.M., Ivanov M.V. Geochemical features of the diagenesis of the holocene deposits in the area of the Spitsbergen Archipelago // *Oceanology*. 2000. V. 40. P. 228–236.
- Lein A.Yu., Rusanov I.I., Pimenov N.V. Биогеохимические процессы циклов углерода и серы в Карском море // *Геохимия*. 1996. Т. 11. С. 1027–1044.
- Rusanov I.I., Savvichev A.S., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V. Образование экзометаболитов в процессе микробного окисления метана в морских экосистемах // *Микробиология*. 1998. Т. 67. С. 710–717.
- Rusanov I.I., Savvichev A.S., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V. Exometabolite formation during microbial oxidation of methane in marine ecosystems // *Microbiology (Moscow)*. 1998. V. 5. P. 710–717.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Lein A.Yu., Kreйн K., Ivanov M.V. Микробные процессы циклов углерода и серы в Чукотском море // *Микробиология*. 2007. Т. 76. С. 682–693.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Ivanov M.V., Lein A.Yu., Crane K. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in the Chukchi Sea // *Microbiology (Moscow)*. 2007. V. 76. P. 603–613.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Miцкевич И.Н., Байрамов И.Т., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Микробиологические исследования северной части Баренцева моря в начале зимнего сезона // *Микробиология*. 2000. Т. 69. С. 819–830.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Mitskevich I.N., Baї ramov I.V., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbiological study of the northern part of the Barentz Sea at the onset of winter // *Microbiology (Moscow)*. 2000. V. 69. P. 819–830.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Биогеохимический цикл метана в прибрежной зоне и литорали Кандалакского залива Белого моря // *Микробиология*. 2004. Т. 73. С. 540–552.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V., Lein A.Yu. The biogeochemical cycle of methane in the coastal zone and littoral of the Kandslaksha Bay of the White Sea // *Microbiology (Moscow)*. 2004. V. 73. P. 457–468.
- Tikhonova E.N., Tarnoveцкий И.Ю., Малахова Т.В., Гулин М.Б., Меркель А.Ю., Pimenov N.V. Идентификация аэробных метанооксиляющих бактерий в прибрежных осадках Крымского полуострова // *Микробиология*. 2020. Т. 89. С. 737–747.
- Tikhonova E.N., Tarnovetskii I.Yu., Malakhova T.V., Gulin M.B., Merkel A.Yu., Pimenov N.V. Identification of aerobic methane-oxidizing bacteria in coastal sediments of the Crimean Peninsula // *Microbiology (Moscow)*. 2020. V. 89. P. 740–749.
- Baptiste E., Brochier C., Boucher Y. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens // *Archaea*. 2005. V. 1. P. 353–363.
- Bessette S., Moalic Y., Gautey S., Lesongeur F., Godfroy A., Toffin L. Relative abundance and diversity of bacterial methanotrophs at the oxic–anoxic interface of the Congo deep-sea fan // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 715.
- Bienhold C., Boetius A., Ramette A. The energy-diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments // *ISME J.* 2012. V. 6. P. 724–732.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Egorov A.V., Ivanov M.K. Hydrocarbon gases in sediments and mud breccias from the central and eastern part of the Mediterranean Ridge // *Geo-Mar. Lett.* 1998. V. 18. P. 127–138.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. V. 92. fiw018.
- Ivanov M.V., Rusanov I.I., Lein A.Yu., Pimenov N.V., Yusupov S.K. Biogeochemical cycle of methane at North-Western shelf area of the Black Sea // *Proc. 6th Int. conf. "Gas in marine sediments"*. St. Petersburg, September 5–8. 2000.
- James R.H., Bousquet P., Bussmann I., Haeckel M., Kipfer R., Leifer I., Niemann H., Ostrovsky I., Piskozub J., Rehder G., Treude T., Vielstädte L., Greinert J. Effects of climate change on methane emissions from seafloor sediments in Arctic Ocean: A review // *Limnol. Oceanogr.* 2016. V. 61. S283–S299.
- Kirchman D.L., Cottrell M.T., Lovejoy C. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. P. 1132–1143.
- Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. V. 63. P. 311–334.
- Koch K., Knoblauch C., Wagner D. Methanogenic community composition and anaerobic carbon turnover in submarine permafrost sediments of the Siberian Laptev Sea // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 657–668.
- Lin X., Zhang L., Liu Y., Li Y. Bacterial and archaeal community structure of pan-Arctic Ocean sediments revealed by pyrosequencing // *Acta Oceanologica Sinica*. 2017. V. 36. № 8. P. 146–152.
- Lücke C., Frenzel P. Potential of *pmoA* amplicon pyrosequencing for methanotroph diversity studies // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 6305–6309.
- Magoc T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Pimenov N., Savvichev A., Rusanov I., Lein A., Egorov A., Gebruk A., Moskalev L., Vogt P. Microbial processes of carbon cycle as the base of food chain of Haakon Mosby Mud Volcano benthic community // *Geo-Mar. Lett.* 1999. V. 19. P. 89–96.
- Pimenov N.V., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbiological processes of the carbon and sulfur cycle in cold methane seeps in the North Atlantic // *Microbiology (Moscow)*. 2000. V. 69. P. 831–843.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ Preprints*. 2016. V. 4. e2409v1.

- Romanovskii N.N., Hubberten H.-W., Gavrilov A.V., Eliseeva A.A., Tipenko G.S. Offshore permafrost and gas hydrate stability zone on the shelf of East Siberian Seas // *Geo-Mar. Lett.* 2005. V. 25. P. 167–182.
- Saunio M., Bousquet P., Poulter B., Peregon A., Ciais P., Canadell J.G., et al. The global methane budget 2000–2012 // *Earth Syst Sci Data.* 2016. V. 8. P. 697–751.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Kadnikov V.V., Beletskii A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Microbial community composition and rates of the methane cycle microbial processes in the upper sediments of the Yamal sector of the southwestern Kara Sea // *Microbiology (Moscow).* 2018. V. 87. P. 238–248.
- Shakhova N., Semiletov I., Leifer I., Salyuk A., Rekant P., Kosmach D. Geochemical and geophysical evidence of methane release over the East Siberian Arctic Shelf // *J. Geophys. Res.* 2010. V. 115. C08007.
- Shakhova N., Semiletov I., Leifer I., Sergienko V., Salyuk A., Kosmach D., Chernykh D., Stubbs C., Nicolsky D., Tumskoy V., Gustafsson O. Ebullition and storm-induced methane release from the East Siberian Arctic Shelf // *Nat. Geosci.* 2014. V. 7. P. 64–70.
- Shakhova N., Semiletov I., Sergienko V., Lobkovsky L., Yusupov V., Salyuk A., Salomatin A., Chernykh D., Kosmach D., Panteleev G., Nicolsky D., Samarkin V., Joye S., Charkin A., Dudarev O., Meluzov A., Gustafsson Ö. The East Siberian Arctic Shelf: towards further assessment of permafrost-related methane fluxes and role of sea ice // *Phil. Trans. R. Soc. A.* 2015. V. 373. Art. 20140451.
- Yergeau E., Michel C., Tremblay J., Niemi A., King T.L., Wyglinski J., Lee K., Greer C.W. Metagenomic survey of the taxonomic and functional microbial communities of seawater and sea ice from the Canadian Arctic // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 42242.
<https://doi.org/10.1038/srep42242>
- Zeng Y., Zhang F., He J., Lee S.H., Qiao Z., Yu Y., Li H. Bacterioplankton community structure in the Arctic waters as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2013. V. 103. P. 1309–1319.

Methane-Oxidizing Activity and Phylogenetic Diversity of Aerobic Methanotrophs in the Laptev Sea Upper Sediment Horizons

E. N. Tikhonova^{1,*}, V. V. Kadnikov², I. I. Rusanov¹, A. V. Beletsky², E. E. Zakharova¹, O. S. Samylina¹, N. V. Ravin², and N. V. Pimenov¹

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: katerina_inmi@mail.ru

Received January 10, 2021; revised January 22, 2021; accepted January 23, 2021

Abstract—Methane oxidation rates and diversity of methane-oxidizing microorganisms were studied in the upper sediment layers of the Laptev Sea (methane seep area, Lena fore-delta, shelf, and upper slope not affected by seeps and river flow). The highest methane concentrations and methane oxidation rates (up to 1.16 $\mu\text{mol CH}_4 \text{ dm}^{-3} \text{ day}^{-1}$) were revealed at the seep stations. Carbon dioxide was the main product of methane oxidation at all stations. Sequencing of the 16S rRNA gene fragments revealed microorganisms of the class *Gammaproteobacteria*, order *Methylococcales*. Since the share of methanotrophs was high at the sites of constant gas seepage (up to 1.93% of the total read number), they could be detected by sequencing of the native samples. Phylogenetic diversity of methane-oxidizing bacteria was not high, and all detected microorganisms belonged to the Deep-Sea 1 cluster. On the phylogenetic tree, the sequences formed a cluster together with the genus *Methyloprofundus*. Members of the genera *Methylomonas* and *Methylobacter* related to methanotrophs inhabiting freshwater ecosystems were revealed in enrichments from the coastal stations sediment samples.

Keywords: methane-oxidizing bacteria, rate of microbial methane oxidation, high-throughput sequencing of the 16S rRNA genes, enrichment cultures, methane seeps, Laptev Sea

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И РАЗМЕРНО- МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА БАКТЕРИОПЛАНКТОНА РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

© 2021 г. Е. В. Кузнецова^{а, *}, Е. В. Суханова^б, Д. Б. Косолапов^{а, с}

^аИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,
Борок, Некоузский район, Ярославская область, 152742 Россия

^бЛимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

^сЧереповецкий государственный университет, Череповец, Вологодская область, 162600 Россия

*e-mail: elivic.rum@gmail.com

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 27.01.2021 г.

Впервые с помощью молекулярно-биологических методов изучен таксономический состав бактериопланктона Рыбинского водохранилища. Получены 58 нуклеотидных последовательностей, которые отнесены к 26 операционным таксономическим единицам (ОТЕ): *Eubacterium* (24 ОТЕ) и *Eukaryota* (2 ОТЕ). Разнообразие бактериопланктона представлено семью филумами зубактерий: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* и *Acidobacteria*. Доминирующими отмечены альфапротеобактерии вида *Candidatus Fonsibacter ubiquis*, а также неидентифицированные представители филумов *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia*, гомологи которых широко распространены в пресных водоемах и имеют маленькие размеры геномов и клеток. В период проведения исследований в бактериопланктоне преобладали (70–99%) одиночные мелко- и среднеразмерные клетки, наименее уязвимые для элиминирующих факторов контроля “сверху” и “снизу”. Основу численности бактериального сообщества составляли кокки (50–80%), тогда как значительная доля его биомассы приходилась на мелкие палочки (длиной до 2 мкм) (20–30%).

Ключевые слова: бактериальное сообщество, филогенетический анализ, 16S рРНК, секвенирование по Сэнгеру, таксономический состав, размерно-морфологическая структура

DOI: 10.31857/S0026365621030083

Рыбинское водохранилище — это крупное (4550 км²) равнинное мелководное (средняя глубина 5.6 м) эвтрофное (хлорофилл *a* — до 40 мкг/л) водохранилище озерного типа (Верхняя Волга). Оно образовано в 1940–1949 гг. и состоит из четырех плесов Центрального, Волжского, Моложского и Шекснинского (Романенко, 1985; Минеева, Макарова, 2018). Регулярные гидрологические, гидрохимические и гидробиологические исследования проводятся на этой сетке станций с конца 1950-х гг. (Романенко, 1985). В результате этих исследований, в частности, выявлены закономерности пространственного распространения и временной динамики бактериопланктона. В годовом цикле в пелагиали водоема наблюдаются два максимума количественного развития бактериопланктона — в конце весны и в конце лета—начале осени (Романенко, 1985; Копылов, Косолапов, 2008).

Таксономическое разнообразие бактериопланктона водохранилищ обычно выше по срав-

нению с озерными и речными экосистемами (Пиев et al., 2017; Qu et al., 2018), причем оно увеличивается вдоль продольного профиля к приплотинной части водохранилищ (Simek et al., 2008; Wei et al., 2014). Доминирующими филумами в водохранилищах, как и в большинстве других пресных водоемов, являются *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, доля которых в общем количестве бактериопланктона может достигать 95% (Пиев et al., 2017). Кроме того, высоким разнообразием и обилием характеризуются филумы *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* и *Cyanobacteria* (Polverino et al., 2012; Qu et al., 2018; Кузнецова и соавт., 2020а). Разные филы бактерий по-разному реагируют на зарегулирование рек, например, пространственное распределение *Cyanobacteria* не изменяется, а распределение *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria* претерпевает значительные изменения (Ruiz-Gonzalez et al., 2013). В формировании структуры бактериопланктона водохранилищ участвуют

абиотические и биотические факторы, такие как температура, концентрация растворенного кислорода, фосфора, неорганического и общего азота, электропроводность и pH воды (Ruiz-Gonzalez et al., 2013; Wei et al., 2014; Yang et al., 2015; Qu et al., 2018). Важную роль играют также прижизненные выделения фитопланктона, выедание протистами и лизис вирусами (Simek et al., 2008).

До сих пор изучение видового состава бактериопланктона Рыбинского водохранилища проводили традиционными культуральными методами. С помощью этих методов определяли также численность физиологических групп микроорганизмов: сапрофитных, нитрифицирующих, денитрифицирующих, амилотических, целлюлозо- и нефтеразлагающих и др. (Романенко, 1985; Романенко и соавт., 1990). Молекулярно-генетические методы использовали для характеристики эпифитных бактериальных сообществ водохранилища, в составе которых в вегетационный период доминировали два филума: *Cyanobacteria* и *Proteobacteria* (Рыбакова и соавт., 2009). При этом изучением микробных сообществ других водоемов занимается множество отечественных авторов (например, Раднагуруева и соавт., 2016; Tsydenova et al., 2018).

Исследование размерно-морфологической структуры бактериопланктона особенно ценно во взаимосвязи с его таксономическим составом. Важно охарактеризовать динамику как генетической, так и фенотической составляющих клеток бактерий. Бактериопланктон функционирует в условиях “функциональной избыточности”, поэтому определяющим критерием генетического обеспечения его регуляции становится способность к накоплению биомассы во взаимосвязи со скоростью метаболизма и частотой размножения (Кузнецова и соавт., 2020б).

Цель работы – с помощью метода секвенирования по Сэнгеру и эпифлуоресцентной микроскопии изучить таксономическую и размерно-морфологическую структуру бактериопланктона Рыбинского водохранилища.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Пробы воды отбирали 7 июля 2014 г. на стандартных станциях, расположенных в Волжском (Коприно и Молога) и Центральном (Наволоки, Измайлово, Средний Двор и Брейтово) плесах Рыбинского водохранилища. Интегральные пробы получали, смешивая воду, отобранную с каждого метра водной толщи от поверхности до дна, плексигласовым батометром Рутнера. Для количественного учета бактерий, гетеротрофных нанофлагеллят (жгутиконосцев, ГНФ) и вирусных частиц 60 мл интегральной пробы воды помещали в стерильные флаконы и фиксировали формали-

ном, предварительно профильтрованным через мембранный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм, до конечной концентрации 2%, хранили в темноте при 4°C и обрабатывали в лаборатории в течение месяца.

Микроскопия. Численность и размерно-морфологические группы бактериопланктона, ГНФ, а также количество вириопланктона определяли методом эпифлуоресцентной микроскопии. Бактерии учитывали на черных ядерных фильтрах с диаметром пор 0.17 мкм (ОИЯИ, г. Дубна, Россия) с использованием флуорохрома DAPI (Porter, Feig, 1980). Фильтровали 2 мл образца. Препараты просматривали при увеличении $\times 1000$ под эпифлуоресцентном микроскопом Olympus BX51 (“Olympus”, Япония), соединенным с цифровой камерой Color-View III (“Olympus”, Япония), при освещении ультрафиолетовыми лучами. Изображение преобразовывали в цифровую форму с помощью программного обеспечения CellF и использовали для последующего подсчета и измерения бактериальных клеток различной морфологии. Объемы бактерий вычисляли с использованием значений длины и диаметра клеток по формуле объема цилиндра с закругленными концами или шара ($W = L$): $V = (\pi/4) \times W^2 \times (L - (W/3))$, где V – объем клетки, W – ее диаметр и L – ее длина (Krambeck et al., 1981). Сырую биомассу микроорганизмов получали путем умножения их численности на средний объем клеток.

Численность и размеры ГНФ определяли с использованием флуорохрома примулин (Caron, 1983). Численность планктонных вирусных частиц (вириопланктона) определяли с использованием флуорохрома SYBR Green I (Noble, Fuhrman, 1998).

Первичную продукцию фитопланктона и темную ассимиляцию CO₂ определяли радиоуглеродным методом в интегральных пробах воды от поверхности до глубины тройной прозрачности по диску Секки и от поверхности до дна, соответственно (Романенко, 1985).

Молекулярно-генетические методы. Изучение таксономического разнообразия бактериопланктона проводили на стандартной станции Молога, расположенной в Волжском плесе Рыбинского водохранилища на бывшем русле р. Молога в месте ее впадения в р. Волга. Этот глубоководный участок характеризуется высокой продуктивностью и богатством фито- и зоопланктона (Романенко, 1985).

Интегральную пробу воды (800 мл) подвергали префильтрации через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 1.5 мкм (ОИЯИ, Дубна, Россия). Затем пробу воды концентрировали на нитроцеллюлозных фильтрах SterivexTM-GS (“Millipore”, США) с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтры с биоматериалом фиксировали 80%-ным этиловым спиртом и хранили при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Выделение суммарной ДНК с фильтров проводили, используя комплект реагентов Ампли-Прайм® ДНК-сорб-В (“ИнтерЛабСервис”, Москва, Россия). ДНК элюировали и использовали в качестве матрицы в ПЦР на наборе Encyclo Plus PCR Kit (“Евроген”, Россия). В работе были использованы праймеры, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рРНК бактерий (500L–1350R) (Денисова и соавт., 1999).

Лигирование ампликонов осуществляли с помощью набора Clone JET™ PCR Cloning Kit (“Fermentas”, Литва) по прилагаемой инструкции. Подготовку компетентных клеток штамма *E. coli* DH5α и трансформацию проводили, используя стандартные методики (Sambrook et al., 1989). Сиквенсную реакцию вели с набором Big-Dye® Terminator (“Applied Biosystems”, США) согласно протоколу фирмы-производителя. В реакцию брали 10–20 нг ампликона и 3–5 пмоль праймера. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI3500 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США) в ГБУЗ “Областной онкологический диспансер” (Иркутск). Идентификацию проводили с помощью сравнительного анализа, используя он-лайн сервисы BLAST и FASTA. Выравнивание последовательностей и построение филогенетических деревьев проводили в программе MEGA v6.

Нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных, и им присвоены следующие номера (28 шт.): LT796232–LT796259.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В период проведения исследований глубина на стандартных станциях отбора проб в глубоководной части Рыбинского водохранилища находилась в пределах 5–12 м, температура поверхностного слоя воды составляла 18.7–22.2°C, придонного – 14.9–16.3°C. Прозрачность воды изменялась от 100 до 130 см и была ниже в Волжском плесе по сравнению с Центральным (табл. 1). Первичная продукция фитопланктона в период проведения исследований в Волжском плесе была ниже, чем в Центральном плесе: 352–669 и 462–1093 мг С/(м³ сут) соответственно (табл. 1). Однако в среднем за вегетационный сезон значение этого показателя максимальное на ст. Молога (Копылов и соавт., 2007). По-видимому, летнее развитие фитопланктона в начале июля начинается в центральной части водохранилища. Темновая ассимиляция CO₂ как интегральный показатель микробной активности, наоборот, была выше в Волжском плесе по сравнению с Центральным: 11.6–11.7 и 6.06–10.1 мг С/(м³ сут) соответственно (табл. 1).

Численность и биомасса ГНФ на ст. Молога достигали наибольших значений (5511×10^3 кл./мл)

и в среднем были выше в Волжском плесе по сравнению с Центральным. Численность вириопланктона на ст. Молога была ниже (55×10^6 частиц/мл), чем на ст. Коприно (77×10^6 частиц/мл), также расположенной в Волжском плесе. Отношение численности вирусов к численности бактерий на ст. Молога было в два раза ниже (7.8), чем на ст. Коприно (13.6), а также на других станциях, расположенных в Центральном плесе (табл. 1).

Численность и размерно-морфологическая структура бактериопланктона. Общая численность бактериопланктона изменялась в пределах $(4.4–7.8) \times 10^6$ кл./мл. На ст. Молога общая численность бактерий составила 7.0×10^6 кл./мл, средний объем клеток – 0.032 мкм³, биомасса – 224 мг/м³ (табл. 1). Биомасса бактериопланктона была меньше, чем на ст. Коприно Волжского плеса (336 мг/м³), но больше, чем на станциях Центрального плеса (127–188 мг/м³), за исключением ст. Брейтово (227 мг/м³).

В период проведения исследований основу бактериопланктона составляли мелкие и среднеразмерные клетки (табл. 2). Самые мелкие клетки (кокки) составляли большинство от численности бактериопланктона в восточной части Центрального плеса водохранилища: 63% (ст. Наволок) и 44% (ст. Измайлово). В западной части Центрального плеса, а также в Волжском плесе доминирование мелких кокков было менее значительным: 33% (ст. Брейтово) и 35% (ст. Молога) (табл. 2). В центральной части Центрального плеса и на речном участке Волжского плеса численно преобладали среднеразмерные кокки и коккобациллы: 37% (ст. Средний Двор) и 23% (ст. Коприно). Количество среднеразмерных кокков и коккобацилл, а также мелких палочек было примерно одинаковым на станциях Коприно, Наволок и Измайлово, тогда как на станциях Молога, Средний Двор и Брейтово была примерно одинаковой биомасса этих групп. Биомасса мелких палочек на всех станциях составляла 20–30% биомассы всего сообщества. Биомасса мелких и среднеразмерных кокков и коккобацилл была наиболее высокой на станциях Наволок и Средний Двор (более 60%), тогда как на остальных станциях она не превышала 50% общей биомассы бактериопланктона. На ст. Коприно в размерно-морфологической структуре бактериопланктона присутствовали крупные палочки, бактерии, агрегированные с детритом, а биомасса мелких и среднеразмерных кокков и коккобацилл составляла примерно 25% общей бактериальной биомассы (табл. 2).

Таксономическое разнообразие бактериопланктона. В результате молекулярно-генетического анализа бактериопланктона получено 58 нуклеотидных последовательностей, которые были отнесены к 26 операционным таксономическим единицам (ОТЕ) (табл. 3). Процент гомологии

Таблица 1. Гидрологические и микробиологические параметры воды на стандартных станциях Рыбинского водохранилища 07.07.2014

Параметры	Станции					
	Волжский плес		Центральный плес			
	Молога	Коприно	Наволоч	Измайлово	Средний Двор	Брейтово
Глубина, м	12	11	8	5	12	10
Прозрачность, см	100	100	120	130	110	110
$T_{\text{пов}}$, °С	20.4	18.7	18.7	19.5	19.1	22.2
$T_{\text{дно}}$, °С	14.9	15.7	16.0	16.3	15.5	16.0
N_{BAC} , $\times 10^6$ кл./мл	6.99	5.69	7.80	5.62	4.39	5.98
V_{BAC} , мкм ³	0.032	0.059	0.018	0.034	0.029	0.038
B_{BAC} , мг С/м ³	61.2	86.3	55.0	57.8	41.5	67.0
N_{HNF} , $\times 10^3$ кл./мл	5511	4101	1922	3076	1538	2050
B_{HNF} , мг/м ³	435	398	209	289	92	127
N_{VIR} , $\times 10^6$ частиц/мл	54.7	77.2	76.9	70.5	88.0	47.9
$N_{\text{VIR}}/N_{\text{BAC}}$	7.8	13.6	9.9	12.5	20.0	8.0
P_{PHY} , мг С/(м ³ сут)	669	352	1093	1034	882	462
DF CO ₂ , мг С/(м ³ сут)	11.7	11.6	10.1	6.93	6.27	6.06

Примечание. $T_{\text{пов}}$ и $T_{\text{дно}}$ – температура воды у поверхности и дна; N_{BAC} , V_{BAC} и B_{BAC} – численность, средний объем клеток и биомасса бактериопланктона; N_{HNF} и B_{HNF} – численность и биомасса ГНФ; N_{VIR} – численность вириопланктона; P_{PHY} – первичная продукция фитопланктона; DF CO₂ – темновая ассимиляция CO₂.

Таблица 2. Вклад различных размерно-морфологических групп в формирование общей численности и биомассы в сообществе бактериопланктона на стандартных станциях в Рыбинском водохранилище в летний период (07.07.2014)

Группа бактерий	Доля в N_{BAC} или B_{BAC} , %	Станции					
		Волжский плес		Центральный плес			
		Молога	Коприно	Наволоч	Измайлово	Ср. Двор	Брейтово
Мелкие кокки	N/N_{BAC}	34.8	22.1	63.2	43.9	33.6	33.3
	B/B_{BAC}	18.7	8.6	44.5	21.6	21.1	15.2
Среднеразмерные кокки и коккобациллы	N/N_{BAC}	31.3	23.5	17.8	15.1	37.5	28.5
	B/B_{BAC}	28.3	17.6	23.0	12.8	39.3	25.9
Крупные кокки	N/N_{BAC}	0.0	2.1	1.0	0.8	1.0	1.6
	B/B_{BAC}	0.0	6.1	3.7	2.2	2.6	3.8
Мелкие палочки	N/N_{BAC}	20.9	23.5	16.8	15.9	24.0	17.9
	B/B_{BAC}	28.4	21.8	26.9	23.8	30.5	21.8
Крупные палочки	N/N_{BAC}	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	B/B_{BAC}	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0
Агрегированные	N/N_{BAC}	13.0	28.7	1.3	24.3	3.9	18.7
	B/B_{BAC}	24.6	44.3	2.0	40.0	6.5	33.3

Примечание. Мелкие кокки – диаметр >0.35 мкм, среднеразмерные кокки и коккобациллы – 0.35–0.5 мкм, крупные кокки – >0.5 мкм, мелкие палочки – длина >2 мкм, крупные палочки – длиной ≥ 2 мкм и агрегированные (ассоциированные с детритом) бактерии. N_{BAC} и B_{BAC} – общая численность и биомасса бактериопланктона; N и B – численность и биомасса его отдельных размерно-морфологических групп.

полученных последовательностей с идентифицируемыми представителями из баз данных варьировал в диапазоне значений 91–100%.

В результате сравнительного анализа идентифицировано семь филумов эубактерий: *Proteobacteria* (7 ОТЕ), *Bacteroidetes* (7 ОТЕ), *Verrucomicrobia* (4 ОТЕ), *Firmicutes* (3 ОТЕ), *Actinobacteria* (1 ОТЕ), *Gemmatimonadetes* (1 ОТЕ) и *Acidobacteria* (1 ОТЕ). Кроме того, определена хлоропластная ДНК гаптофитовых и криптофитовых водорослей (табл. 3). Доминирующими генотипами отмечены неидентифицируемые и некультивируемые представители филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia*.

На основании сравнительного и филогенетического анализа с последовательностями типовых штаммов с высоким процентом гомологии идентифицированы представители следующих родов: *Sphingobium* (*Alphaproteobacteria*), *Ferrigenium* (*Betaproteobacteria*), *Hafnia*, *Serratia* и *Yersinia* (*Gamma**proteobacteria*), *Bacillus*, *Leuconostoc* и *Sedimentibacter* (*Firmicutes*), *Flavobacterium*, *Algoriphagus*, *Sediminibacterium* и *Terrimonas* (*Bacteroidetes*) (табл. 3, рис. 1а, 1б). Кроме того, определены представители таких видов, как *Candidatus Fonsibacter ubiqvis* (*Alphaproteobacteria*) и *Candidatus Nanopelagicus limnes* (*Actinobacteria*) (Neuenschwander et al., 2018; Tsementzi et al., 2019). Описание и идентификация данных организмов была сделана только на исследованиях их геномов.

На рис. 1а представлен филогенетический анализ представителей филума *Bacteroidetes*. Всего для этого филума получено четырнадцать последовательностей, который распределились на 7 ОТЕ. В классе *Flavobacteriia* последовательность ОТЕ 12 (клон Ворб-28) формирует кластер с ближайшими некультивируемыми гомологами в пределах рода *Flavobacterium*, гомология к которым составила 98%. Последовательность клона Ворб-52 (ОТЕ 13) образует кластер с последовательностями некультивируемых бактерий, при этом ближайшие последовательности типовых штаммов родов *Salinirepens*, *Fluviicola* и *Wandonia* с гомологией 93% образуют отдельные кластеры (рис. 1а, табл. 3). В классе *Cytophagia* последовательность ОТЕ 14 образует кластер с некультивируемыми бактериями в пределах рода *Algoriphagus* с высоким процентом гомологии (рис. 1а, табл. 3). В результате филогенетического анализа к классу *Chitinophagia* были отнесены четыре ОТЕ 15–18, которые формируют кластеры с последовательностями, полученными из других пресноводных экосистем, расположенных в различных географических зонах: водохранилище Греции и озер Китая, Швейцарии, Панамы. Однако только ОТЕ 17 и 18 можно определить на уровне рода как *Terrimonas* и *Sediminibacterium*, они находятся внутри кластеров типовых штаммов этих родов (рис. 1а). Очевидно, что

это могут быть новые виды в пределах описываемых родов.

Отдельная ветвь получена для ОТЕ 25 и 26, которые принадлежат хлоропластной ДНК фототрофных эукариот. ОТЕ 25 образовала кластер с гаптофитовыми одноклеточными водорослями *Chrysochromulina parva* (семь последовательностей) (рис. 1а, табл. 3). Две последовательности ОТЕ 26 с фотосинтезирующими одноклеточными эукариотическими криптофитовыми водорослями *Cryptomonas curvata* ССАР979/52.

Ветка *Alphaproteobacteria* включает в себя ОТЕ 1 и 2. Стоит отметить, что для ОТЕ 1 получено тринадцать последовательностей, которые имели гомологию 99.7% с последовательностью вида *Candidatus Fonsibacter ubiqvis* (рис. 1а). Для ОТЕ 2 ближайшим гомологом является вид *Sphingobium hydrophobicum*, также с высокой гомологией.

Нуклеотидные последовательности клонов Ворб-26, Ворб-113 и Ворб-151 образовали три кластера в пределах филы *Firmicutes* и распределились в три рода: *Bacillus*, *Leuconostoc* и *Sedimentibacter* (рис. 1а).

На рис. 1б представлен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей клонов Ворб-16 и Ворб-137, которые относятся к представителям класса *Betaproteobacteria*. В результате анализа последовательность клона Ворб-16 распределилась в семейство *Comamonadaceae* с гомологией 98.8%, с такими родами как *Rhodoferrax*, *Variovorax*, *Limnohabitans* и *Curvibacter*. Последовательность клона Ворб-137 принадлежит классу *Gallionellaceae*, ближайшим культивируемым видом является *Ferrigenium kumadai* с гомологией 98.8%, которая относится к железooksисляющим бактериям.

ОТЕ 5–7 принадлежат классу *Gamma**proteobacteria*, которые в результате филогенетического анализа были распределены на три рода: *Hafnia*, *Serratia* (*Enterobacteriaceae*) и *Yersinia* (*Yersiniaceae*) (рис. 1б).

К филуму *Verrucomicrobia* были отнесены ОТЕ 20–23, которые распределились в три класса: *Opitutae*, *Terrimicrobia* и *Verrucomicrobiae*, ближайшие гомологи которых являются некультивируемыми бактериями (рис. 1б).

Для ОТЕ 11 ближайшим родственником является вид *Candidatus Nanopelagicus limnes* с гомологией 99.55% (*Actinobacteria*) (табл. 3). Последовательность 16S рРНК данного вида не использовали в филогенетическом анализе, т.к. в базе зарегистрирован его полный геном.

Нуклеотидные последовательности клонов Ворб-57 и Ворб-64 принадлежат филумам *Gemmatimonadetes* и *Acidobacteria* соответственно. Ближайшими гомологами являются некультивируемые бактерии с высокой гомологией (рис. 1б).

Таблица 3. Таксономический статус ближайших гомологов нуклеотидных последовательностей 16S рДНК, полученных из интегральной пробы воды ст. Молога (Рыбинское водохранилище) и размеры их клеток

Номер ОТЕ	Название клона	Номер в базе	Количество последовательностей	Ближайший гомолог, %	Таксономия	Размеры клеток, мкм
<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>						
1	Вотб-7	LT796232	13	CP024034 <i>Candidatus Fonsibacter ubiquis</i> LSUCC0530, 99,78 JX448575 Uncultured bacterium clone BT3900DF_07G, 100 MT733969 <i>Sphingobium hydrophobicum</i> JZY5-15, 99.66	<i>Pelagibacteriales</i> , <i>Pelagibacteraceae</i> <i>Sphingomonadales</i> , <i>Sphingomonadaceae</i>	0.12–0.20 0.2–1.4 × 0.5–4.0
<i>Proteobacteria, Betaproteobacteria</i>						
3	Вотб-16	LT796234	1	HE814741 <i>Variovorax</i> sp. S2H12, 98.8 DQ535024 <i>Beta proteobacterium</i> LH10, 99.0	<i>Burkholderiales</i> , <i>Comamonadaceae</i>	0.5–0.6 × 1.2–3.0
4	Вотб-137	LT796235	1	LC065124.1 <i>Ferrigenium kumadaï</i> 98,32 JQ278768.1 Uncultured Rhodocyceae bacterium clone fjc-20, 98.77	<i>Nitrosomonadales</i> , <i>Gallionellaceae</i>	0.5–0.7 × 0.8–1.8
<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>						
5	Вотб-2	LT796236	4	LR699008 <i>Hafnia alvei</i> MGYG-HGUT-0250, 100.0	<i>Enterobacteriales</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	1.0 × 2.0–5.0
6	Вотб-46	LT796237	1	KP318037 <i>Serratia</i> sp. LT10-MRL, 99.89	<i>Enterobacteriales</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	0.5–0.8 × 0.9–2.0
7	Вотб-149	LT796238	1	EU434503 <i>Yersinia kristensenii</i> b355, 99.9	<i>Enterobacteriales</i> , <i>Yersiniaceae</i>	0.5–0.8 × 1.0–2.0
<i>Firmicutes</i>						
<i>Bacilli, Bacillales, Bacillaceae</i>						
8	Вотб-26	LT796239	1	KC354637 <i>Bacillus fumarioli</i> , 99.8	<i>Bacilli, Bacillales</i> , <i>Bacillaceae</i>	0.6–0.7 × 1.2–3.0
9	Вотб-113	LT796240	1	EF059533 <i>Sedimentibacter</i> sp. JN18_V27_1, 96.6 FJ672111 Uncultured bacterium clone LI42-3B3, 98.3	<i>Tissierella</i>	0.35 × 7.0
10	Вотб-151	LT796241	1	KF149330 <i>Leuconostoc lactis</i> TMAU32662, 99.8	<i>Bacilli, Lactobacillales</i> , <i>Leuconostocaceae</i>	0.5–0.7 × 0.7–1.2
<i>Actinobacteria</i>						
<i>Actinobacteriales, Actinomycetales, Actinomycetaceae</i>						
11	Вотб-49	LT796242	1	CP016768 <i>Candidatus Nanopelagicus limnes</i> MMS-21-122, 99.55 JN869205.1 Uncultured bacterium clone NS01 99.66		0.4–0.5 × 1.2
<i>Bacteroidetes, Flavobacteriia, Flavobacteriales</i>						
12	Вотб-28	LT796243	2	KF499997 <i>Flavobacterium</i> sp., 98.4–98.6	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.3–0.5 × 1.0–5.0
13	Вотб-52	LT796244	3	AB517714 <i>Salinirepens amamiensis</i> , 93.1–93.6 EU801372 Uncultured bacterium clone 3C002643, 99.9	<i>Cryomorphaceae</i>	0.3–0.8 × 1.0
<i>Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales</i>						
14	Вотб-21	LT796245	1	AB682160 <i>Algoriphagus aquatilis</i> NBRC 104237, 98.99 AJ697704 uncultured <i>Sphingobacteriales</i> bacterium clone SF68, 100	<i>Cyclobacteriaceae</i>	0.2–0.4 × 1.6–4.0

Таблица 3. Окончание

Номер ОТЕ	Название клона	Номер в базе	Количество последовательностей	Ближайший гомолог, %	Таксономия	Размеры клеток, мкм
<i>Bacteroidetes, Chitinophagia, Chitinophagales, Chitinophagaceae</i>						
15	Вор6-147	LT796246	3	MF040568.1 Uncultured bacterium clone DWI05E 99.78		1.0–2.0 × <4.0
16	Вор6-56	LT796247	1	KX990239 <i>Flavitalea</i> sp. Ap19E, 93.1 GU305721 Uncultured bacterium clone МУУ31, 99.7		0.2–0.4 × 1.7–2.0
17	Вор6-62	LT796248	1	KY060007 <i>Terrimonas</i> sp. C3-5, 96.5 FN668080 Uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp. clone ZS-2-342, 99.8		0.3–0.5 × 1.8–3.0
18	Вор6-104 Вор6-152	LT796249 LT796250	3	KC505149 <i>Sediminibacterium</i> sp. JJ2209, 96.5 FN668082 Uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp., clone ZS-2-52, 99.8		0.2–0.8 × 1.0–3.0
<i>Gemmatimonadetes</i>						
19	Вор6-57	LT796251	2	KF481682 <i>Gemmatimonas phototrophica</i> AP64, 91.3 EU803292 Uncultured bacterium clone 5C230840, 99.7	<i>Gemmatimonadales,</i> <i>Gemmatimonadaceae</i>	0.7–2.5 × 3.2
<i>Verrucomicrobia</i>						
20	Вор6-34	LT796252	4	NR_133878 <i>Terrimicrobium sacchariphilum</i> NM-5, 93.56 KP686964 Uncultured bacterium clone T6_0211_66, 99.78		0.5–0.7 × 0.6–1.2
21	Вор6-22	LT796253	1	GU305779 Uncultured bacterium clone МУУ38, 100	<i>Opitutae,</i> <i>Punicetococcales,</i> <i>Punicetococcaceae</i>	0.8–1.0
22	Вор6-10	LT796254	1	HM856557 Uncultured <i>Opitutae</i> bacterium clone YL196, 100		
23	Вор6-101	LT796255	1	HF947551 <i>Limisphaera ngatamarikiensis</i> NGM72.4, 91.4 HM856557 Uncultured <i>Opitutae</i> bacterium clone YL196, 100	<i>Verrucomicrobiae,</i> <i>Verrucomicrobiales</i>	0.5–0.8
<i>Acidobacteria</i>						
24	Вор6-64	LT796256	1	HF559177 <i>Geothrix fermentans</i> HradG1, 93.8 EU803771 Uncultured bacterium clone 5C231394, 99.7	<i>Holophagae,</i> <i>Holophagales,</i> <i>Holophagaceae</i>	0.1–2.0 × 3.0
<i>Eukaryota</i>						
25	Вор6-12 Вор6-59	LT796257 LT796258	7	MG520331 <i>Chrysochromulina parva</i> , 99.89–100.0 AB930789 Uncultured bacterium clone Fei_13Dec10m_67, 99.7–99.8	<i>Haptista;</i> <i>Haptophyta;</i> <i>Prymnesiophyceae;</i> <i>Prymnesiales;</i> <i>Chrysochromulinaceae</i>	3.0–50.0
26	Вор6-150	LT796259	1	LC484192 <i>Cryptomonas curvata</i> CСAP979/52, 99.1 MW128024 Uncultured bacterium clone SupB2020, 99.6	<i>Cryptophyta;</i> <i>Cryptomonadales;</i> <i>Cryptomonadaceae</i>	4.0–9.0

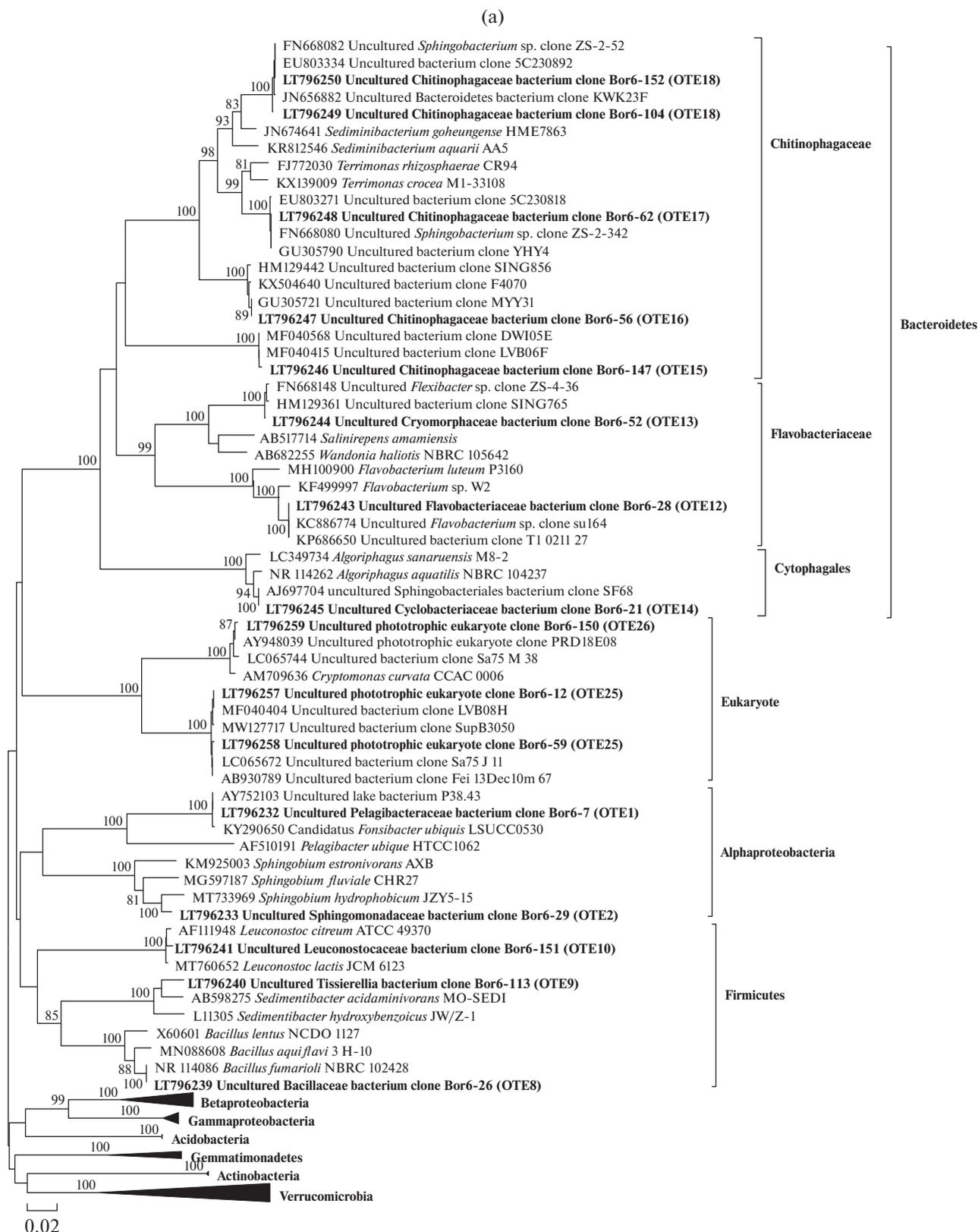


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное методом объединения ближайших соседей (Kimura 2-parameter model) по фрагменту гена 16S рРНК (850 п.н.). (а) – Представители филумов эубактерий *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria*, *Firmicutes*, а также *Eukaryota*; (б) – представители филумов *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Actinobacteria*. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. В круглых скобках указаны номера ОТЕ. Бутстреп-поддержка рассчитана с учетом 1000 реплик, значения меньше 80 не представлены. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар нуклеотидов.

(б)

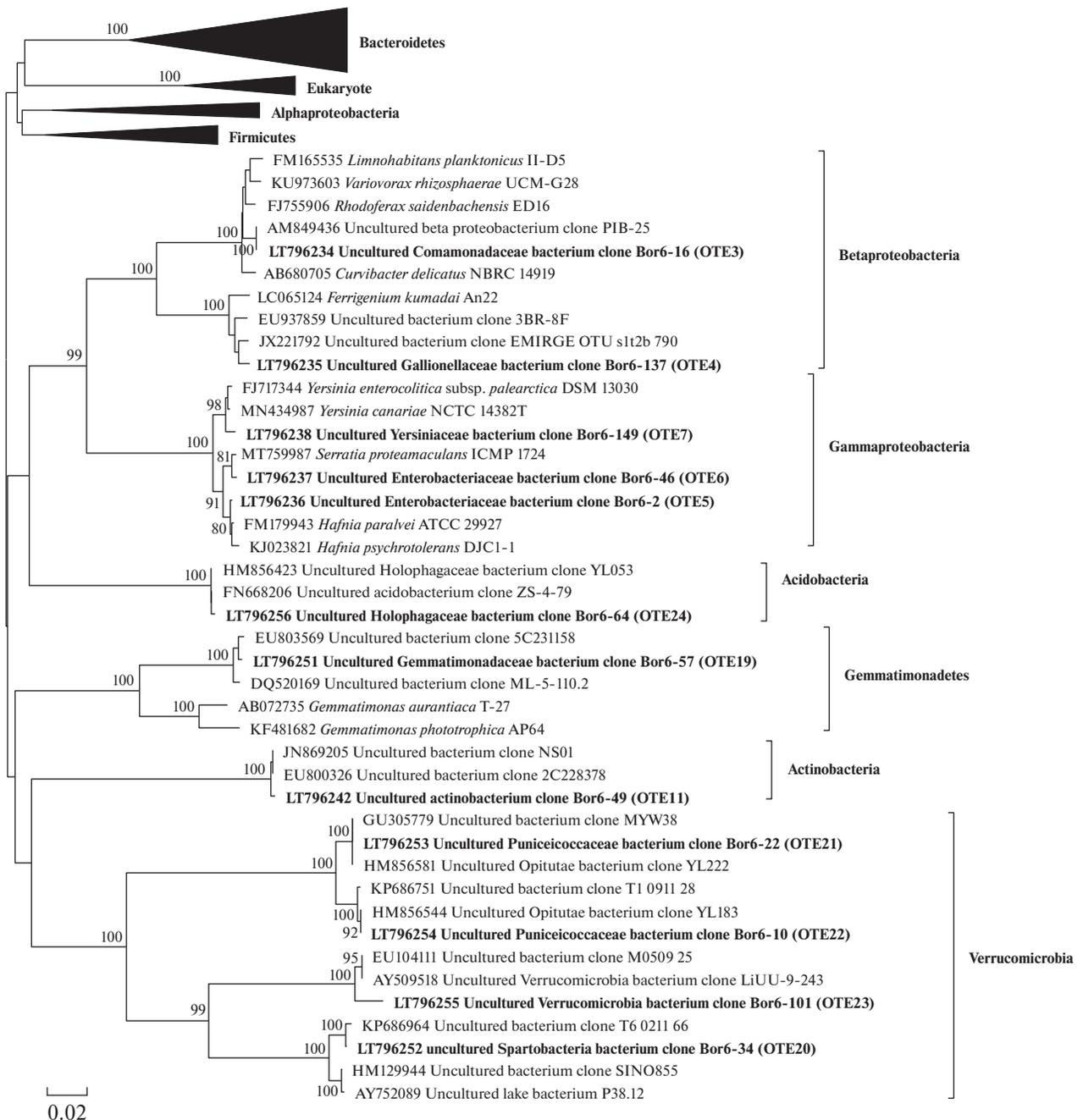


Рис. 1. Окончание

ОБСУЖДЕНИЕ

Размерно-морфологическая структура бактериопланктона. Основу бактериопланктона Рыбинского водохранилища, как и большинства других водоемов, составляют одиночные бактерии, занимающие более половины его биомассы. Доля бактерий, прикрепленных к детриту, увеличивается в летний период. В среднем за вегетационный сезон основной вклад в продукцию бакте-

риопланктона и его потребление консументами вносят крупные палочки (Копылов, Косолапов, 2008). Остальные группы бактерий имеют менее высокие скорости роста, проигрывают крупным палочкам конкурентную борьбу за субстраты, но при этом остаются разнообразными. В связи с благоприятными фотическими условиями, сравнительно высоким содержанием биогенных элементов и органических субстратов на ст. Молога

процессы первичной продукции планктона, продукции гетеротрофных бактерий и деструкции органических веществ протекают в 1.5–2 раза интенсивнее, чем на других участках водохранилища (Романенко, 1985; Копылов, Косолапов, 2008).

Отбор проб проводили в сезон, когда крупные палочки элиминируются естественным путем и в сообществе их становится значительно меньше, чем во время пиков количественного развития бактериопланктона, когда они могут составлять до 5% биомассы (Копылов, Косолапов, 2008). В начале июля в период уменьшения численности бактерий их продукция в Волжском плесе снижается до среднего уровня по водохранилищу (Копылов и соавт., 2007).

В период отбора проб на ст. Молога численность и биомасса ГНФ были сравнительно высокими, а численность вириопланктона низкой, по сравнению с другими участками. В бактериопланктоне, биомасса которого была также высокой, отсутствовали крупные палочки, а преобладали средне- и мелкоразмерные клетки. К развитию последних, по-видимому, приводит избирательное действие протистов и вирусов.

Ранее было показано, что в размерно-морфологической структуре бактериопланктона пресноводного озера в Австрии мелкие клетки (диаметром <0.4 мкм) составляют 15–33% его численности, но при этом занимают не более 6% общей биомассы (Pernthaler et al., 1996). Наиболее представлены в бактериопланктоне кокки диаметром ≥ 0.4 мкм и мелкие палочки (1.2×0.4 мкм), которые занимают до 70% общей биомассы сообщества, а крупные палочки ($>2.4 \times 0.4$ мкм) составляют 20–50% биомассы. Вероятно, в среднем за сезон приоритет в метаболизме сообщества у мелких кокков и крупных палочек, которые выигрывают конкурентную борьбу за субстраты, но наиболее уязвимы для консументов и вирусов. Клетки средних размеров проявляют активность в периоды элиминирования мелких клеток и крупных палочек, также они постоянно преобладают по численности и биомассе. В начале июля в Рыбинском водохранилище доминирующими морфотипами были мелкие палочки и кокки. Эти же группы в водохранилище Сербии составляли до 68% и до 40% численности бактериопланктона соответственно (Ciric et al., 2012).

Итак, сообщество планктонных бактерий на ст. Молога Рыбинского водохранилища активно функционирует даже в период понижения его количественных показателей на фоне развития ГНФ. Главная роль в выполнении основных функций сообщества переходит к мелким палочкам, рост и размножение которых ускоряется, а разнообразие остается на высоком уровне.

Таксономическое разнообразие бактериопланктона. Среди доминирующих филумов в бактерио-

планктоне Рыбинского водохранилища отмечены *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, а также *Verrucomicrobia*, что согласуется с опубликованными данными мировой литературы (Polverino et al., 2012; Iliev et al., 2017; Qu et al., 2018; Кузнецова и соавт., 2020).

Представители *Proteobacteria* включали три класса *Alpha*-, *Beta*- и *Gammaproteobacteria*. Разнообразие класса альфапротеобактерий на данной станции было низким, но по количественному показателю отмечено преобладание одного вида, который является многочисленным и широко распространенным в пресноводных экосистемах со сложными сезонными моделями аллохтонных и автохтонных источников углерода. Максимальная представленность (13 последовательностей) получена для ОТЕ 1, которая охарактеризована как *Candidatus Fonsibacter ubiquis* – это маленькие изогнутые палочки размером 1×0.2 мкм. Типовым материалом для этого вида является геном WB8_6_001, идентифицированный в пресноводных озерах вдоль реки Чаттахучи, США (Tsementzi et al., 2019). Бактерии отряда “*Ca. Pelagibacterales*”, обычно обозначаемые как SAR11, составляют самую многочисленную группу микробов в океанах. Бактерии SAR11 клады IIIb распространены глобально и исключительно в пресноводных средах, где они являются одними из наиболее доминирующих представителей, составляя до 20% сообществ озерных бактерий (Tsementzi et al., 2019).

Интересно отметить присутствие гаммапротеобактерий таких родов как *Hafnia*, *Serratia* и *Yersinia*, представители которых относятся к условно-патогенным микроорганизмам, что указывает на поступление антропогенного загрязнения исследуемого участка водохранилища. В летний период при высокой температуре поверхности воды (20°C) данные бактерии способны сохраняться длительное время. Кроме того, их присутствие в воде может указывать на высокую трофность водохранилища.

Следующей группой по представленности последовательностей стал филум *Bacteroidetes*. Филогенетический анализ показал высокое разнообразие полученных последовательностей, без доминирующего вида в этой группе. Большая часть последовательностей принадлежала семейству *Chitinophagaceae* и порядку *Flavobacteriales*. Представителей этой филы бактерий часто детектируют при интенсивном цветении водоемов (Fernandez-Gomez et al., 2013), кроме того ближайшие родственники были выделены из пресных озер и рек. В бактериопланктоне мезотрофного озера во Франции преобладали филумы *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* (Debroas et al., 2009). Экологическая роль бактерий филума *Bacteroidetes* состояла в потреблении и переработке гликана и углеводов.

Можно предположить, что выявленное в пелагиали Рыбинского водохранилища высокое разнообразие филума *Bacteroidetes* свидетельствует о том, что на этом участке активно метаболизируются легкоокисляемые органические вещества. Богатство представителей филума *Bacteroidetes* положительно коррелирует с продуктивностью вод, что обычно наблюдается у животных и растений, но в меньшей мере выявляется или отсутствует у других филумов эубактерий (Lindstrom, 2001).

Представители филума *Verrucomicrobia* образовали кластеры с некультивируемыми бактериями. Филум *Verrucomicrobia* содержит пресноводных представителей, которые остаются малоизученными на геномном, таксономическом и экологическом уровнях (Caballo-Yeves et al., 2017). Недавно были реконструированы геномы веррукомикробий из двух пресноводных водоемов, расположенных близко друг к другу (Тус и Амадорио, Испания). Эти геномы, собранные метагеномами (MAG), показывают таксономическое разнообразие внутри филума и включают широкий диапазон предполагаемых размеров генома (от 1.8 до 6 Мб). Среди всех изученных *Verrucomicrobia* был обнаружен один из самых маленьких геномов классов *Spartobacteria* и *Opiritae* (Caballo-Yeves et al., 2017). Некоторые из семейства *Opiritae* были небольшими, космополитичными, с общим гетеротрофным метаболизмом с предпочтением углеводов и способными к деградации ксилана, хитина или целлюлозы. Кроме того, получены большие копиотрофные геномы, которые содержат участки, ответственные за разложение полисахаридов и в целом имеют больше стратегий для поглощения питательных веществ и углеводного обмена (Caballo-Yeves et al., 2017). Выявлены геномы с интересными особенностями, например, обнаружены родопсины, поглощающие зеленый свет, и полный набор генов, участвующих в азотфиксации. Эти результаты подчеркивают разнообразие этой клады в пресноводных водах и еще больше расширяют и без того широкий эко-физиологический диапазон этих микробов (Caballo-Yeves et al., 2017).

Бактерии родов *Bacillus*, *Leuconostoc* и *Sedimentibacter* (*Firmicutes*) — крупные палочки с гетеротрофным типом питания, участвуют в разложении органических веществ, способны образовывать споры в неблагоприятный период развития. Вероятно, в бактериопланктоне присутствовали именно споровые формы, поскольку в размерно-морфологической структуре отсутствовали крупные палочки.

Хлоропластная ДНК определена для хризофитовых и гаптофитовых водорослей, которые характеризуются как фототрофные эукариоты, принадлежащие одноклеточным водорослям. Известно, что особи *Chrysochromulina* вырастают от 3.0 до 13.0 мкм

в длину. *Chrysochromulina*, как один из родов гаптофитовых водорослей, играет важную роль в глобальном связывании углерода и формировании токсичного цветения в Мировом океане (Cuvellier et al., 2010). Большинство гаптофитов являются фотосинтезирующими микроводорослями, а некоторые из них миксотрофны. Гаптофиты могут жить как в пресных, так и в морских водоемах. Такой комбинированный образ жизни делает гаптофиты эффективными организмами в глобальной фиксации углерода, и они занимают от 30 до 50% фотосинтетической биомассы в океане.

Минорными отмечены представители филумов *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*. Нуклеотидные последовательности, принадлежащие филумам *Gemmatimonadetes* и *Acidobacteria*, имеют не идентифицированных гомологов. Нуклеотидная последовательность клона Bor6-49 имеет ближайшего гомолога Candidatus *Nanopelagicus limnes* MMS-21-122 с гомологией 99.55% (*Actinobacteria*). Этот вид является одним из самых мелких бактерий, объем клетки 0.018 мкм³, размер генома 1.24 Мб, выделен из олигомезотрофного Цюрихского озера (Швейцария), которое характеризуется стойким ежегодным цветением токсичных цианобактерий *Planktothrix rubescens* (Neuenschwander et al., 2018). Уменьшение генома этих бактерий могло привести к ауксотрофии по различным витаминам, аминокислотам, тем самым создавая зависимость от сопутствующих организмов (гипотеза “Черной королевы”). Более того, анализ генома выявил удивительную степень меж- и внутривидового разнообразия метаболических путей, особенно транспорта и метаболизма углеводов. Поразительная микродиверсификация генотипов актинобактерий acI может объяснить их глобальный успех в высокодинамичных пресноводных средах со сложными сезонными моделями аллохтонных и автохтонных источников углерода (Neuenschwander et al., 2018).

Интересно отметить, что полученные данные в дальнейшем можно использовать для *in situ* гибридизации, чтобы оценить вклад каждой из таксономической групп в этот период развития бактериального сообщества. В результате проведенной префильтрации проб, мы отсекали агрегированные и крупные бактерии, тем самым изучили разнообразие одиночных средних и мелких микроорганизмов. Кроме того, интересно изучить таксономический состав бактериопланктона в период максимальных пиков развития с преобладанием крупных клеток. Эти исследования покажут полную картину разнообразия и структуры бактериопланктона Рыбинского водохранилища.

Таким образом, на станции Молога генетическое разнообразие бактериопланктона в летний период (июль) представлено филумами *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*,

Gemmatimonadetes, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*. Доминирующими отмечены альфапротеобактерии, бактериоиды и веррукомикробии, ближайшие гомологи которых, являются некультивируемыми и широко распространенными в пресных водоемах. Данные виды бактерий имеют маленькие размеры клеток и геномы, при этом активно участвуют в разложении органических веществ.

Впервые с помощью молекулярно-генетических методов изучено таксономическое разнообразие и соотнесено с размерно-морфологической структурой бактериопланктона Рыбинского водохранилища в летний период. Установлено высокое таксономическое разнообразие (26 ОТЕ) с преобладанием некультивируемых и неидентифицируемых бактерий. Результаты согласуются с мировыми публикациями и показывают, что Рыбинское водохранилище – это резервуар для развития широко распространенных бактерий из филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*. Кроме того, морфологическая структура бактериального сообщества подтверждает молекулярно-генетические исследования о присутствии и доминировании средне- и мелкоразмерных клеток, к которым относятся ближайшие гомологи полученных нуклеотидных последовательностей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доценту, к. б. н. Н.Л. Бельковой за помощь в получении результатов молекулярно-генетического анализа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ АААА-А18-118012690098-5) при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-34-50453 мол-нр).

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

Денисова Л.Я., Белькова Н.Л., Тулохонов И.И., Зайчиков Е.Ф. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // *Микробиология*. 1999. Т. 68. С. 475–483.

Denisova L.Ya., Bel'kova N.L., Tulokhonov I.I., Zaichikov E.F. Bacterial diversity at various depths in the southern part of

Lake Baikal as revealed by 16S rRNA sequencing // *Microbiology (Moscow)*. 1999. V. 68. P. 547–556.

Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Вирусы в планктоне Рыбинского водохранилища // *Микробиология*. 2007. Т. 76. С. 879–887.

Kopylov A.I., Kosolapov D.B., Zobotkina E.A. Viruses in the plankton of the Rybinsk Reservoir // *Microbiology (Moscow)*. 2007. V. 76. P. 782–790.

Копылов А.И., Косолапов Д.Б. Бактериопланктон водохранилищ Верхней и Средней Волги. М.: Изд-во совр. гум. универ., 2008. 377 с.

Кузнецова Е.В., Косолапов Д.Б., Белькова Н.Л. Разнообразие планктонных бактерий Дургунского и Тайширского водохранилищ (Западная Монголия) // *Микробиология*. 2020а. Т. 89. С. 604–611.

Kuznetsova E.V., Kosolapov D.B., Belkova N.L. Diversity of planktonic bacteria in Durgun and Taishir reservoirs (Western Mongolia) // *Microbiology (Moscow)*. 2020. V. 89. P. 595–602.

Кузнецова Е.В., Косолапов Д.Б., Косолапова Н.Г. Таксономическая и размерно-морфологическая структура двух водохранилищ Монголии // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2020б. № 1. С. 22–29.

Kuznetsova E.V., Kosolapov D.B., Kosolapova N.G. Taxonomic and size-morphological groups of bacterioplankton in two mongolian reservoirs // *Biology Bull.* 2020. V. 47. P. 27–34.

Минеева Н.М., Макарова О.С. Содержание хлорофилла как показатель современного (2015–2016 гг.) трофического состояния водохранилищ Волги // *Биол. внутр. вод*. 2018. № 3. С. 107–110.

Mineeva N.M., Makarova O.S. Chlorophyll content as indicator of the modern (2015–2016) trophic state of Volga River reservoirs // *Inland Water Biol.* 2018. V. 11. P. 367–370.

Раднагуруева А.А., Зайцева С.В., Лаврентьева Е.В. Таксономическое разнообразие микробного сообщества термальных источников Байкальской рифтовой зоны // *Биотехнология в интересах экономики и экологии Сибири и Дальнего Востока*. 2016. С. 98–100.

Романенко В.И. Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. Л.: Наука, 1985. 295 с.

Романенко В.И., Захарова Л.И., Романенко В.А. Оценка качества воды по микробиологическим показателям в Рыбинском водохранилище у г. Череповца // *Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища / Отв. ред. Флеров Б.А. Рыбинск: 1990. С. 24–41.*

Рыбакова И.В., Белькова Н.Л., Лаптева Н.А., Суханова Е.В. Адаптация молекулярно-генетических методов для изучения таксономического разнообразия, ассоциированных с макрофитами // *Биол. внутр. вод*. 2009. № 1. С. 102–110.

Rybakova I.V., Lapteva N.A., Sukhanova E.V., Bel'kova N.L. Adapting molecular-genetic methods for studying the taxonomic diversity of microbial communities associated with macrophytes // *Inland Water Biol.* 2009. V. 2. P. 96–103.

- Cabello-Yeves P.J., Ghai R., Mehrshad M., Picazo A., Camacho A., Rodriguez-Valera F.* Reconstruction of diverse verrucomicrobial genomes from metagenome datasets of freshwater reservoirs // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 2131. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02131>
- Caron D.A.* Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. V. 46. P. 491–498.
- Ciric S., Ilic Z., Milosevic B., Knezevic J., Spasic Z.* Abundance and morphotype diversity of bacterioplankton in Celijsko Reservoir, Serbia // *Fresen. Environ. Bull.* 2012. V. 21. № 6b. P. 1647–1653.
- Cuvelier M., Allen A., Monier A., McCrow J., Messié M., Tringe S., Woyke T., Welsh R., Ishoey T., Lee J.-H., Binder B.J., Dupont C.L., Latasa M., Guigand C., Buck K.R., Hilton J., Thiagarajan M., Caler E., Read B., Lasken R.S., Chavez F.P., Worden A.Z.* Targeted metagenomics and ecology of globally important uncultured eukaryotic phytoplankton // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 14679–14684.
- Debroas D., Humbert J.-F., Enault F., Bronner G., Faubladier M., Cornillot E.* Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (lac du Bourget – France) // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 2412–2424.
- Fernandez-Gomez B., Richter M., Schüller M., Pinhassi J., Acinas S.G., González J.M., Pedrós-Alió C.* Ecology of marine *Bacteroidetes*: a comparative genomics approach // *ISME J.* 2013. V. 7. P. 1026–1037.
- Iliev I., Yahubyan G., Marhova M., Apostolova E., Gozmanova M., Gecheva G., Kostadinova S., Ivanova A., Baev V.* Metagenomic profiling of the microbial freshwater communities in two Bulgarian reservoirs // *J. Basic Microbiol.* 2017. V. 57. P. 669–679.
- Karayanni H., Macingo S.C., Tolis V., Alivertis D.* Diversity of bacteria in lakes with different chlorophyll content and investigation of their respiratory activity through a long-term microcosm experiment // *Water.* 2019. V. 11. P. 467–482. <https://doi.org/10.3390/w11030467>
- Krambeck C., Krambeck H.-J., Overbeck J.* Microcomputer assisted biomass determination of plankton bacteria on scanning electron micrographs // *Appl. Environ. Microbiol.* 1981. V. 42. P. 142–149.
- Lindström E.S.* Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes // *Microbial Ecol.* 2001. V. 42. P. 598–605.
- Neuenschwander S.M., Ghai R., Pernthaler J., Salcher M.M.* Microdiversification in genome-streamlined ubiquitous freshwater *Actinobacteria* // *ISME J.* 2018. V. 12. P. 185–198.
- Noble R.T., Fuhrman J.A.* Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria // *Aquat. Microb. Ecol.* 1998. V. 14. P. 113–118.
- Pernthaler J., Sattler B., Simek K., Schwarzenbacher A., Psenner R.* Top-down effects on the size-biomass distribution of a freshwater bacterioplankton community // *Aquat. Microb. Ecol.* 1996. V. 10. P. 255–263.
- Polverino D., Marinelarena A.J., McCarthy C.B., Rivera-Pomar R.V.* Culture-independent characterization of the bacterioplankton community composition of a mesotrophic reservoir (Embalse Rio III, Argentina) // *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 2012. V. 83. P. 548–552.
- Porter K.G., Feig Y.S.* The use of DAPI for identifying and counting of aquatic microflora // *Limnol. Oceanogr.* 1980. V. 25. P. 943–948.
- Qu J., Jia C., Liu Q., Li Z., Liu P., Yang M., Zhao M., Li W., Zhu H., Zhang Q.* Dynamics of bacterial community diversity and structure in the terminal reservoir of the South-to North water diversion project in China // *Water.* 2018. V. 10. P. 709–722.
- Ruiz-Gonzalez C., Proia L., Ferrera I., Gasol J.M., Sabater S.* Effects of large river dam regulation of bacterioplankton community structure // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. V. 84. P. 316–331.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schiaffino M.R., Sanchez M.L., Gereá M., Unrein F., Balague V., Gasol J.M., Izaguirre I.* Distribution patterns of the abundance of major bacterial and archaeal groups in Patagonian lakes // *J. Plankton Res.* 2016. V. 38. P. 64–82.
- Simek K., Hornak K., Jezbera J., Nedoma J., Znachor P., Hejzlar J., Seda J.* Spatio-temporal patterns of bacterioplankton production and community composition related to phytoplankton composition and protistan bacterivory in a dam reservoir // *Aquat. Microb. Ecol.* 2008. V. 51. P. 249–262.
- The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria /* Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York: Springer-Verlag, 2006.
- Tsementzi D., Rodriguez-R.L.M., Ruiz-Perez C.A., Meziti A., Hatt J.K., Konstantinidis K.T.* Ecogenomic characterization of widespread, closely-related SAR11 clades of the freshwater genus “*Candidatus Fonsibacter*” and proposal of *Candidatus Fonsibacter lacus* sp. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 2019. V. 42. P. 495–505.
- Tsydenova B.V., Dagurova O.P., Garankina V.P., Dambaev V.B., Matafonov D.V., Baturina O.A.* Abundance and taxonomic composition of bacterioplankton in freshwater Lake Gusinoe (Buryatia) in the warm water zone of the Gusinozerskaya thermal power plant // *J. Siberian Fed. Univ. Biology.* 2018. V. 11. P. 356–366.
- Wei G., Li J., Wang N., Gao Z.* Spatial abundance and diversity of bacterioplankton in a typical stream-forming ecosystem, Huangqian Reservoir, China // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 24. P. 1308–1318.
- Yang X., Huang T., Zhang H.* Effects of seasonal thermal stratification on the functional diversity and composition of the microbial community in a drinking water reservoir // *Water.* 2015. V. 7. P. 5525–5546.

Taxonomic Diversity and Size-Morphological Structure of Bacterioplankton of the Rybinsk Reservoir

E. V. Kuznetsova^{1, *}, E. V. Sukhanova², and D. B. Kosolapov^{1, 3}

¹*Papanin Institute of Inland Water Biology, Russian Academy of Sciences, Borok, 152742 Russia*

²*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

³*Cherepovets State University, Cherepovets, 162600 Russia*

*e-mail: elivic.rum@gmail.com

Received December 30, 2020; revised January 20, 2021; accepted January 27, 2021

Abstract—This is the first report on investigation of bacterioplankton taxonomic composition in the Rybinsk Reservoir by molecular biological methods. A total of 58 nucleotide sequences obtained were assigned to 26 operational taxonomic units (OTUs), which belonged to *Eubacteria* (24 OTUs) and *Eukaryota* (2 OTUs). The diversity of bacterioplankton was represented by seven phyla of eubacteria: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, and *Acidobacteria*. Predominant organisms were alphaproteobacteria of the species “*Candidatus Fonsibacter ubiqvis*,” as well as unidentified members of the phyla *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia*, whose homologues are widespread in freshwater environments and have small genomes and cells. During the study period, small and medium-sized free-living cells predominated in bacterioplankton (70–99%), because they were the least vulnerable to eliminating control factors. The majority of the bacterial community was formed by cocci (50–80%), while a significant part of its biomass was accounted for by small rods (up to 2 μm in length) (20–30%).

Keywords: bacterial community, phylogenetic analysis, 16S rRNA, Sanger sequencing, taxonomic composition, size-morphological structure

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО
СООБЩЕСТВА ПЛОДОВЫХ ТЕЛ МИКСОМИЦЕТА
LYCOGALA EPIDENDRUM (L.) FR.

© 2021 г. Л. Р. Сизов^а, *, Л. В. Лысак^а, В. И. Гмошинский^б

^аФакультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^бБиологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова; ФГБУ

Государственный заповедник “Полистовский”, Москва, 119991 Россия

*e-mail: Leo.Sizoff@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.11.2020 г.

После доработки 30.12.2020 г.

Принята к публикации 04.01.2021 г.

При помощи метода высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК изучено таксономическое разнообразие бактериального сообщества на плодовых телах миксомицета *Lycogala epidendrum*. Выявлено присутствие представителей 31 рода бактерий, относящихся к шести филумам. В микробиоме доминирует филум *Proteobacteria*, на родовом уровне преобладают представители родов *Pseudomonas* и *Luteibacter*. Анализ таксономического разнообразия бактериальных сообществ показал, что сообщество *L. epidendrum* значительно уступает по разнообразию сообществам подстилки и валежника – субстратам, находящимся в непосредственной близости с плодовыми телами. Это свидетельствует в пользу селективной роли плодового тела миксомицета в отношении филума *Proteobacteria*, в первую очередь родов *Pseudomonas* и *Luteibacter*.

Ключевые слова: бактерии, миксомицеты, высокопроизводительное секвенирование, анализ библиотек генов 16S рРНК

DOI: 10.31857/S0026365621030149

Миксомицеты (*Myxomycetes* = *Myxogastrea*) – грибоподобные эукариотические организмы со сложным жизненным циклом, включающим вегетативные стадии в виде одноклеточных микроорганизмов (флагеллятные клетки, миксамебы) и надклеточных структур (плазмодий), генеративные стадии в виде плодовых тел (спорофоров), а также покоящиеся стадии (микроцисты, сферулы, склероции). В соответствии с современной классификацией миксомицеты, наряду с классами *Dictyosteliomycetes* и *Ceratiomyxomycetes*, образуют тип *Eumycetozoa* в пределах монофилетической группы *Amoebozoa* (Leontyev et al., 2019). Молекулярно-биологическими методами показано, что представители *Eumycetozoa* являются доминирующей группой почвенных простейших (Stephenson et al., 2011). На вегетативных стадиях миксомицеты потребляют путем фагоцитоза клетки бактерий, дрожжей, мицелий и споры грибов, простейших и водоросли. В составе фаготрофного комплекса миксомицеты способны влиять на численность бактерий в локусах их постоянного обитания в природных условиях (Feest, Madelin, 1988). Миксомицеты широко распространены в лесах уме-

ренного пояса. На территории России было обнаружено более 440 видов (Vortnikov et al., 2020).

Исследование бактериальных сообществ, ассоциированных с миксомицетами на разных стадиях жизненного цикла, представляет значительный интерес как для раскрытия биоценологических связей между этими организмами, так и для изучения вклада миксомицетов в формирование микробных сообществ почвы и сопряженных субстратов в лесном биоценозе.

Все стадии жизненного цикла миксомицетов в природе проходят в локусах, богатых бактериями. На примере *Dictyostelium discoideum* Rarey, принадлежащего к родственному миксомицетам классу *Dictyosteliomycetes*, продемонстрированы симбиотические взаимоотношения между бактериями и эукариотами. Бактерии рода *Burkholderia* обитают внутри амёб и способствуют сбору и запасанию съедобных бактерий внутри клетки-хозяина, что в итоге помогает *D. discoideum* выживать в бедной питательными ресурсами среде обитания (Haselkorn et al., 2018). В другом исследовании высказано предположение о возможной связи плазмодиев тропических миксомицетов и бактерий. Показано, что бактерии из семейства *Enterobacteriaceae*

ассоциированы с плазмодиями определенных видов миксомицетов, и такие плазмодии приобретают новые свойства (Kalyanasundaram, 2004). Изучение миксомицетов *Trichia decipiens* и *Metatrichia vesparia*, отобранных на территории Государственного природного заповедника “Нургуш” (Кировская область, РФ), выявило доминирование на спорофорах грамотрицательных бактерий, среди которых преобладали представители родов *Methylobacterium* и *Sphingobacterium*, причем практически все они были способны к синтезу ауксинов при росте на среде с триптофаном (Широких, Широких, 2016). В недавнем исследовании при помощи метода секвенирования были изучены бактериальные сообщества плодовых тел 112 видов миксомицетов. Преобладающие порядки бактерий были *Pseudomonadales*, *Rhizobiales*, *Sphingomonadales*, *Actinomycetales* и *Burkholderiales*. Среди родов доминировали *Acinetobacter* и *Pseudomonas*. Доминантные бактерии преимущественно наследовались от субстрата, тогда как минорные компоненты бактериального сообщества различались для разных видов миксомицетов (Li et al., 2017). Кроме того, были исследованы бактериальные сообщества плазмодиев миксомицетов порядка *Physarales*. Как и на плодовых телах, в сообществах плазмодиев преобладали *Proteobacteria*, и доминанты в плазмодиях происходили в основном из субстрата, а большое количество бактерий более редких таксонов было специфично для плазмодиев разных видов миксомицетов (Wang et al., 2020).

Ранее нами при изучении сапротрофного бактериального комплекса 13 видов лигнофильных миксомицетов в лесном биоценозе было показано, что на поверхности большинства плодовых тел миксомицетов в значительных количествах присутствуют культивируемые грамотрицательные бактерии родов *Cytophaga*, *Xanthomonas*, *Mucococcus*, *Aquaspirillum* и *Pseudomonas*. Созревающие плодовые тела создают в подстилке и почве микролокусы с повышенной концентрацией культивируемых грамотрицательных бактерий (Сизов и соавт., 2020).

Миксомицет *Lycogala epidendrum* (L.) Fr., плодовые тела которого рассматриваются в данной работе, – космополит, широко распространен на территории лесопарков Москвы и лесов Московской области (Гмошинский, 2013). Он имеет достаточно крупные и заметные (на ранних стадиях развития – кораллово-розовые) спорофоры, формирующиеся на гниющей древесине (валежнике), что облегчает поиск и отбор образцов. Кроме того, спороношения *L. epidendrum* покрыты плотным перидием, в результате чего, в отличие от многих других миксомицетов, у *L. epidendrum* сравнительно медленно разрушаются плодовые тела, и на них можно ожидать формирование устойчивых бактериальных ассоциаций.

Целью нашей работы было изучение таксономического разнообразия бактериального сообщества спорофоров миксомицета *Lycogala epidendrum* при помощи метода высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК тотальной ДНК и сравнение данного сообщества с сообществами лесной подстилки и валежника (гниющей древесины березы), на поверхности которого формируются плодовые тела.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Основным объектом исследования являются плодовые тела *Lycogala epidendrum*. Зрелые спороношения мы определили по морфологическим признакам (бурые крупные шаровидные спорофоры 4–7 мм в диаметре и сравнительно мелкие споры 6–7 мкм в диаметре). Сбор плодовых тел произвели с одного локуса в октябре 2018 года в Москве, в Битцевском лесопарке, в овраге к северу от Деревлевского ручья (N 55.645485, E 37.571095). Также отобрали образцы валежника (гниющей древесины березы), на котором развивались спорофоры *L. epidendrum*, и верхнего слоя подстилки рядом с валежником (листья березы и липы) для сравнения бактериальных сообществ этих субстратов с сообществом спорофоров *L. epidendrum*. До дальнейшей обработки образцы хранили в морозильной камере бытового холодильника (–18°C).

Выделение и анализ ДНК. Для экстракции ДНК использовали 3 спорофора *L. epidendrum* и по 0.25 г древесины и подстилки. Выделение проводили с помощью набора реактивов PowerSoil DNA Isolation Kit (“MO BIO”) по инструкции производителя, для спорофоров и подстилки проводили смыв микроорганизмов с их поверхности в суспензию.

Высокопроизводительное секвенирование участка гена 16S рРНК. Высокопроизводительное секвенирование проводили при помощи системы Illumina MiSeq (ООО “БИОСПАРК”, Троицк, Россия). Подготовку ДНК-библиотек для секвенирования осуществили с использованием технологии двустадийной полимеразной цепной реакции. На первом этапе производили амплификацию гипервариабельного V3–V4 участка гена 16S рРНК с использованием праймеров: Pro341F и Pro806R (Takahashi et al., 2014). На втором этапе амплифицировали ПЦР продукт, полученный на первом этапе, с целью баркодирования библиотеки. Впоследствии ДНК-библиотеки анализировали методом парно-концевого чтения (2 × 300 п.о.) генерацией не менее 10000 парных прочтений на образец.

Обработка данных секвенирования. Обработка данных была проведена с использованием автоматизированного алгоритма QIIME (Caporaso et al., 2010) и включала объединение прямых и обратных

прочтений, удаление технических последовательностей, фильтрацию химерных последовательностей. Для разбиения последовательностей на операционные таксономические единицы (ОТЕ) использовали алгоритм с открытым референсным порогом классификации 97%. Выравнивание прочтений на последовательность гена 16S рРНК и распределение последовательностей по таксономическим единицам провели с использованием базы данных Silva версии 132 (Pruesse et al., 2007).

С помощью программных пакетов QIIME мы определили индексы разнообразия, рассчитанные при объединении нуклеотидных последовательностей в ОТЕ с уровнем схожести в 97%. Для оценки альфа-разнообразия использовали индекс разнообразия Шеннона ($H = -\sum p_i \ln p_i$, где p_i – доля i -го вида в сообществе) и индекс выровненности Пиелу, который является нормировкой индекса Шеннона между 0 и 1 (Мэгарран, 1992). Различия между бактериальными сообществами исследуемых локусов (бета-разнообразие) анализировали вычислением матрицы расстояний с использованием коэффициента Брея–Кертиса (Bray, 1956) и метрики weighted UniFrac, при которой учитывается филогенетическая близость таксонов в сравниваемых сообществах (Lozupone et al., 2011). Полученные меры несходства бактериальных сообществ равны 0 при полной идентичности двух сообществ и 1 при полном отсутствии сходств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетическое разнообразие бактериальных сообществ. В результате проведенного высокопроизводительного секвенирования варибельного участка гена 16S рРНК была получена информация о филогенетическом разнообразии бактериальных сообществ спорифоров (плодовых тел) *L. epidendrum*, лесной подстилки и валежника.

Бактериальные сообщества плодовых тел *L. epidendrum* и подстилки состояли в основном из представителей филума *Proteobacteria* (соответственно, 98 и 84% от общего числа последовательностей). В подстилке, кроме того, значительную долю составили филумы *Bacteroidetes* (8.5%) и *Actinobacteria* (5.3%). В сообществе древесины валежника преобладали представители филумов *Acidobacteria* (47%) и *Proteobacteria* (45%) (рис. 1).

Анализ таксономического состава бактериального сообщества плодовых тел *L. epidendrum* выявил представителей 31 рода, принадлежащих к 6 филумам. Преобладающие в микробиоме протеобактерии принадлежали к 3 классам: *Gammaproteobacteria* (90% от числа всех последовательностей), *Alphaproteobacteria* (5%) и *Betaproteobacteria* (3%). Содержание представителей других филумов (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Chlorobi*) в сумме составило около 2%. Класс

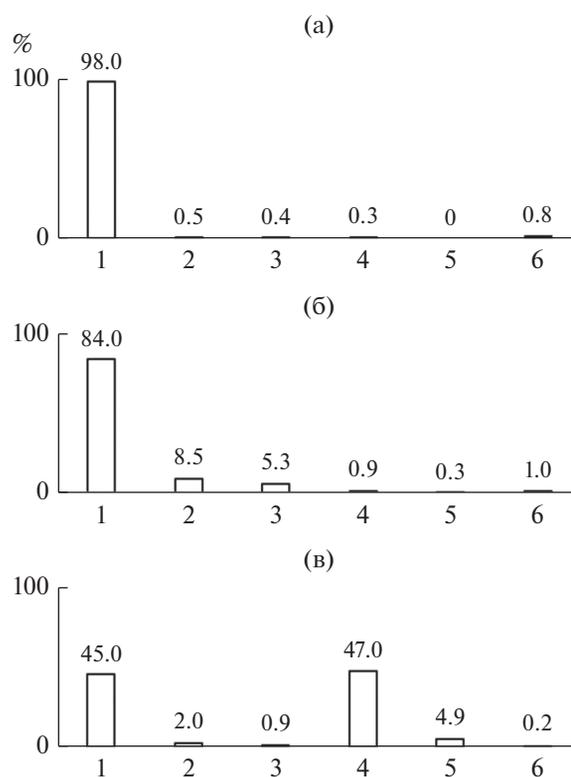


Рис. 1. Таксономическая структура бактериальных сообществ плодовых тел *L. epidendrum* (а); подстилки (б); валежника (в). Филумы (% от общего числа последовательностей в образце): 1 – *Proteobacteria*; 2 – *Bacteroidetes*; 3 – *Actinobacteria*; 4 – *Acidobacteria*; 5 – *Verrucomicrobia*; 6 – прочие.

Gammaproteobacteria был представлен четырьмя порядками: *Pseudomonadales*, *Legionellales*, *Enterobacteriales* и *Xanthomonadales*. Порядок *Pseudomonadales* был представлен доминирующим в сообществе родом *Pseudomonas* (79% от общего числа последовательностей), *Legionellales* включал один род *Aquicella*, среди *Enterobacteriales* было два рода – *Pantoea* и *Enterobacter*. Среди *Xanthomonadales* преобладал род *Luteibacter* (7%), а также присутствовали *Rhodanobacter*, *Stenotrophomonas* и *Dokdonella*. Класс *Alphaproteobacteria* был представлен родами *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Acidisoma*, *Acidiphilium* и *Roseomonas*. *Betaproteobacteria* были представлены, главным образом, некультивируемыми представителями семейства *Nitrosomonadaceae*. В следовых количествах присутствовали представители родов *Paraburkholderia*, *Massilia*, *Variovorax*, *Acidovorax* и некоторые другие. Из других филумов в качестве минорного компонента присутствовали роды *Lactobacillus* и “*Tyzzerella*” (филум *Firmicutes*), *Mucilagibacter* (филум *Bacteroidetes*), *Microbacterium*, *Jatrophihabitans* и *Streptomyces* (филум *Actinobacteria*) и *Terriglobus* (филум *Acidobacteria*). Филум *Chlorobi* был представлен лишь некультивируемыми представителями.

Таблица 1. Доминирующие роды в бактериальных сообществах плодовых тел *L. epidendrum* и сопряженных субстратов (% от общего числа последовательностей в образце)

Основные филогенетические группы	Доминирующие роды		
	плодовые тела <i>L. epidendrum</i>	подстилка	валежник
<i>Alphaproteobacteria</i>	—	<i>Sphingomonas</i> (3%), <i>Methylobacterium</i> (2%), <i>Zymomonas</i> (1%)	<i>Afipia</i> (3%), <i>Acidisoma</i> (2%), <i>Rhizomicrobium</i> (2%), <i>Phenyllobacterium</i> (2%), <i>Acidocella</i> (1%), <i>Bradyrhizobium</i> (1%)
<i>Betaproteobacteria</i>	—	<i>Massilia</i> (11%), <i>Variovorax</i> (3%)	—
<i>Gammaaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> (79%), <i>Luteibacter</i> (7%)	<i>Pseudomonas</i> (43%), <i>Luteibacter</i> (2%)	—
<i>Bacteroidetes</i>	—	<i>Spirosoma</i> (4%), <i>Hymenobacter</i> (3%)	<i>Mucilaginibacter</i> (2%)
<i>Actinobacteria</i>	—	<i>Actinoplanes</i> (2%)	—
<i>Acidobacteria</i>	—	—	<i>Granulicella</i> (35%)

Из 31-го рода бактерий девять встретились только на плодовых телах (*Dokdonella*, *Rhodanobacter*, *Pantoea*, *Aquicella*, *Noviherbaspirillum*, *Undibacterium*, “*Tyzzera*”, *Microbacterium* и *Streptomyces*), суммарно составляя долю в 1.74%. Девять родов из сообщества спорофоров были обнаружены также в древесине и подстилке — *Acidovorax*, *Paraburkholderia*, *Bradirhizobium*, *Acidisoma*, *Acidiphilium*, *Sphingomonas*, *Mucilaginibacter*, *Jatrophihabitans* и *Terriglobus* (суммарно 2.64%).

Таким образом, для бактериального сообщества спороношений *L. epidendrum*, характерно доминирование рода *Pseudomonas* (79%) и значительное содержание рода *Luteibacter* (7%) (табл. 1). В меньшей степени представлены роды грамотрицательных бактерий из филумов *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Chlorobi*. На последнем месте по обилию находятся грамположительные бактерии (*Firmicutes* и *Actinobacteria*). Доминирование рода *Pseudomonas* вполне закономерно. Бактерии из этого рода — обычные обитатели почв (Смирнов, Киприанова, 1990). Они обладают гибким метаболизмом, демонстрируют значительное физиологическое разнообразие и способны к колонизации различных экологических ниш. Многие представители рода *Pseudomonas* являются типичными копиотрофами. Однако среди *Pseudomonas* обнаружены и гидролитики, так, например, целлюлолитическая и хитинолитическая активность была обна-

ружена у бактерий *Pseudomonas fluorescens*, выделенных с плодовых тел трюфелей. Численность этих бактерий увеличивалась по мере созревания трюфелей, что позволило предположить их участие в разрушении стенок плодовых тел (Citterio et al., 2001). Схожую экологическую функцию род *Pseudomonas* может выполнять и на плодовых телах *L. epidendrum*, выполняя гидролиз внешних оболочек спорофоров (перидия), которые состоят из одного—двух слоев мукополисахаридов (Clark, Haskins, 2014). Бактерии вида *Luteibacter rhizovici-nus* были впервые выделены из ризосферы ячменя, и они, судя по описанию, являются копиотрофами, которые активно используют мономеры, но неспособны к разложению трудногидролизуемых субстратов (Johansen et al., 2005). Наличие большого количества копиотрофов среди бактерий, ассоциированных с плодовыми телами миксомицета, позволяет предположить, что многие бактерии являются трофическим окружением активных гидролитиков (мицелиальных грибов и актиномицетов), значительное присутствие которых было выявлено нами на поверхности плодовых тел (Сизов и соавт., 2020).

В микробиоме подстилки выявлено 80 родов бактерий из 11 филумов. Так же как на плодовых телах, в сообществе подстилки доминировали представители *Proteobacteria* (84%), меньшую долю составили филумы *Bacteroidetes* (8.5%) и *Acti-*

nobacteria (5.3%), еще ниже (менее 1%) было содержание филумов *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Chlorobi*, *Fusobacteria*, *Chloroflexi*, *Deinococcus–Thermus* (рис. 1).

Среди *Proteobacteria*, как и на плодовых телах миксомицетов, преобладали представители *Gammaproteobacteria* (52%), ниже было содержание *Betaproteobacteria* (17%) и *Alphaproteobacteria* (14%). В минорных количествах присутствовали *Deltaproteobacteria* и *Epsilonproteobacteria*. Среди *Gammaproteobacteria* в подстилке доминировали, как и в случае со спорофорами *L. epidendrum*, род *Pseudomonas* (43%), предположительно, со схожей экологической нишей, и род *Luteibacter* (2%), представители которого являются копиотрофами. *Betaproteobacteria* были представлены, главным образом, родами *Massilia*, *Variovorax*, *Acidovorax*. Бактерии *Massilia* sp. выделяются из разных природных местообитаний и также предпочитают потреблять легкодоступные соединения (Altankhuu, Kim, 2017). Бактерии рода *Variovorax* являются частью сапротрофного бактериального комплекса в экосистемах, разлагая различные органические соединения. Некоторые представители способны восстанавливать нитраты (Jin et al., 2012). Класс *Alphaproteobacteria* был представлен теми же родами, что и в сообществе плодовых тел – *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Caulobacter*. Кроме того, был выявлен род *Methylobacterium*, представители которого являются метилотрофами (Троценко и соавт., 2010). Среди *Deltaproteobacteria* были определены представители родов *Mucococcus*, *Sorangium*, *Polyangium*, *Bdellovibrio* и *Bacteriovorax*. *Epsilonproteobacteria* были представлены одним родом *Sulfuricurvum*. В отличие от сообщества плодовых тел в подстилке ощутимый вклад вносили также представители филумов *Bacteroidetes* (роды *Spirosoma*, *Hymenobacter*, *Flavobacterium*, *Mucilaginibacter*) и *Actinobacteria* (род *Actinoplanes*) (табл. 1). Таким образом, в этом локусе наблюдалось высокое разнообразие таксонов, представители которых входят в различные функциональные группы, что свидетельствует в пользу активных протекающих процессов деструкции органического вещества, поступающего на поверхность почвы.

Иная таксономическая структура была определена для бактериального сообщества валежника. В прокариотном сообществе древесины были выявлены представители 58 родов из 7 филумов. Здесь доминировали представители двух филумов: *Proteobacteria* (45%) и *Acidobacteria* (47%), меньшее содержание было у филумов *Verrucomicrobia* (4.9%), *Bacteroidetes* (2%) и *Actinobacteria* (0.9%). В минорных компонентах были определены филум *Saccharibacteria* и филум-кандидат ТМ6 (Yeoh et al., 2016) (рис. 1).

В микробиоме древесины в составе филума *Acidobacteria* доминировал род *Granulicella* (35%).

Бактерии этого рода были впервые изолированы из верховых торфяников Сибири и Ярославской области (Pankratov, Dedysh, 2010). Было показано, что представители этого рода проявляют высокую целлюлолитическую активность (Yamada et al., 2014). Таким образом, бактерии *Granulicella* способны участвовать в разложении древесины наряду с грибами, обитающими в этом локусе. Бактериальное сообщество древесины характеризовалось иным спектром родов филума *Proteobacteria* по сравнению с подстилкой и плодовыми телами. Среди *Alphaproteobacteria* преобладали роды *Afipia*, *Acidisoma*, *Rhizomicrobium*, *Phenylobacterium* и *Acidocella* (табл. 1). Бактерии родов *Acidisoma* и *Acidocella* были выделены из кислых почв и сфагнома, и также как и доминантный род *Granulicella*, предпочитают кислую реакцию среды (Kishimoto et al., 1995; Belova et al., 2009). Содержание представителей классов *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* было минорное, при этом доминанты родов *Pseudomonas* и *Luteibacter*, присущие сообществам плодовых тел и подстилки, определены не были. Из представителей других филумов вклад более 1% был лишь у рода *Mucilaginibacter* из филума *Bacteroidetes*. Представители этого рода выделяются из различных местообитаний (например, *Mucilaginibacter pineti* из древесины сосны) и активны в основном по отношению к легкодоступным субстратам (Paiva et al., 2014).

По числу обнаруженных филумов и родов сообщество плодовых тел *L. epidendrum* (31 род из 6 филумов) значительно уступало сообществам подстилки (80 родов из 12 филумов) и валежника (58 родов из 7 филумов). В подстилке зафиксировано наибольшее количество ОТЕ, определенных до рода, однако общее количество ОТЕ со сходством 97% было максимальным на древесине (186 ОТЕ) и минимальным на плодовых телах (55 ОТЕ). Наибольшее альфа-разнообразие сообщества, разноразнообразия на древесине, подтверждается величиной индекса Шеннона (5.5), ниже показатель для подстилки (4.7), минимальное значение зарегистрировано для сообщества плодовых тел *L. epidendrum* (0.8). Микробиомы лесной подстилки и валежника характеризуются большей выровненностью по сравнению с сообществом плодовых тел, что подтверждается значениями индекса выровненности Пиелу для подстилки и валежника (0.69 и 0.73 соответственно) и низким значением этого показателя для плодовых тел (0.14) (табл. 2). Различия между сообществами подстилки и спорофоров по метрикам weighted UniFrac и Брея–Кертиса принимали значения 0.91 и 0.97 соответственно, что меньше, чем для сообществ спорофоров и валежника (0.94 и 0.99). Это соотносится с тем, что по таксономической структуре бактериальное сообщество миксомицета ближе к сообществу подстилки, а не валежника. По-видимому, состав бактериального сообщества спороношений *L. epidendrum* не насле-

Таблица 2. Характеристика бактериальных сообществ спорофоров миксомицета, подстилки и валежника при помощи показателей разнообразия

Показатели	Фруктовые тела <i>L. epidendrum</i>	Подстилка	Валежник
Количество филумов	6	11	7
Количество определенных родов	31	80	58
Количество ОТЕ (97% сходства)	55	105	186
Индекс Шеннона	0.8	4.7	5.5
Индекс Пиелу	0.14	0.69	0.73

дуются полностью от субстрата, а зависит в большей мере от специфики перидия как среды обитания.

По результатам, которые мы получили ранее методом посева на поверхность плотной среды, сапротрофный бактериальный комплекс на плодовых телах *L. epidendrum* был представлен в основном родами *Cytophaga*, *Pseudomonas* и *Polyangium*, а также в некоторых посевах преобладал род *Xanthomonas* (последний, также как и *Luteibacter*, из семейства *Xanthomonadaceae*) (Сизов и соавт., 2020). Это свидетельствует в пользу того, что представители доминантных родов *Pseudomonas* и *Luteibacter*, которые были определены при анализе гена 16S рРНК тотальной ДНК, активно участвуют в процессах, происходящих на поверхности плодовых тел. Однако роды *Cytophaga* и *Polyangium* не были обнаружены высокопроизводительным секвенированием, что, возможно, связано с тем, что вне условий искусственной питательной среды представители этих родов составляют незначительную долю в сообществе.

Таким образом, на плодовых телах миксомицета *L. epidendrum* выявлено присутствие представителей шести филумов бактерий (31 род). Доминировал в микробиоме филум *Proteobacteria* (98%). На родовом уровне преобладали представители родов *Pseudomonas* (79%) и *Luteibacter* (7%), что связано с их гибким метаболизмом, способностью использовать широкий спектр мономеров, образующихся в результате распада внешней оболочки плодовых тел под действием гидролитиков (микробиот, актиномицетов). Бактерии, попадая внутрь спорофоров при их разрушении, могут служить потенциальным питательным субстратом для будущих миксамеб. Анализ таксономического разнообразия бактериальных сообществ показал, что сообщество *L. epidendrum* значительно уступало по разнообразию сообществам подстилки и валежника – субстратам, находящимся в контактной близости с плодовыми телами. Это свидетельствует в пользу селективной роли плодового тела

миксомицета в отношении филума *Proteobacteria*, в первую очередь родов *Pseudomonas* и *Luteibacter*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность м. н. с. О.Н. Щепину (лаб. систематики и географии грибов БИН РАН) за помощь в поиске литературы и анонимному рецензенту за обсуждение полученных результатов и правку в тексте работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа по сбору материала выполнена в рамках государственного задания МГУ, часть 2 (№ АААА-А16-116021660084-1). Идентификация образцов спороношений миксомицетов и их депонирование в коллекцию было поддержано грантом МГУ имени М.В. Ломоносова для поддержки ведущих научных школ МГУ “Депозитарий живых систем Московского университета” в рамках Программы развития МГУ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гмошинский В.И. Миксомицеты Москвы и Московской области. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 03.02.12. М.: Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова, 2013. 23 с.
- Мэггаран Э. Экологическое разнообразие и его изменение. М.: Мир, 1992. 184 с.
- Сизов Л.Р., Захарова Н.Б., Лысак Л.В., Гмошинский В.И. Микробные сообщества на плодовых телах миксоми-

- цетов в лесном фитоценозе // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2020. Т. 125. № 5. С. 29–35.
- Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. 262 с.
- Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
- Широких А.А., Широких И.Г. Фиторегуляторная активность бактерий, ассоциированных со спорофорами миксомицетов // Материалы II Международной научной конференции. “Биология, систематика и экология грибов и лишайников в природных экосистемах и агрофитоценозах”. Минск, 2016. С. 287–292.
- Altankhuu K., Kim J. *Massilia solisilvae* sp. nov., *Massilia terrae* sp. nov. and *Massilia agilis* sp. nov., isolated from forest soil in South Korea by using a newly developed culture method // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 3026–3032.
- Belova S.E., Pankratov T.A., Detkova E.N., Kaparullina E.N., Dedysh S.N. *Acidisoma tundrae* gen. nov., sp. nov. and *Acidisoma sibiricum* sp. nov., two acidophilic, psychrotolerant members of the *Alphaproteobacteria* from acidic northern wetlands // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 2283–2290.
- Bortnikov F.M., Matveev A.V., Gmoshinskiy V.I., Novozhilov Yu.K., Zemlyanskaya I.V., Vlasenko A.V., Schnittler M., Shchepin O.N. Myxomycetes of Russia: a history of research and a checklist of species // Karstenia. 2020. V. 58. P. 316–373.
- Bray J.R. A study of mutual occurrence of plant species // Ecology. 1956. V. 37. P. 21–28.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data // Nature Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.
- Citterio B., Malatesta M., Battistelli S., Marcheggiani F., Baffone W., Saltarelli R., Stocchi V., Gazzanelli G. Possible involvement of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillaceae* in structural modifications of *Tuber borchii* fruit bodies // Can. J. Microbiol. 2001. V. 47. P. 264–268.
- Clark J., Haskins E. Sporophore morphology and development in the myxomycetes: A review // Mycosphere. 2014. V. 5. P. 153–170.
- Haselkorn T.S., DiSalvo S., Miller J.W., Bashir U., Brock D.A., Queller D.C., Joan E. Strassmann J.E. The specificity of *Burkholderia* symbionts in the social amoeba farming symbiosis: Prevalence, species, genetic and phenotypic diversity // Mol. Ecol. 2018. V. 28. P. 847–862.
- Feest A., Madelin M.F. Seasonal population changes of myxomycetes and associated organisms in five non-woodland soils, and correlations between their numbers and soil characteristics // FEMS Microbiol. Ecol. 1988. V. 4. P. 141–152.
- Jin L., Kim K.K., Ahn C.Y., Oh H.M. *Variovorax de-fluvii* sp. nov., isolated from sewage // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1779–1783.
- Johansen J.E., Binnerup S.J., Kroer N. Mølbak L. *Luteibacter rhizovicinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 2285–2289.
- Kalyanasundaram I. A positive ecological role for tropical myxomycetes in association with bacteria // Syst. Geogr. Plants. 2004. V. 74. P. 239–242.
- Kishimoto N., Kosako N., Wakao N., Tatsuo T., Hiraishi A. Transfer of *Acidiphilium facilis* and *Acidiphilium aminolytica* to the genus *Acidocella* gen. nov., and emendation of the genus *Acidiphilium* // Syst. Appl. Microbiol. 1995. V. 18. P. 85–91.
- Leontyev D.V., Schnittler M., Stephenson S.L., Novozhilov Y.K., Shchepin O.N. Towards a phylogenetic classification of the Myxomycetes // Phytotaxa. 2019. V. 399. P. 209–238.
- Li S., Qi B., Peng X., Wang W., Wang W., Wang Q., Li Y. Bacteria diversity within myxomycetes based on 16S amplicon sequencing // The Ninth Int. Congr. on the Systematics and Ecology of Myxomycetes. Japan. Tanabe. Program and Abstracts. 2017. P. 43.
- Lozupone C., Lladser M.E., Knights D., Stombaugh J., Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison // ISME J. 2011. V. 5. P. 169–172.
- Paiva G., Abreu P., Proença D.N., Santos S., Nobre M.F., Morais P.V. *Mucilagibacter pineti* sp. nov., isolated from *Pinus pinaster* wood from a mixed grove of pines trees // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 2223–2228.
- Pankratov T.A., Dedysh S.N. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov., acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2951–2959.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner F.O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. P. 7188–7196.
- Stephenson S.L., Fiore-Donno A.M., Schnittler M. Myxomycetes in soil // Soil Biol. Biochem. 2011. V. 43. P. 2237–2242.
- Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing // PLoS One. 2014. V. 9. e105592.
- Wang Q., Li S., Qi B., Peng X., Dou W., Li Y. Study on the selection of environmental bacteria by plasmodia // Proc. of Tenth Int. Congr. on the Systematics and Ecology of Myxomycetes. Costa Rica, Turrialba. 2020. P. 23.
- Yamada K., Okuno Y., Meng X.Y., Tamaki H., Kamagata Y., Hanada S. *Granulicella cerasi* sp. nov., an acidophilic bacterium isolated from cherry bark // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 2781–2785.
- Yeoh Y.K., Sekiguchi Y., Parks D.H., Hugenholtz P. Comparative genomics of candidate phylum TM6 suggests that parasitism is widespread and ancestral in this lineage // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 915–927.

Taxonomic Diversity of the Bacterial Community Associated with the Fruiting Bodies of the Myxomycete *Lycogala epidendrum* (L.) Fr.

L. R. Sizov^{1, *}, L. V. Lysak¹, and V. I. Gmshinskii²

¹Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: Leo.Sizoff@yandex.ru

Received November 3, 2020; revised December 30, 2020; accepted January 4, 2021

Abstract—High-throughput sequencing of 16S rRNA genes was used to investigate the taxonomic diversity of the bacterial community inhabiting the fruiting bodies of the myxomycete *Lycogala epidendrum*. Members of 31 bacterial genera belonging to six phyla were revealed. The phylum *Proteobacteria* predominated in the microbiome, with *Pseudomonas* and *Luteibacter* as predominant genera. Analysis of the taxonomic diversity of bacterial communities revealed significantly lower diversity in the *L. epidendrum* community, compared to those of brushwood and litter adjacent to the fruiting bodies to the fruiting bodies. This is an indication of selective role of the myxomycete fruiting body in respect to the phylum *Proteobacteria* and especially to the genera *Pseudomonas* and *Luteibacter*.

Keywords: bacteria, myxomycetes, 16S amplicon sequencing, DNA barcoding

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

РАМНАН КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ АКТИНОБАКТЕРИЙ
РОДА *CURTObACTERIUM*

© 2021 г. В. А. Зайчиков^а, Н. В. Потехина^{а, *}, А. С. Дмитренко^б, Дин Фань^а,
Е. М. Тульская^а, Л. В. Дорофеева^с, Л. И. Евтушенко^с

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^бИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991 Россия

^сВсероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: potekhina56@mail.ru

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 24.11.2020 г.

Принята к публикации 26.11.2020 г.

С использованием химических и ЯМР-спектроскопических методов впервые установлено, что представители рода *Curtobacterium* (семейство *Microbacteriaceae*) содержат в клеточных стенках нейтральный гликополимер рамнан. Рамнан со структурой повторяющегося звена, $\rightarrow 2$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow , обнаружен у *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ВКМ Ас-1923^T, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* ВКМ Ас-1924^T, *C. pusillum* ВКМ Ас-2099^T, *C. herbarum* ВКМ Ас-2512^T и *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811. Каждый из изученных штаммов содержал также второй гликополимер – кислый бесфосфатный полисахарид. ЯМР-спектры этих полисахаридов различались, указывая на отличия в их структурах. В гидролизатах клеточных стенок всех изученных штаммов выявлены рамноза, манноза, глюкоза, галактоза и глюкозамин. Дальнейшие исследования позволят более полно охарактеризовать состав гликополимеров клеточных стенок различных видов куртобактерий и оценить их таксономическую значимость. Данные по структурам полимеров будут также способствовать пониманию механизмов колонизации и инфекции куртобактериями высших организмов, а также взаимодействия бактерий в микробных сообществах и с различными абиотическими объектами окружающей среды.

Ключевые слова: *Curtobacterium*, клеточная стенка, гликополимеры, рамнан

DOI: 10.31857/S0026365621030162

Изучение гликополимеров у микроорганизмов различных групп представляет интерес для многих областей фундаментальной и прикладной науки. Клеточные стенки актинобактерий и других грамположительных бактерий обычно содержат вторичные гликополимеры разных типов (классов), ковалентно связанные с пептидогликаном (Kohler et al., 2009; Potekhina et al., 2011; Тульская с соавт., 2011; Schade, Weidenmaier, 2016; Sadovskaya et al., 2017; Шашков с соавт., 2020).

Принятые сокращения: HSQC – протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; *J* – константа спин-спинового взаимодействия; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY – корреляционная спектроскопия; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; НМВС – гетероядерная корреляция через несколько связей; δ_C , δ_H – значения химических сдвигов атомов ¹³C и ¹H соответственно.

Наиболее изученными из них являются фосфат-содержащие полимеры, традиционно называемые тейхоевыми кислотами (Rautenberg et al., 2010; Potekhina et al., 2011). В меньшей степени известно о роли и распространении различных типов бесфосфатных гликополимеров.

Для рамнозосодержащих полимеров, обнаруженных у ряда грамположительных бактерий, было показано, что они являются своеобразными аналогами тейхоевых кислот по локализации и основным функциям в клетке (играют важную роль в биогенезе клеточной стенки и делении клетки, определяют адгезивные свойства и патогенность бактерий, являются рецепторами фагов) (Caliot et al., 2012; van Sorge et al., 2014; Mistou et al., 2016; Sadovskaya et al., 2017).

При сравнительном изучении состава клеточных стенок актинобактерий семейства *Microbacte-*

riaceae (роды *Clavibacter*, *Microbacterium* и *Rathayibacter*) были выявлены разнообразные по структуре рамнозосодержащие гликополимеры и показана их специфичность для изученных видов (Takeuchi et al., 1990; Ким с соавт., 2019; Шашков с соавт., 2020). Рамноза была обнаружена также у представителей других родов семейства *Microbacteriaceae*, в частности, *Curtobacterium* (Diaz-Maurino, Perkins, 1974; Takeuchi, Yokota, 1989; Takeuchi, Yokota, 1993; Aizawa et al., 2007).

Род *Curtobacterium* содержит в настоящее время 7 видов (*C. albidum*, *C. ammoniigenes*, *C. citreum*, *C. flaccumfaciens*, *C. herbarum*, *C. luteum*, *C. pusillum*) (<https://lpsn.dsmz.de/genus/curtobacterium>). Описанные виды ассоциированы с растениями или их местообитаниями, и лишь *C. pusillum* выделен из нефтяного месторождения (Iizuka, Komagata, 1965; Evtushenko, Takeuchi, 2006; Saddler et al., 2017). Ряд сообщений, однако, свидетельствует о том, что куртобактерии широко распространены в различных почвах и подпочвенных горизонтах (Chase et al., 2016; Yu et al., 2016; Wang et al., 2017), обнаруживаются в многолетней мерзлоте и ледниках Арктики (Sanyika et al., 2012; Wilhelm et al., 2012). Описано несколько случаев выделения представителей *Curtobacterium* из клинического материала (Funke et al., 2005; Francis et al., 2011; Rivera et al., 2012).

Некоторые виды *Curtobacterium* ранее были охарактеризованы по наличию и типу вторичных гликополимеров (отсутствие тейхоевых кислот и наличие бесфосфатных полисахаридов) (Diaz-Maurino, Perkins, 1974; Takeuchi, Yokota, 1989). Однако химические структуры полимеров установлены не были.

Целью настоящей работы было изучение гликополимеров клеточных стенок у 5 штаммов рода *Curtobacterium* с разной видовой принадлежностью и отличающихся по экологическим (биологическим) характеристикам и источникам выделения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы для исследований были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (<https://www.vkm.ru>) и включали фитопатогены *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ВКМ Ас-1923^T и *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* ВКМ Ас-1924^T, сапрофитов *C. herbarum* ВКМ Ас-2512^T (выделен из травяной подстилки) и *C. pusillum* ВКМ Ас-2099^T (из водного пласта нефтяного месторождения), а также *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811 с неустановленной видовой принадлежностью, изолированного из нематодного галла на стебле вейника (*Calamagrostis* sp.).

Выращивание культур и получение клеточных стенок проводили, как описано ранее (Potekhina et al., 2011).

Гликополимеры экстрагировали из клеточных стенок с помощью трихлоруксусной кислоты (10% ТХУ при 4°C 24 ч, и затем 5% ТХУ при 100°C 20 мин). Экстракты объединяли, диализовали, лиофилизировали с получением препарата гликополимеров (Potekhina et al., 2011).

Кислотный гидролиз клеточных стенок и препаратов гликополимеров проводили с использованием 2 М HCl (3 ч, 100°C). Для нисходящей хроматографии и электрофореза использовали бумагу "Filtrak FN-3" (Германия) и различные системы растворителей (Potekhina et al., 2011). Фосфатсодержащие соединения проявляли реактивом Ишервуда; соединения, содержащие аминогруппу – нингидрином; полиолы и моносахариды – 5%-ным AgNO₃; восстанавливающие моносахариды – анилинфталатом (Potekhina et al., 2011).

Абсолютную конфигурацию рамнозы определяли модифицированным методом с использованием ГЖХ ацетилованных гликозидов с (*S*)-октан-2-ол, как описано (Potekhina et al., 2011).

Разделение препаратов гликополимеров (на колонке с DEAE-целлюлозой) и ЯМР-эксперименты проводили, как описано ранее (Шашков с соавт., 2020).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ кислотных гидролизатов клеточных стенок всех пяти штаммов и выделенных из них препаратов гликополимеров показал, что они содержат одинаковый набор сахаров (рамноза как доминирующий сахар, манноза, глюкоза, галактоза и глюкозамин) в разных соотношениях. У штамма *C. herbarum* ВКМ Ас-2512^T дополнительно присутствовала фукоза (табл. 1). Фосфорные эфиры глицерина и других полиолов обнаружены не были. Полученные результаты указывали на отсутствие тейхоевых кислот и наличие бесфосфатных гликополимеров.

Исследование препаратов гликополимеров с использованием методов ЯМР-спектроскопии показало, что каждый из пяти штаммов содержит в клеточной стенке нейтральный полисахарид рамнан, а также второй полимерной кислотой природы. Развернутое описание анализа ЯМР-спектроскопических данных приведено для препарата из клеточной стенки штамма ВКМ Ас-1811.

В аномерной области спектра ЯМР ¹³C препарата гликополимеров, выделенного с помощью экстракции ТХУ, было обнаружено два набора сигналов различной интенсивности: более интенсивные сигналы при δ_C 102.2 и 103.3 м.д. и несколько менее интенсивных при δ_C 97–104 м.д. Спектр содержал сигнал карбоксильной группы

Таблица 1. Сахара клеточных стенок пяти изученных штаммов *Curtobacterium*

Штаммы <i>Curtobacterium</i>	Сахара клеточной стенки (2 М HCl, 3 ч, 100°C)							
	Gal	Glc	Man	Fuc	Rib	Rha	Амино-сахар	Gro
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> ВКМ Ac-1923 ^T	+++	+	++	–	+	+++	GlcN, GalN	сл
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i> ВКМ Ac-1924 ^T	+++	+	++	–	+	++++	GlcN, GalN	сл
<i>C. herbarum</i> ВКМ Ac-2512 ^T	сл	++	++++	+	сл	++++	GlcN, GalN	+
<i>Curtobacterium</i> sp. ВКМ Ac-1811	+++	+	++	–	–	++++	GlcN	+
<i>C. pusillum</i> ВКМ Ac-2099 ^T	сл	+	++	–	–	++++	GlcN	+

Таблица 2. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹³C и ¹H нейтрального полисахарида рамнана, из клеточной стенки *Curtobacterium* sp. ВКМ Ac-1811

Остаток	Химические сдвиги ЯМР ¹³ C (δ_C TSP* – 1.6) и ¹ H (δ_H TSP 0.0)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
<i>Нейтральный полисахарид, рамнан</i>						
→2)-α-L-Rhap-(1→ R	102.2	79.4	71.3	73.0	70.4	18.0
	5.18	4.07	3.94	3.56	3.81	1.27
→3)-α-L-Rhap-(1→ R'	103.3	71.2	78.9	73.6	70.7	18.1
	4.96	4.15	3.85	3.50	3.76	1.31

* TSP – натриевая соль 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты.

при δ_C 175 м.д. и метила пируватной группы при δ_C 26.4 м.д. и выглядел как спектр смеси кислого и нейтрального полимеров. В результате хроматографического разделения препарата гликополимеров было получено две фракции – с нейтральным и кислым полисахаридами.

Спектр ¹³C ЯМР нейтрального полисахарида (табл. 2, рис. 1) был типичным для регулярного полимера с дисахаридным повторяющимся звеном. Спектр содержал два сигнала в области аномерного углеродного резонанса при δ_C 102.2 и 103.3 м.д., восемь сигналов в области –CH–O– при δ_C 70–80 м.д. и два сигнала при δ_C 18.0 и 18.1 м.д.

Спектр ЯМР ¹H (рис. 2) отображал два сигнала в аномерной области при δ_H 4.96 и 5.18 м.д. с малыми значениями *J*, два высокопольных дублета (δ_H 1.27 м.д., *J* 6 Гц и δ_H 1.31 м.д., *J* 6 Гц) и сигналы в области δ_H 3.55–4.2 м.д. Кроме того, в спектре ¹H ЯМР наблюдали минорные сигналы кислого полимера.

Спектры ¹H и ¹³C ЯМР были расшифрованы с помощью двумерных гомоядерных и гетероядерных методик. В спектрах ¹H, ¹H COSY и TOCSY выявлены два остатка α-рамнопиранозы (α-Rhap) в качестве компонентов повторяющегося звена полисахарида.

Анализ спектров ¹H, ¹³C HSQC (рис. 3, табл. 2) показал замещение одного из остатков α-Rhap в положение 2 (химический сдвиг C-2 при 79.4 м.д.) и второго остатка α-Rhap в положение 3 (C-3 при 78.9 м.д.).

Линейность полимерной цепи была доказана с помощью анализа спектра ¹H, ¹H ROESY (табл. 2),

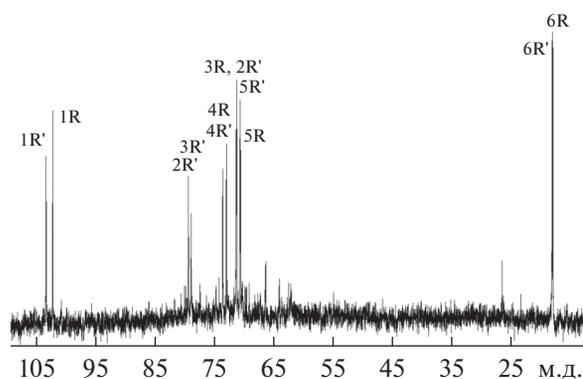


Рис. 1. Спектр ¹³C ЯМР нейтрального полисахарида из клеточной стенки *Curtobacterium* sp. ВКМ Ac-1811. Обозначения приведены в соответствии с табл. 1. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных как в табл. 2.

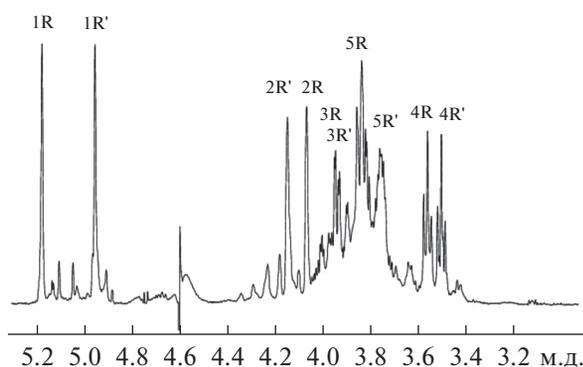
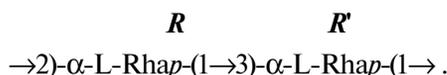


Рис. 2. Спектр ^1H ЯМР нейтрального полисахарида из клеточной стенки *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811. Обозначения приведены в соответствии с табл. 1. Арабские цифры относятся к номерам атомов протонов в остатках, обозначенных как в табл. 2.

где наблюдали корреляционные пики между остатками Н-1(*R*)/Н-3(*R'*) и Н-1(*R'*)/Н-2(*R*) (5.18/3.85 и 4.96/4.07). Структура полисахаридной повторяющейся единицы была подтверждена анализом спектра ^1H , ^{13}C НМВС (табл. 2), в котором были видны пики корреляции между остатками Н-1(*R*)/С-3(*R'*) и Н-1(*R'*)/С-2(*R*) (5.18/78.9 и 4.96/79.4).

Таким образом, нейтральный полисахарид, с учетом абсолютной L-конфигурации рамнозы, является линейным рамнаном со следующей структурой повторяющегося звена:



Анализ ЯМР-спектров нейтральных фракций гликополимеров четырех других исследованных штаммов куртобактерий показал их полную идентичность с аналогичными спектрами штамма ВКМ Ас-1811, что свидетельствовало об идентичности структур выявленных рамнанов.

Как отмечено ранее, препараты гликополимеров клеточных стенок бактерий всех 5 изученных штаммов содержали также кислые полисахариды, ЯМР-спектры которых имели различия, которые указывали на отличия в структуре полимеров. Предварительный анализ спектров показал присутствие в структуре кислых гликополимеров из штаммов *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ВКМ Ас-1923^T и *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811, наряду с моносахаридными остатками – остатков пировиноградной кислоты (в виде 4,6-связанного пирувата галактозы).

Таким образом, нами установлено, что клеточные стенки актинобактерий рода *Curtobacterium* содержат, наряду с пептидогликаном В-типа (вариация В2 β , D-орнитин в тетрапептидной цепочке) (Schleifer, Kandler, 1972; Saddler et al., 2017), нейтральный гликополимер рамнан с повторяющимся звеном, $\rightarrow 2) \text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$, и

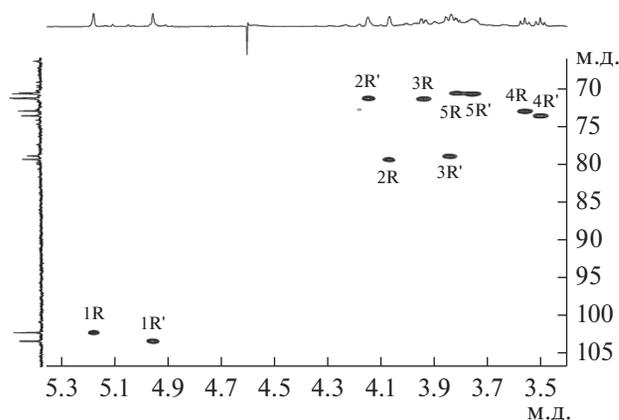


Рис. 3. Часть ^1H , ^{13}C -HSQC-спектра нейтрального полисахарида из клеточной стенки *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных как в табл. 2.

кислые бесфосфатные полимеры, структуры которых пока не установлены. К общим характеристикам исследованных штаммов следует отнести также набор сахаров (рамноза, манноза, глюкоза, галактоза и глюкозамин), определяемый в кислотных гидролизатах клеточных стенок и выделенных из них препаратов гликополимеров (по методам, описанным в работе Potekhina et al., 2011). У представителей всех видов рода (*C. albidum*, *C. ammoniigenes*, *C. citreum*, *C. flaccumfaciens*, *C. herbarum*, *C. luteum*, *C. pusillum*), как показано ранее (Diaz-Maurino, Perkins, 1974; Takeuchi, Yokota, 1989) и подтверждено или установлено в настоящей работе, отсутствуют теихоевые кислоты и гликозил-1-фосфатные полимеры.

Интересно отметить, что вышеперечисленные характеристики свойственны всем изученным штаммам (видам) рода, вне зависимости от их экологических (биологических) особенностей и источника выделения.

Несмотря на то, что рамноза и рамнозосодержащие полимеры встречаются в клеточных стенках многих актинобактерий, рамнаны (основная цепь полимера состоит только из остатков рамнозы) были описаны в единичных случаях, а именно, у актинобактерий родов *Bifidobacterium* и *Rathayibacter* (структуры приведены на сайте <https://www.csdb.glycoscience.ru>). Ранее различные по структуре рамнаны были описаны у бактерий родов *Streptococcus* и *Lactococcus* (полимеры, ковалентно связанные с пептидогликаном) (Messner, Schaffer, 2003; Sadovskaya et al., 2017). Рамнаны также были идентифицированы у спорообразующих бактерий семейств *Bacillaceae* и *Paenibacillaceae* (в составе гликопротеинов S-слоя) и разных родов филума *Proteobacteria* (как

О-полисахариды) (<https://www.csdb.glycoscience.ru>). Следует отметить, что наличие остатков рамнозы в гликополимерах поверхностных структур клетки некоторых бактерий связывают с адгезией, образованием биопленок и патогенностью (фитопатогенностью) (Clifford et al., 2013; Michael et al., 2016; Mistou et al., 2016).

Присутствие в клеточной стенке рамнана с повторяющимся звеном $\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-($1 \rightarrow 3$)- α -L-Rhap-($1 \rightarrow$ является одной из хемотаксономических характеристик изученных видов и, по-видимому, рода *Curtobacterium* в целом. Дальнейшие исследования позволят установить структуры кислых полисахаридов и оценить возможность их использования в качестве хемотаксономических признаков видов. Результаты исследований будут также способствовать пониманию роли гликополимеров в процессах колонизации и инфекции куртобактериями высших организмов, выяснению механизмов взаимодействия бактерий в микробных сообществах и с различными абиотическими объектами окружающей среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

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

- Ким Д., Тульская Е.М., Дмитренко А.С., Стародумова И.П., Дорофеева Л.В. Сравнительное изучение двух штаммов рода *Clavibacter* // Всероссийская конф. с международным участием "Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии". М.: Макс-Пресс, 2019. С. 58.
- Наумова И.Б., Шашков А.С. Анионные полимеры клеточных стенок грамположительных бактерий // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 947–982.
- Наумова И.В., Шашков А.С. Anionic polymers in cell walls of gram-positive bacteria // Biochemistry (Moscow). 1997. V. 62. P. 809–840.
- Тульская Е.М., Шашков А.С., Стрешинская Г.М., Сенченко С.Н., Потехина Н.В., Козлова Ю.И., Евтушенко Л.И. Тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты актиномицетов // Биохимия. 2011. Т. 76. № 7. С. 904–913.
- Tul'skaya E.M., Shashkov A.S., Streshinskaya G.M., Senchenkova S.N., Potekhina N.V., Kozlova Y.I., Evtushenko L.I. Teichuronic and teichulosonic acids of actinomycetes // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 736–744.
- Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитренко А.С., Потехина Н.В., Сенченко С.Н., Пискункова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Рамноманнаны и тейхуроносовая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^T // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 428–437.
- Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Piskunkova N.F., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Rhamnomannans and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 369–377.
- Aizawa T., Ve N.B., Kimoto K.I., Iwabuchi N., Sumida H., Hasegawa I., Sasaki S., Tamura T., Kudo T., Suzuki K.I., Nakajima M., Sunairi M. *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 1447–1452.
- Caliot E., Dramsi S., Chapot-Chartier M.P., Courtin P., Kulakauskas S., Pechoux C., Trieu-Cuot P., Mistou M.Y. Role of the Group B antigen of *Streptococcus agalactiae*: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis // PLoS Pathog. 2012. V. 8. e1002756.
- Chase A.B., Arevalo P., Polz M.F., Berlemont R., Martiny J.B. Evidence for ecological flexibility in the cosmopolitan genus *Curtobacterium* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 1874.
- Clifford J.C., Rapicavoli J.N., Roper M.C. A rhamnose-rich O-antigen mediates adhesion, virulence, and host colonization for the xylem-limited phytopathogen *Xylella fastidiosa* // Mol. Plant Microbe Interact. 2013. V. 26. P. 676–685.
- Diaz-Maurino T., Perkins H.R. The presence of acidic polysaccharides and muramic acid phosphate in the walls of *Corynebacterium poinsettiae* and *Corynebacterium betae* // J. Gen. Microbiol. 1974. V. 80. P. 533–539.
- Evtushenko L.I., Takeuchi M. Family Microbacteriaceae // The Prokaryotes. 3rd ed. / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. N.Y.: Springer Science, 2006. P. 1020–1098.
- Francis M.J., Doherty R.R., Patel M., Hamblin J.F., Ojaimi S., Korman T.M. *Curtobacterium flaccumfaciens* septic arthritis following puncture with a Coxspur Hawthorn thorn // J. Clin. Microbiol. 2011. V. 49. P. 2759–2760.
- Funke G., Aravena-Roman M., Frodl R. First description of *Curtobacterium* spp. isolated from human clinical specimens // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 1032–1036.
- Iizuka H., Komagata K. Microbiological studies on petroleum and natural gas. III. Determination of *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Alcaligenes*, and *Achromobacter* isolated from oil-brines in Japan // J. Gen. Appl. Microbiol. 1965. V. 11. P. 1–14.
- Kohler T., Xia G., Kulauzovic E., Peschel A. Teichoic acids, lipoteichoic acids, and related cell wall glycopolymers of Gram-positive bacteria // Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications / Eds. Moran A.,

- Holst O., Brennan P.J., von Itzstein M. Amsterdam: Elsevier, 2009. Ch. 5. P. 75–91.
- Messner P., Schaffer C. Prokaryotic glycoproteins // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe) / Eds. Chakraborty D.P., Krohn K., Messner P., Roy S., Schaffer C. Vienna: Springer, 2003. V. 85. P. 51–124.
- Michael V., Frank O., Bartling P., Scheuner C., Goker M., Brinkmann H., Petersen J. Biofilm plasmids with a rhamnose operon are widely distributed determinants of the 'swim-or-stick' lifestyle in roseobacters // ISME J. 2016. V. 10. P. 2498–2513.
- Mistou M.Y., Sutcliffe I.C., van Sorge N.M. Bacterial glycobiochemistry: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in gram-positive bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2016. V. 40. P. 464–479.
- Potekhina N.V., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Shashkov A.S. Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria // Methods in Microbiology / Eds. Rainey F.A., Oren A. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2011. V. 38. Ch. 6. P. 131–164.
- Rautenberg M., Kohler T., Xia G., Kulauzovic E., Peschel A. Structure, biosynthesis, and function of teichoic acids and related cell wall glycopolymers in the Gram-positive cell envelope // Prokaryotic Cell Wall Compounds / Eds. König H., Claus H., Varma A. Berlin: Springer, 2010. P. 155–174.
- Rivera R., Cheema A., Mai J., Oehler R.L., Sandin R.L., Greene J.N. *Curtobacterium* brain abscess: case report // Infect. Dis. Clin. Pract. 2012. V. 20. P. e17–e19.
- Saddler G.S., Guimaraes P.M., Hamada M., Suzuki K.I. *Curtobacterium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. De Vos P., Dedysh S., Hedlund B., Kampfer P., Rainey F., Trujillo M.E., Bowman J.P., Brown D.R., Glockner F.O., Oren A., Paster B.J., Wade W., Ward N., Busse H.J., Reysenbach A.L. UK: John Wiley and Sons, Ltd., 2017. Version 2. P. 1–16.
- Sadovskaya I., Vinogradov E., Courtin P., Armalyte J., Meyrand M., Giaouris E., Palussiere S., Furlan S., Pechoux C., Ainsworth S., Mahony J., van Sinderen D., Kulakauskas S., Guerardel Y., Chapot-Chartier M.P. Another brick in the wall: a rhamnan polysaccharide trapped inside peptidoglycan of *Lactococcus lactis* // mBio. 2017. V. 8. e01303-17.
- Sanyika T.W., Stafford W., Cowan D.A. The soil and plant determinants of community structures of the dominant actinobacteria in Marion Island terrestrial habitats, Sub-Antarctica // Polar Biol. 2012. V. 35. P. 1129–1141.
- Schade J., Weidenmaier C. Cell wall glycopolymers of *Firmicutes* and their role as nonprotein adhesins // FEBS Lett. 2016. V. 590. P. 3758–3771.
- Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // Bacteriol. Rev. 1972. V. 36. P. 407–477.
- Takeuchi M., Yokota A. Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria // J. Gen. Appl. Microbiol. 1989. V. 35. P. 233–252.
- Takeuchi M., Yokota A. Evaluation of cell-wall sugar composition as a taxonomic marker of some coryneform bacteria // J. Gen. Appl. Microbiol. 1993. V. 39. P. 505–512.
- Takeuchi M., Yokota A., Misaki A. Comparative structures of the cell-wall polysaccharides of four species of the genus *Microbacterium* // J. Gen. Appl. Microbiol. 1990. V. 36. P. 255–271.
- van Sorge N.M., Cole J.N., Kuipers K., Henningham A., Aziz R.K., Kasirer-Friede A., Lin L., Berends E.T.M., Davies M.R., Dougan G., Zhang F., Dahesh S., Shaw L., Gin J., Cunningham M., Merriman J.A., Hütter J., Lepenies B., Rooijackers S.H.M., Malley R., Walker M.J., Shattil S.J., Schlievert P.M., Choudhury B., Nizet V. The classical lancefield antigen of group a *Streptococcus* is a virulence determinant with implications for vaccine design // Cell Host Microbe. 2014. V. 15. P. 729–740.
- Wang Q., Wang R., He L., Sheng X. Location-related differences in weathering behaviors and populations of culturable rock-weathering bacteria along a hillside of a rock mountain // Microb. Ecol. 2017. V. 73. P. 838–849.
- Wilhelm R.C., Radtke K.J., Mykytczuk N.C., Greer C.W., Whyte L.G. Life at the wedge: the activity and diversity of Arctic ice wedge microbial communities // Astrobiology. 2012. V. 12. P. 347–360.
- Yu Y., Sheng X., He L., Huang Z. Linkage between culturable mineral-weathering bacteria and their weathering effectiveness along a soil profile // Geomicrobiol. J. 2016. V. 33. P. 10–19.

Cell Wall Rhamnan in Actinobacteria of the genus *Curtobacterium*

V. A. Zaichikov¹, N. V. Potekhina^{1,*}, A. S. Dmitrenok², Ding Fan¹, E. M. Tul'skaya¹,
L. V. Dorofeeva³, and L. I. Evtushenko³

¹Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

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

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

*e-mail: potekhina56@mail.ru

Received September 30, 2020; revised November 24, 2020; accepted November 26, 2020

Abstract—Presence of the neutral glycopolymer rhamnan was established for members of the genus *Curtobacterium* (family *Microbacteriaceae*) using chemical and NMR spectroscopic methods. The rhamnan with the repeating unit, $\rightarrow 2$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow), was found in *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfa-*

ciens VKM Ac-1923^T, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* VKM Ac-1924^T, *C. pusillum* VKM Ac-2099^T, *C. herbarum* VKM Ac-2512^T, and *Curtobacterium* sp. VKM Ac-1811. Each of the studied strains also contained a second, acidic, phosphate-free polysaccharide. NMR spectra of these polysaccharides differed, indicating the structural differences. Cell wall hydrolysates of all studied strains were found to contain rhamnose, mannose, glucose, galactose, and glucosamine. Further research will facilitate more detailed characterization of the composition of cell wall glycopolymers in *Curtobacterium* species, as well as evaluation of their taxonomic significance. The data on the polymer structure will contribute to understanding of the mechanisms of colonization and infection of higher organisms by *Curtobacterium* species and of bacterial interaction in microbial communities and with abiotic environmental objects.

Keywords: *Curtobacterium*, cell wall, glycopolymers, rhamnan

ПРИРОДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПЕКТИНАЗНЫХ ГЕНОВ *PGU* ДРОЖЖЕЙ РОДА *SACCHAROMYCES*

© 2021 г. Е. С. Наумова^{а, *}, А. Н. Боровкова^{а, b}, М. Ю. Шаламитский^с, Г. И. Наумов^а

^аГосударственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра “Курчатовский Институт”, Москва, 117519 Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра микологии и альгологии, Москва, 119234 Россия

^сВсероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарач” Российской академии наук, Ялта, 298600 Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 11.12.2020 г.

После доработки 12.01.2021 г.

Принята к публикации 22.01.2021 г.

Изучено распространение и особенности пектиназных генов *PGU* у дрожжей *Saccharomyces* разной видовой принадлежности. С помощью молекулярного кариотипирования и Саузерн-гибридизации установлено, что дрожжи *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают только одним геном *PGU*, расположенным в хромосоме X. У остальных трех видов обнаружены полимерные гены *PGU* разной хромосомной локализации: *S. mikatae* и *S. jurei* (хромосомы X и VIII), *S. bayanus* (X, I и XIV). Впервые проведен сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *PGU* у всех восьми видов рода *Saccharomyces*. Обнаружена видоспецифичность генов *PGU*, а также их внутривидовой полиморфизм у дрожжей *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus*, связанный с географическим происхождением штаммов. Наиболее дивергентными являются белки Pgu1a (*S. arboricola*) и Pgu1b, Pgu2b, Pgu3b (*S. bayanus*), уровень сходства которых с белками Pgu остальных видов *Saccharomyces* не превышал 89%. Наибольшее сходство (>95%) отмечено для белков Pgu *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, а также *S. mikatae* и *S. jurei*. Наблюдался значительный внутривидовой полиморфизм секреции эндо-полигалактуроназы у изученных видов *Saccharomyces*. Исключением является вид *S. bayanus*, все изученные штаммы которого обладали достаточно высокой активностью. По-видимому, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью этих дрожжей.

Ключевые слова: дрожжи *Saccharomyces*, гены *PGU*, пектиназа, эндо-полигалактуроназа, пектин, филогенетический анализ, молекулярное кариотипирование

DOI: 10.31857/S0026365621030113

Пектин – полисахарид растительного происхождения, состоящий из соединенных между собой $\alpha(1-4)$ -гликозидной связью остатков галактуроновой кислоты, присутствующих в виде метилового эфира. Являясь структурным элементом растительных тканей, пектин способствует устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Содержание пектиновых веществ в ягодах винограда зависит от сорта и составляет от 0.5 до 5 г/л. Известно, что даже незначительное содержание пектиновых веществ в вине может приводить к появлению коллоидных помутнений и засорению фильтров (Van Rensburg, Pretorius, 2000). Расщепление высокомолекулярных пектиновых веществ растительно-го происхождения является сложным процессом с участием нескольких ферментов, основным из ко-

торых является пектиназа (эндо-полигалактуроназа, К.Ф. 3.2.1.15). В виноделии для биохимического гидролиза пектиновых соединений используют коммерческие, как правило, неочищенные ферментные препараты грибов *Aspergillus* и *Trichoderma*, в которых, помимо эндо-полигалактуроназы, могут присутствовать примеси и ферменты с нежелательной побочной активностью, например, пектин-эстеразная, приводящей к повышению содержания метанола в вине (Louw et al., 2006). В этой связи, целесообразно в качестве стартовых культур в виноделии использовать штаммы сахаромикетов, обладающие высокой пектинолитической активностью.

Род *Saccharomyces* включает восемь видов: *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. jurei*, *S. mikatae* и *S. paradoxus*

(Naumov et al., 2000a; Kurtzman, 2003; Wang, Bai, 2008; Vaughan-Martini, Martini, 2011; Naseeb et al., 2017). Традиционно в виноделии используются дрожжи *S. cerevisiae*, для которых не характерна пектинолитическая активность (Fernández-González et al., 2004; Divol, Rensburg, 2007; Louw et al., 2010). Большинство изученных штаммов этого вида не способны расщеплять пектин или обладают очень слабой пектинолитической активностью. Это может быть связано с мутациями в кодирующем эндо-полигалактуроназу структурном гене *PGU1* (псевдоген), его полным отсутствием или с мутациями в регуляторных генах. Высокой пектинолитической активностью обладает французский шампанский штамм SCPP (Gainvors et al., 1994; Gognies et al., 1999), который, согласно гибридологическому и кариотипическому анализам, относится к виду *S. bayanus* (Naumov et al., 2001a). В отличие от штаммов *S. cerevisiae*, имеющих по одному гену *PGU*, дрожжи *S. bayanus* обладают тремя полимерными генами *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b* (Наумов и соавт., 2016a, 2016b; Наумова и соавт., 2019). В отличие от *S. cerevisiae*, дрожжи *S. bayanus* способны расти при пониженных температурах и часто выделяются при более позднем сборе ягод винограда (Naumov, 1996; Наумов и соавт., 2011). Доказана большая роль этих дрожжей в производстве белых, сладких и игристых вин, а также сидра (Naumov et al., 1993, 2000b, 2001b, 2002; Panon et al., 1995; Torriani et al., 1999; Rementeria et al., 2003). Вид *S. paradoxus* встречается повсеместно, его штаммы часто выделяются из сокоотечений широколиственных деревьев, насекомых, неокультуренных почв, листьев растений и гораздо реже с различных ягод, включая виноград. Недавно показано, что выделенный с виноградников в Хорватии штамм *S. paradoxus* RO88 характеризуется высокой пектинолитической активностью (Eschstruth, Divol, 2011).

Ничего не известно о пектинолитической активности остальных видов рода *Saccharomyces*: *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. jurei* и *S. mikatae*. Эти дрожжи выделяются из различных природных источников: в разных регионах мира. Интересно отметить, что многие коммерческие штаммы, используемые в виноделии Франции, Испании, Австрии, Швейцарии и Австралии, являются межвидовыми гибридами с участием дрожжей *S. kudriavzevii*: *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* (Naumova et al., 2005; Pérez-Torrado et al., 2018).

Целью настоящего исследования является изучение распространения и особенностей пектиназных генов *PGU* разных видов рода *Saccharomyces* на материале штаммов различного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Происхождение изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces* приведено в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°C на полной среде YPD состава (г/л): бакто-агар – 20, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20.

Пектинолитическая активность. Скрининг на наличие пектинолитической активности осуществляли согласно Louw et al. (2010) в нашей модификации. Дрожжи культивировали в течение 1 сут на твердой YPD среде. Суточные культуры дрожжей уколом микробиологической петли высевали на минимальную среду с полигалактуроновой кислотой (PG) следующего состава (г/л): дрожжевая азотная основа с аминокислотами (“Difco”, США) – 6.7, полигалактуроновая кислота (“Sigma”, США) – 12.5, глюкоза – 10, агар (“Difco”, США) – 20, Na₂HPO₄ – 6.8 (рН 4.0). Культивировали при 28°C в течение 3 сут, затем выросшие колонии дрожжей смывали дистиллированной водой и визуализацию производили 6 М раствором HCl. Ферментативную активность определяли по четким зонам гидролиза (ореолам) полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей. Чашки Петри фотографировали и определяли размер ореолов с помощью ПО IC Measure 2.0.0.272 (www.helicon.ru). Для каждого штамма были проведены два независимых эксперимента. Размер ореолов указывал на способность различных штаммов разлагать полигалактуроновую кислоту. В качестве контроля использовали запатентованный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718, обладающий высокой пектинолитической активностью (Патент SU 1495368). Этот штамм является экспериментально полученным полипloidом винного штамма Кокур-3.

Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК и Саузерн-гибридизация. Приготовление препаратов хромосомных ДНК описано ранее (Наумова и соавт., 1993). Электрофоретическое разделение хромосомных ДНК проводили на аппарате CHEF-DR III (“Bio-Rad”, США) при 200 В в следующем режиме: 15 ч при времени переключения полей 60 с и 8 ч при времени переключения полей 90 с. В качестве буфера использовали 0.5× TBE (45 мМ Трис-HCl, рН 8.0, 10 мМ EDTA, 45 мМ борная кислота), охлажденный до 14°C. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в УФ-свете. В качестве кариотипического стандарта использовали штамм *S. cerevisiae* YNN 295 (“Bio-Rad”, США), имеющий известный порядок и размеры хромосом.

После пульс-электрофореза хромосомные ДНК переносили вакуумным методом на нитроцеллюлозную мембрану на аппарате “Vacuum blotter” (“Bio-Rad”, США). ДНК фиксировали на мембране отжигом при 80°C в течение 2 ч. В каче-

Таблица 1. Изученные штаммы дрожжей *Saccharomyces*, их происхождение и пектинолитическая активность

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*
<i>S. arboricola</i>		
CBS 10644 (Т)	Кора дуба <i>Quercus fabric</i> , Китай	3.5
AS 2.3319	Кора каштана <i>Castanopsis orthacantha</i> , Китай	5.0
AS 2.3318	Кора каштана <i>Castanopsis orthacantha</i> , Китай	8.9
NRRL Y-63703	Плодовое тело <i>Auricularia polytricha</i> , Тайвань	6.1
<i>S. bayanus</i>		
CBS 7001	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания	15.5
UWO(PS) 99-808	Нектар <i>Nothofagus</i> sp., Патагония, Аргентина	10.7
148.01	Экссудат вяза <i>Ulmus pumila</i> , Благовещенск, Россия	13.9
РУСС 6866	Кора <i>Nothofagus cunninghamii</i> , Тасмания, Австралия	14.6
TBVIc2.95	Бродящая мезга, Бордо, Сотерн, Франция	15.3
РУСС 6330	Плодовое тело <i>Cyttaria hariotii</i> , Патагония, Аргентина	11.7
M300	Красное вино, Ростов, Россия	11.2
D13	Белове вино, Эльзас, Франция	15.6
ВКМ Y-1146	Виноград, Мичуринск, Россия	17.2
DDI4.95.4A	Бродящая мезга, Бордо, Барсак, Франция	17.5
T5/6	Токайское вино, Венгрия	17.0
T13/30	Токайское вино, Венгрия	18.8
ВКМ Y-361	Токайское вино, Словакия	17.6
CBS 395	Сок черной смородины <i>Ribes nigrum</i> , Нидерланды	18.0
CBS 8711	Вино, долина Луары, Тур, Франция	20.1
NCAIM Y.00676	Алкольный напиток, Венгрия	23.8
NCAIM Y.00677	Алкольный напиток, Венгрия	18.9
<i>S. cariocanus</i>		
UFRJ 50816 (Т)	<i>Drosophila</i> sp., Бразилия	11.8
UFRJ 50791	<i>Drosophila</i> sp., Бразилия	14.6
<i>S. cerevisiae</i>		
CBS1171 (Т)	Пивоварня Оганеboom, Роттердам, Нидерланды	0
YNN 295	Генетическая линия	0
S288C	Генетическая линия	0
ВКМ Y-502	Виноград, Дальний Восток	0
КБП-3793	Виноград, Белоруссия	0
M435	Виноградное сусло, Закарпатская область, Украина	0
SRC 120	Сидр, Бретань, Франция	0
DDI27.95	Бродящая мезга, Барсак, Франция	0
СЕСТ 10484	Альпехин, Испания	0
CBS 7962	Бродящий сироп из сахарного тростника, Бразилия	0
M212	Шампанское, Украина	6.5
MUCL 30909	Ферментированная маниока, Бурунди, Африка	11.4
СЕСТ 10485	Альпехин, Испания	13.7
GIV 51	Вино, Грузия	13.9
ATCC 66812	Альпехин, Греция	14.3
ВКМ Y-1553	Виноградная лоза, Братислава, Словакия	15.4
ВКМ Y-1554	Виноградное сусло, Словакия	15.6
ВКПМ Y-4748	Ягоды винограда, Дагестан, Россия	17.5

Таблица 1. Продолжение

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*
ВКПМ Y-718	Полиплоидный мутант штамма Кокур-3, сухое белое вино, Крым <i>S. jurei</i>	27.0
NCYC 3947 (Т)	Кора дуба <i>Q. robur</i> , Франция	17.2
NCYC 3962	Кора дуба <i>Q. robur</i> , Франция <i>S. kudriavzevii</i>	14.7
NBRC 1802 (Т)	Гниющие листья, Япония	5.0
NBRC 1803	Гниющие листья, Япония	12.5
NBRC 10991	Гниющие листья, Япония	0
NBRC 10990	Почва, Япония	7.8
РУСС 5979	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	6.1
РУСС 5977	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	6.7
ВКПМ Y-4736	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	8.5
TJ13M05	<i>Bolbitius</i> sp., Хуалянь, Тайвань	5.0
NRRL Y-63706	Почва, Хуалянь, Тайвань	8.9
ES14S09	Почва, Наньтоу, Тайвань	9.9
TJ11S04	Почва, Хуалянь, Тайвань	10.9
NRRL Y-63705	Почва, Гаосюн, Тайвань	11.1
NRRL Y-63704	Листья <i>Eupatorium tashiroi</i> , Гаосюн, Тайвань	10.7
РУСС 5978	Дуб <i>Q. pyrenaica</i> , Португалия	Нд
SR85	Дуб, Испания <i>S. mikatae</i>	Нд
NBRC 1815 (Т)	Почва, Япония	5.0
NBRC 10996	Почва, Япония	6.0
NBRC 10999	Почва, Япония	8.1
NBRC 1816	Опавшие листья, Япония	5.0
NBRC 11000	Сокотечение <i>Q. crispula</i> , Япония	12.7
NBRC 11001	Сокотечение <i>Camellia japonica</i> , Япония	5.0
NBRC 11002	Сокотечение <i>Fagus crenata</i> , Япония	7.0
NBRC 11003	Сокотечение <i>Q. myrsinaefolia</i> , Япония	10.9
NBRC 10992	Опавшие листья, Япония	11.5
NBRC 10993	Опавшие листья, Япония	12.3
NBRC 10995	Опавшие листья, Япония	12.4
NBRC 10997	Опавшие листья, Япония	13.1
NBRC 10998	Опавшие листья, Япония	13.5
NBRC 10994	Опавшие листья, Япония <i>S. paradoxus</i>	14.9
CBS 432 (Т)	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Россия	16.2
CBS 406	Сокотечение <i>Quercus</i> sp., Нидерланды	18.4
CBS 5829	Лесная почва, Дания	16.8
CBS 7400	Испорченный майонез, Европа	11.8
N17	Сокотечение дуба <i>Q. robur</i> , Татарстан, Россия	13.1
ВКМ Y-1707	Дикий виноград, Армения	15.1
ВКМ Y-1708	Полу-культурный виноград, Армения	14.0
D1	Кора дуба, Новосибирск, Россия	13.4
N43	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний восток, Россия	12.7

Таблица 1. Окончание

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*
N44	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний восток, Россия	12.5
61.02-2В	Сокотечение осины <i>Populus davidiana</i> , Приморский край, Россия	13.9
ВКМ У-505	Виноград, Дальний Восток, Россия	14.6
ВКМ У-1704	Сок амурского винограда, Дальний Восток, Россия	13.1
95-1	Сокотечение <i>Quercus</i> sp., Мичиган, США	13.5
UCDFST 52-153	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	17.4
UCDFST 72-149	Течь <i>Myoporium sandwicense</i> , Гавайи, США	0
UWO (PS) 91-917.1	Течь <i>M. sandwicense</i> , Гавайи, США	0

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Пушино, Россия); ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Москва, Россия); КБП – коллекция кафедры биологии почв МГУ (Москва, Россия); М – Коллекция микроорганизмов виноделия “Магарач” (КМВ “Магарач”), ФГБУН ВНИИВиВ “Магарач” РАН (Ялта, Россия); АТТС – American Type Culture Collection (Манассас, США); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia (Валенсия, Испания); MUCL – Mycothèque de L’Université, Catholique de Louvain (Лёвен, Бельгия); NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation (Токио, Япония); NCAIM – National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (Будапешт, Венгрия); NCYC – National Collection of Yeast Cultures (Норидж, Великобритания); PYCC – Portuguese Yeast Culture Collection (Лиссабон, Португалия); SRC – The Yeast Collection of Station de Recherche Cidricoles (Ле-Пё, Франция); UCDFST – Herman J. Phaff Yeast Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, University of California (Дэвис, Калифорния, США); UFRJ – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Бразилия); UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario (Онтарио, Канада); D13, TBV1c2.95, DD127.95, DD14.95.4A – штаммы из коллекции Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) (Вильнав-д’Орнон, Франция); TJ13M05, ES14S09, TJ11S04 – штаммы из коллекции Dr. Ch.F. Lee, Department of Applied Science, National Tsing Hua University (Синьчжу, Тайвань). Остальные штаммы из коллекции лаборатории молекулярной генетики дрожжей ФГБУ “ГосНИИгенетика НИЦ “Курчатовский институт” (Москва, Россия); соответствие штаммов различных коллекций: CBS 8711 = L19, S288C = CBS 8803, CBS 7001 = MCYC 623, NBRC 1815 = CBS 8839, NBRC 1802 = CBS 8840, NCYC 3947 = CBS 14759, UFRJ 50816 = CBS 8841, UFRJ 50791 = CBS 7994. Т – типовая культура.

* Диаметр зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей на РG-среде, мм.

** Нд – нет данных.

стве зондов использовали ПЦР-амплифицированные фрагменты длиной 1077 п.н., что покрывает большую часть кодирующей области генов *PGU1* (*S. cerevisiae* S288C), *PGU1b* (*S. bayanus* MCYC 623), *PGU1m* (*S. mikatae* NBRC 1815), *PGU1a* (*S. arboricola* CBS 10644). Последовательности использованных праймеров приведены ниже. Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием ди-гидроксигенина (dig-II-dUTP) из набора DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit I (“Roche”, Швейцария). Гибридизацию и детекцию гибридных сигналов проводили согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Секвенирование и филогенетический анализ. Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Дрожжевую ДНК выделяли согласно Lboke et al. (2011). Дизайн олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования генов *PGU* осуществляли онлайн на сайте <https://www.yeast-genome.org>. Для амплификации генов *PGU* видов *Saccharomyces* использовали следующие праймеры: *S. cerevisiae* PGU11 (5'-CACATTGATGGACAAC-GCA-3')/PGU12 (5'-AGGATTAACAGCTTGCAC-CA-3'); *S. arboricola* PGU17 (5'-CTTTTGT-CAACTTTGTGCGCT-3')/PGU18 (5'-ATGATG-CACCTGAGCCAGAT-3'); *S. bayanus* PGU13

(5'-CCACCAAACGCAATGATTT-3')/PGU14 (5'-ATGATGCACCTGAGCCAGAT-3'); *S. mikatae* PGU15 (5'-GGCAAACGCGATGGTTTTTA-3')/PGU16 (5'-AGGTTTAGCATGTTGCACCA-3'); *S. paradoxus* PGU21 (5'-TTTGTGCGCTTTTGCTGTGCG-3')/PGU23 (5'-AAATTGACACCCCGGACCAC-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 20–200 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 5 мин; затем 30 циклов в режиме: денатурация в режиме 94°C – 30 с, отжиг праймеров при 56°C – 30 с, синтез ДНК при 72°C – 60 с; конечная достройка при 72°C – 10 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5× ТВЕ буфере в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотografiровали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США). Амплифицированные фрагменты элюировали из геля с помощью набора Silica Beads DNA Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), согласно протоколу фирмы-изго-

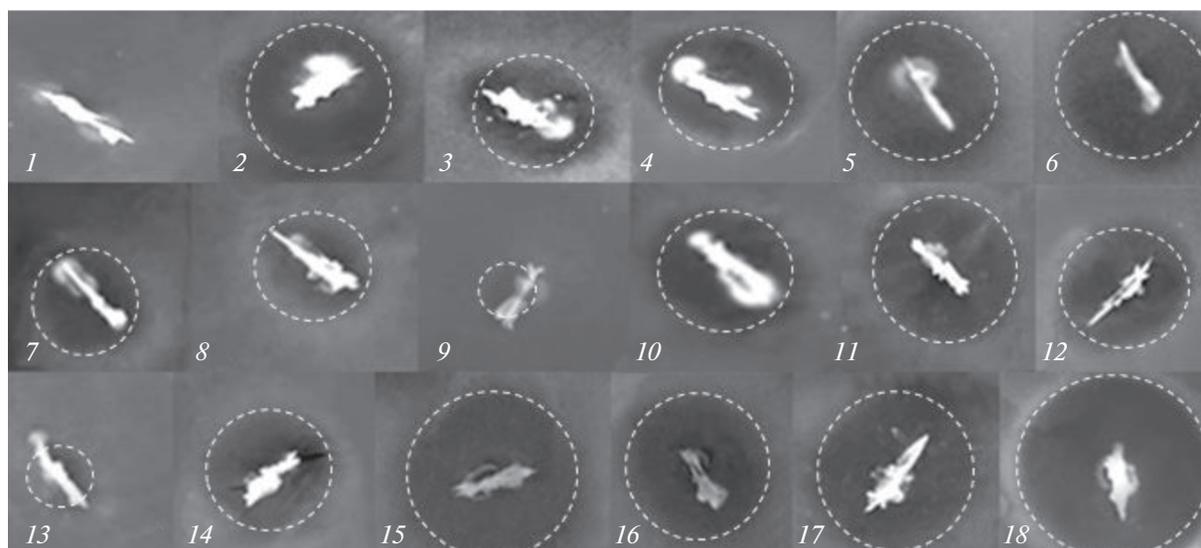


Рис. 1. Скрининг штаммов *Saccharomyces* на наличие пектиназной активности на PG-среде. *S. cerevisiae*: 1 – S288C; 2 – ВКПМ Y-4748; 3 – GIV51; *S. cariocanus*: 4 – UFRJ 50791; *S. paradoxus*: 5 – CBS 432; 6 – CBS 406; *S. kudriavzevii*: 7 – NRRL 63705; 8 – NRRL 63704; *S. mikatae*: 9 – NBRC 1815; 10 – NBRC 10994; *S. jurei*: 11 – NCYC 3947; 12 – NCYC 3962; *S. arboricola*: 13 – NRRL Y-63703; *S. bayanus*: 14 – 148.01; 15 – CBS 8711; 16 – T5/6; 17 – NCAIM Y.00677; 18 – контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718. Пунктирной линией обозначены зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей.

товителя. Нуклеотидные последовательности гена *PGU* определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США).

Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями *PGU* проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и SGD (<http://www.yeastgenome.org/>). Множественные выравнивания изученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2013). В качестве внешней группы использовали эндо-полигалактуроназный ген *EPG1* дрожжей *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 (=KCTC17555), выделенных из ферментированного кукурузного теста (Мексика).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пектинолитическая активность была определена у 87 штаммов *Saccharomyces* разной видовой принадлежности (табл. 1). Почти все изученные штаммы в той или иной степени были способны секретировать активную эндо-полигалактуроназу (рис. 1). Ферментативную активность изученных штаммов оценивали по размеру зон гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний

дрожжей. В зависимости от диаметра образующихся ореолов изученные штаммы были разделены на три группы: 1) 0–8 мм; 2) 8–15 мм; 3) более 15 мм.

У большинства штаммов *S. cerevisiae* пектинолитическая активность полностью отсутствовала или была очень низкой (табл. 1). К третьей группе отнесены только 3 из 18 изученных штаммов: ВКМ Y-1553, ВКМ Y-1554 и ВКПМ Y-4748. Первые два штамма выделены в условиях виноделия в Словакии, а последний штамм – с ягод винограда в Дагестане. Все изученные штаммы дрожжей *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* также имели достаточно низкую активность и попали в первые две группы (рис. 1, табл. 1). В настоящее время известно только два штамма *S. jurei*, выделенных в 2013 году с коры дуба во Франции (Naseb et al., 2017). Несмотря на общее происхождение, штаммы имели различную пектинолитическую активность: NCYC 3947 (диаметр ореола 17.2 мм) и NCYC 3962 (<15 мм).

Изученные штаммы *S. paradoxus* существенно различались по пектинолитической активности (рис. 1). У гавайских штаммов UCDFST 72-149 и UWO(PS) 91-917.1 активность не обнаружена. Десять штаммов *S. paradoxus* различного происхождения отнесены ко второй группе. В третью группу попали 5 штаммов: типовая культура CBS 432, CBS 406, CBS 5829, ВКМ Y-1707 и UCDFST 52-153. Наибольшей активностью обладал штамм CBS 406 ($d = 18.4$ мм), выделенный из сокаотечения *Quercus* sp. в Нидерландах (табл. 1).

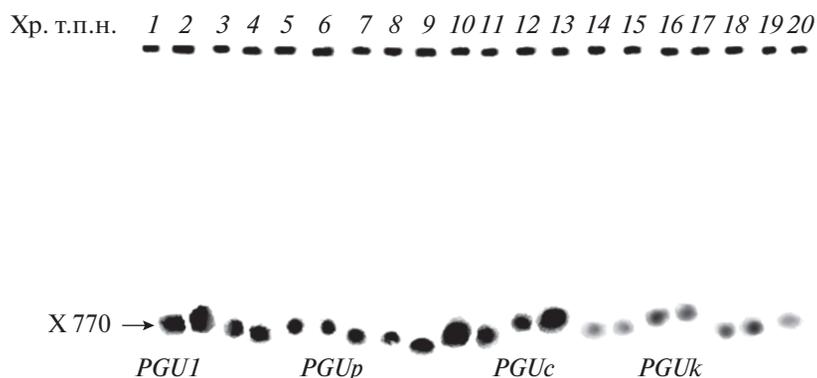


Рис. 2. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus* и *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1* *S. cerevisiae* S288C. *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; 2 – S288C; *S. paradoxus*: 3 – CBS 432; 4 – CBS 5829; 5 – CBS 406; 6 – N17; 7 – N43; 8 – N44; 9 – 95-1; 10 – UCDFST 52-153; 11 – UWO (PS) 91-917.1; *S. cariocanus*: 12 – UFRJ 50816; 13 – UFRJ 50791; *S. kudriavzevii*: 14 – NBRC 1802; 15 – NBRC 1803; 16 – NRRL 63704; 17 – NRRL 63705; 18 – PYCC 5977; 19 – ВКПМ Y-4736; 20 – PYCC 5979. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка 1).

Штаммы *S. bayanus* обладали достаточно высокой активностью: 12 отнесены к третьей группе, а остальные 6 ко второй (рис. 1, табл. 1). Наибольшей активностью обладали три штамма: венгерский токайский штамм T13/30 (18.8 мм), французский винный штамм CBS 8711 (20.1 мм) и выделенный из алкогольного напитка в Венгрии штамм NCAIM Y.00676 (23.8 мм). Следует отметить, что уровень секреции эндо-полигалактуроназы у последнего штамма сопоставим с контрольным штаммом *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718 (27.0 мм).

Хромосомная локализация генов *PGU* у 87 изученных штаммов *Saccharomyces* была определена с помощью пульс-электрофореза нативных хромосомных ДНК и Саузерн-гибридизации. Идентификацию отдельных хромосомных полос проводили по кариотипу стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, имеющего известные размеры и порядок хромосом (рис. 2–4, дорожка 1). В качестве стандарта также использовали генетическую линию *S. cerevisiae* S288C (рис. 2 и 3, дорожка 2), у которой определена полная нуклеотидная последовательность генома (*Saccharomyces* Genome Database, SGD <http://www.yeast-genome.org>). Этот штамм используется в качестве референсного при изучении генов различных эукариотических организмов.

На рис. 2 представлены результаты Саузерн-гибридизации хромосомных ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1* штамма *S. cerevisiae* S288C. Все изученные штаммы *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* обладали только одним пектиназным геном *PGU*, расположенным в районе хромосомы X размером около 770 т.п.н. стандартного штамма YNN 295 (рис. 2, дорожки 1, 2, 3–11, 12, 13 и 14–20). Гибридационные сигналы не

были обнаружены у трех из 18 изученных штаммов *S. cerevisiae*: M435, CBS 7962 и СЕСТ 10484, тогда как у остальных 8 штаммов первой группы без пектинолитической активности гибридационные сигналы выявлены (рисунок не приводится). По-видимому, эти штаммы обладают нефункциональными генами *PGU* из-за мутаций в промоторной области или регуляторных генах. Псевдогенов среди них обнаружено не было. Известно, что виды *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* имеют колинеарные молекулярные кариотипы (Fisher et al., 2000). Дрожжи *S. cariocanus* имеют видоспецифичный кариотип благодаря наличию четырех реципрокных транслокаций (IX/XV, II/XVI, XI/IV и XII/XIV), которые, однако, не затрагивают хромосому X. Таким образом, гены *S. paradoxus* *PGU1p*, *S. kudriavzevii* *PGU1k*, *S. cariocanus* *PGU1c* и *S. cerevisiae* *PGU1* имеют одинаковую локализацию: хромосома X. Следует отметить, что интенсивность гибридационных сигналов у штаммов *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1* была значительно слабее, чем у *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*.

Согласно Саузерн-гибридизации, у дрожжей *S. arboricola* ген *PGU1a* также расположен в хромосоме X (рис. 3, дорожки 19–22). У этих дрожжей имеется одна хромосомная транслокация (IV/XIII), также не затрагивающая хромосому X (Liti et al., 2013). У дрожжей *S. mikatae* и *S. jurei* выявлено по два гибридационных сигнала, расположенных в районе хромосом X (~770 т.п.н.) и VIII (~580 т.п.н.) стандартного штамма YNN 295 (рис. 3, дорожки 3–16, 17, 18 и 1 соответственно). Молекулярные кариотипы дрожжей *S. mikatae* и *S. jurei* характеризуются общей реципрокной транслокацией между хромосомами VI и VII, а у последнего вида имеется дополнительная хромосомная транслокация I/XIII (Наумова и соавт., 2011; Na-

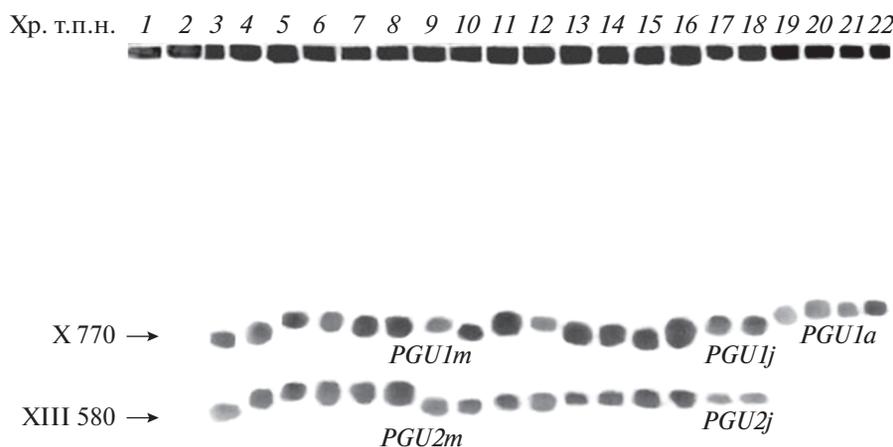


Рис. 3. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК дрожжей *S. mikatae*, *S. jurei* с зондом *PGU1m* NBRC 1815 и *S. arboricola* с зондом *PGU1a* CBS 10644. *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; 2 – S288C *S. mikatae*: 3 – NBRC 1815; 4 – NBRC 1816; 5 – NBRC 10992; 6 – NBRC 10993; 7 – NBRC 10994; 8 – NBRC 10995; 9 – NBRC 10996; 10 – NBRC 10997; 11 – NBRC 10998; 12 – NBRC 10999; 13 – NBRC 11000; 14 – NBRC 11001; 15 – NBRC 11002; 16 – NBRC 11003; *S. jurei*: 17 – NCYC 3947; 18 – NCYC 3962; *S. arboricola*: 19 – CBS 10644; 20 – AS 2.3318; 21 – AS 2.3319; 22 – NRRL Y-63703. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка 1).

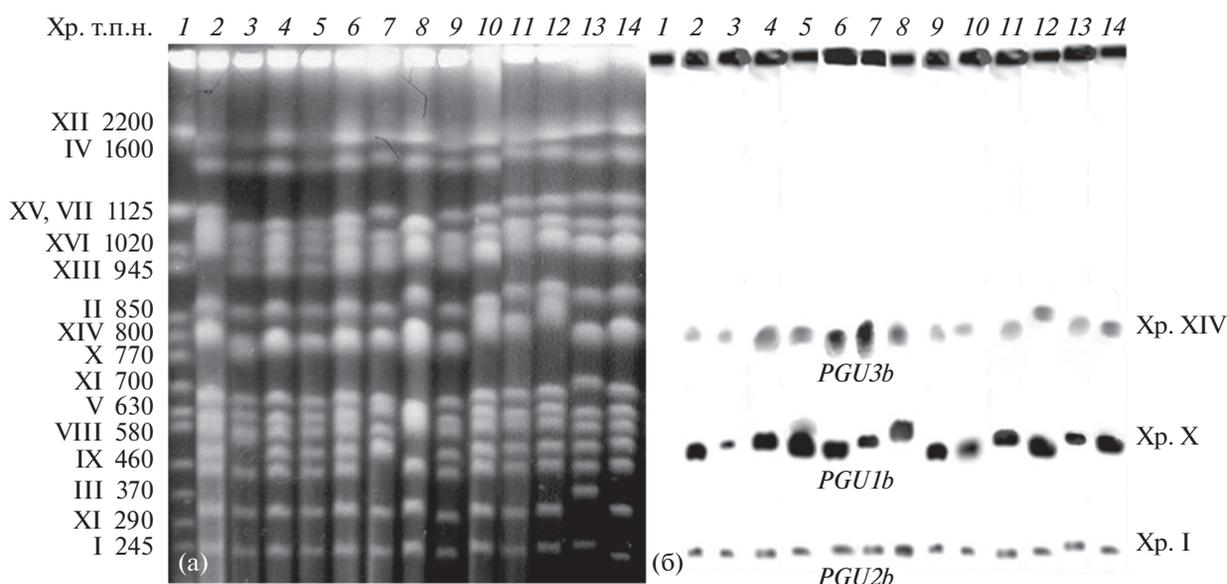


Рис. 4. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомных ДНК дрожжей *S. bayanus* с зондом *PGU1b* CBS 7001. *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; *S. bayanus*: 2 – CBS 395, 3 – M300, 4 – T5/6, 5 – CBS 7001, 6 – CBS 1146, 7 – D13, 8 – ВКМ Y-361, 9 – ВКПМ Y-2528, 10 – CBS 8711, 11 – РУСС 6866, 12 – ТВV1с2.95, 13 – NCAIM Y.00676, 14 – NCAIM Y.00677. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка 1).

seeb et al., 2017; Боровкова и соавт., 2020). Таким образом, хромосомы X и VIII у *S. mikatae*, *S. jurei* и *S. cerevisiae* имеют примерно одинаковые размеры.

На рис. 4 представлены молекулярные кариотипы и результаты Саузерн-гибридизации дрожжей *S. bayanus*. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный ген *PGU1b* штамма CBS 7001, геном которого полностью секвенирован (Bon et al., 2000). У всех изученных штаммов *S. bayanus* обнаружено по три гибридационных

сигнала (рис. 4, дорожки 2–14). Сильный гибридационный сигнал отмечен в четвертой, начиная с низа геля, хромосоме. Дрожжи *S. bayanus* имеют видоспецифичный кариотип за счет трех реципрокных транслокаций, одна из которых между хромосомами X и VI (Fisher et al., 2000; Naumova et al., 2005). Еще два гибридационных сигнала расположены в хромосомных полосах, которые по размеру соответствуют хромосомам I (~245 т.п.н.) и XIV (~800 т.п.н.) стандартного

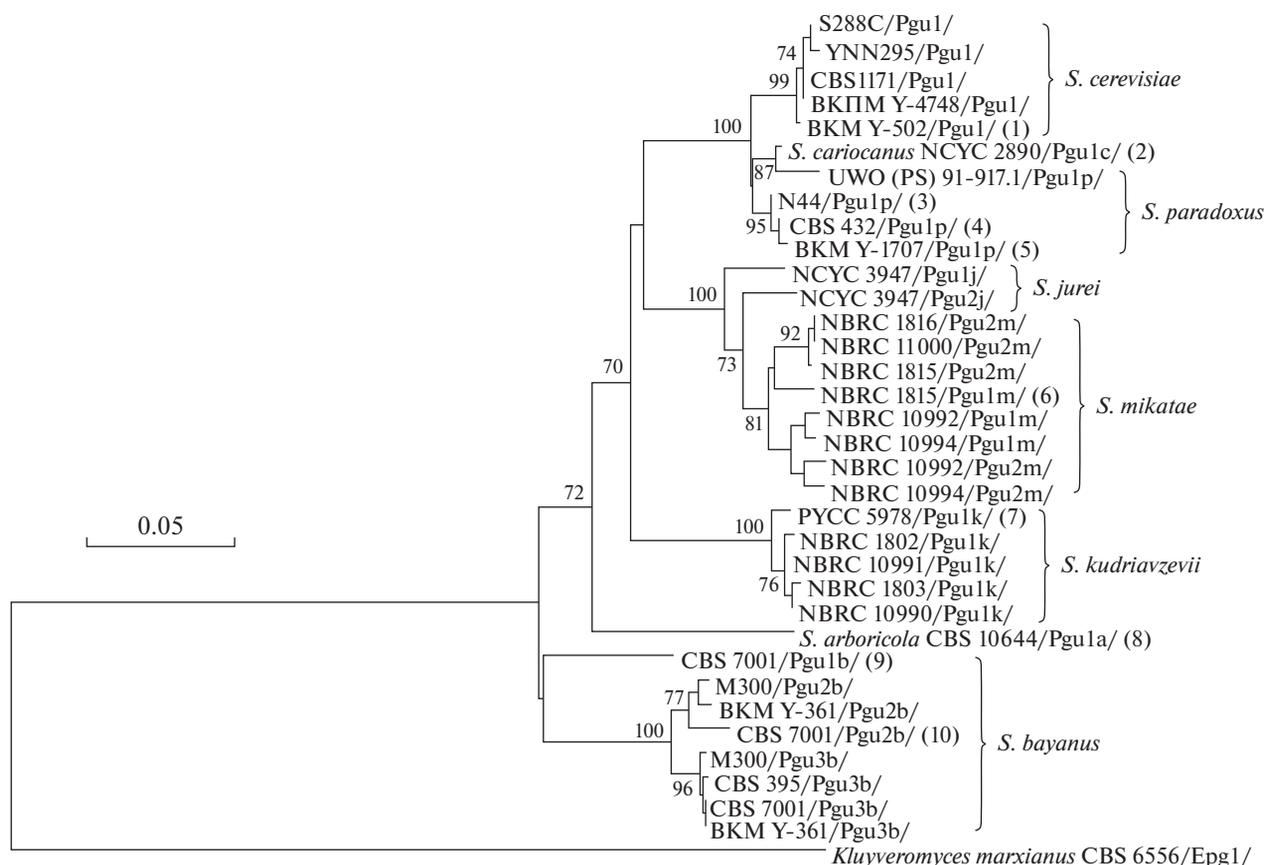


Рис. 5. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована эндо-полигалактуроназа (Epg1) дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 50 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – GIV51, (2) – NCYC 2908, 95-1, UCDFST 52-153, (3) – N43, BKM Y-505, BKM Y-1704, (4) – CBS 406, N17, (5) – BKM Y-1708, (6) – NBRC 1816, NBRC 11000, (7) – SR85, (8) – AS 2.3319, AS 2.3318, NRRL Y-63703, (9) – CBS 395, M300, BKM Y-361, (10) – CBS 395. В косых скобках показаны различные эндо-полигалактуроназы Pgu.

штамма YNN 295 (рис. 4, дорожка 1). Следует отметить слабую гибридизацию зонда *PGU1b* с генами *PGU2b* и *PGU3b*, при этом гибридизация с геном *PGU1* дрожжей *S. cerevisiae* YNN 295 полностью отсутствовала (рис. 4, дорожка 1).

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей *Saccharomyces*. Мы провели секвенирование генов *PGU* у 24 штаммов *Saccharomyces* разной видовой принадлежности, которые выделены из различных источников и отличаются по пектинолитической активности. Полученные нуклеотидные последовательности имели длину 1077 нуклеотида, что покрывает большую часть кодирующей области генов *PGU*. По полученным нуклеотидным последовательностям генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces* были определены аминокислотные последовательности соответствующих белков из 359 аминокислотных остатков. На основании анализа аминокислотных последовательностей было построено филогенетическое древо (рис. 5).

В качестве внешней группы использовали эндо-полигалактуроназу Epg1 дрожжей *Kluyveromyces marxianus*.

Все изученные эндо-полигалактуроназы дрожжей *Saccharomyces* разделились на два основных кластера. Внутри первого кластера со 100%-ной статистической достоверностью выделяются три подкластера. Первый включает штаммы *S. cerevisiae* (99.2–100% сходства), а также дрожжи *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, эндо-полигалактуроназы которых идентичны на 96.4–100% (рис. 5). Североамериканские штаммы *S. paradoxus* и дрожжи *S. cariocanus* имеют идентичные последовательности, которые сходны с эндо-полигалактуроназами штаммов *S. paradoxus*, выделенных на Гавайях, Дальнем Востоке и в Европе, соответственно, на 98.3, 98.6 и 98.1–98.3%. Белки Pgu1p дальневосточных и европейских штаммов идентичны на 99.4–99.7%, а их сходство с эндо-полигалактуроназами гавайских штаммов не превышало 97%. Сходство эндо-полигалактуроназ дрожжей *S. cer-*

evisiae и *S. paradoxus/S. cariocanus* составило 95.6–96.8%. Второй подкластер объединяет дрожжи *S. mikatae* и *S. jurei*, эндо-полигалактуроназы которых сходны на 95.0–96.4%. Белки Pgu1m (хромосома X) дрожжей *S. mikatae* идентичны на 97.2–100%, тогда как белки Pgu2m (хр. VIII) сходны на 96.7–99.7%. Сходство Pgu1m и Pgu2m составляет 95.8–98.6%. Интересно отметить, что по последовательностям Pgu штаммы *S. mikatae* разделились на две группы: NBRC 1815, NBRC 1816, NBRC 11000 и NBRC 10992, NBRC 10994 (рис. 5). Ранее нами было обнаружено аналогичное деление на две группы штаммов *S. mikatae* по ITS-последовательностям рДНК (Наумова и соавт., 2011). В третий подкластер вошли белки Pgu1k дрожжей *S. kudriavzevii*, которые идентичны на 98.3–100%. Последовательности Pgu1k европейских и дальневосточных штаммов сходны на 98.3–98.9%, тогда как эндо-полигалактуроназы последних штаммов практически идентичны: 99.2–99.7%. Сходство эндо-полигалактуроназ трех подкластеров составило 87.7–91.9%. К первому кластеру примыкает белок Pgu1a дрожжей *S. arboricola*, сходство которого с соответствующими белками дрожжей *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* составило 85.5–87.7%.

Второй кластер включает белки Pgu дрожжей *S. bayanus*, которые сходны на 88.6–100% (рис. 5). У всех проанализированных штаммов последовательности Pgu1b были идентичными, а их сходство с белками PGU2b и PGU3b составило, соответственно, 88.6–90.8 и 90.0–90.5%. Последние два белка идентичны на 96.7–97.5%. Следует отметить, что сходство последовательностей Pgu2b и Pgu3b разных штаммов *S. bayanus* составило, соответственно, 96.7–100% и 99.4–100%. Уровень сходства эндо-полигалактуроназ дрожжей *S. bayanus* и остальных семи видов рода *Saccharomyces* значительно ниже: 83.6–88.6%. При этом наибольшее сходство имел белок Pgu1b (85.5–88.6%), тогда как сходство Pgu2b и Pgu3b не превышало 87%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о значительном полиморфизме нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Согласно проведенному филогенетическому анализу, наибольшее сходство эндо-полигалактуроназ (>95%) отмечено для видов *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, а также *S. mikatae* и *S. jurei*. Сходство белков Pgu остальных видов *Saccharomyces* было ниже 92%. Наиболее дивергентными являются эндо-полигалактуроназы дрожжей *S. arboricola* и *S. bayanus*, уровень сходства которых между собой и с белками *PGU* остальных видов не превышал 89%. По многим молекулярным маркерам указанные виды являются наиболее дивергентными в

роде *Saccharomyces* (Naumov et al., 2010; Naseb et al., 2017; Боровкова и соавт., 2020). Обратим внимание на внутривидовой полиморфизм эндо-полигалактуроназ дрожжей *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus*, связанный с географическим происхождением штаммов (рис. 5, табл. 1). Так, в третьем подкластере, образованном дрожжами *S. kudriavzevii*, выделяются две группы: европейские и дальневосточные штаммы. Штаммы двух популяций различаются и по другим молекулярным маркерам, например, по галактозным генам (Hittinger et al., 2004). В отличие от европейских штаммов, способных ферментировать галактозу, дальневосточные штаммы не способны усваивать галактозу из-за обширных повреждений галактозных генов. Более того, межпопуляционные гибриды имеют пониженную фертильность, что указывает на частичную генетическую изоляцию штаммов *S. kudriavzevii* различного географического происхождения (Наумов, 2016). Известно, что вид *S. paradoxus* включает четыре частично-генетически изолированные географические популяции (европейскую, дальневосточную, североамериканскую и гавайскую), которые различаются по ряду молекулярных маркеров (Naumov et al., 1998; Liti et al., 2009). Изученные нами штаммы *S. paradoxus* из четырех указанных популяций также отличались по последовательностям эндо-полигалактуроназ (рис. 5). В целом, полученные результаты свидетельствуют о видоспецифичности генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Исключением является ген *PGU1c* дрожжей *S. cariocanus*, нуклеотидная последовательность которого идентична последовательности гена *PGU1p* североамериканских штаммов *S. paradoxus*. Это неудивительно, поскольку по многим молекулярным маркерам дрожжи *S. cariocanus* не отличаются от штаммов *S. paradoxus* из североамериканской популяции (Liti et al., 2005, 2006). В то же время, дрожжи *S. cariocanus* характеризуются специфичным молекулярным кариотипом и обладают уникальной нуклеотидной заменой в 191 позиции консервативного гена 18S рРНК, отсутствующей у остальных видов *Saccharomyces* (Naumov et al., 2010; Боровкова и соавт., 2020). Более того, при скрещивании дрожжей *S. cariocanus* со штаммами *S. paradoxus* различного географического происхождения, включая североамериканские, образующиеся гибриды были стерильны (Naumov et al., 2000a).

Согласно проведенному нами молекулярному кариотипированию и Саузерн-гибридизации, дрожжи *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают только одним геном *PGU*, тогда как у остальных трех видов обнаружено несколько полимерных генов *PGU*: по два у *S. mikatae* и *S. jurei*, а также три у *S. bayanus*. Ген *PGU1* штамма *S. cerevisiae* S288C расположен в теломерном районе хромосомы X (<http://www.yeastgenome.org>). Такую же хромосомную

локализацию имеют гены *S. arboricola PGU1a*, *S. cariocanus PGU1c*, *S. kudriavzevii PGU1k*, *S. paradoxus PGU1p*, а также один из генов *S. jurei* (*PGU1j*), *S. mikatae* (*PGU1m*) и *S. bayanus* (*PGU1b*). По-видимому, расположенный в хромосоме X ген *PGU1* является предковым, тогда как гены *PGU* другой хромосомной локализации появились в геномах дрожжей *S. bayanus*, *S. jurei* и *S. mikatae* в ходе эволюции позднее.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о значительном внутривидовом полиморфизме секретиции эндо-полигалактуроназы у дрожжей рода *Saccharomyces*. Штаммы с очень низкой, средней и достаточно высокой пектинолитической активностью обнаружены практически у всех видов. Исключением является вид *S. bayanus*, все изученные штаммы которого обладали достаточно высокой активностью (табл. 1). По-видимому, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью этих дрожжей. Обращает на себя внимание достаточно высокая пектинолитическая активность штаммов *S. paradoxus*. Естественным местообитанием этих дрожжей являются сокоотечения и кора широколиственных деревьев, в особенности различных видов дубов Европы, Северной Америки и Дальневосточной Азии (Наумов, 2013). Эти дрожжи также обитают в лесной подстилке и самой почве, а также выделяются из различных насекомых, которые являются векторами их распространения в природе. По-видимому, полигалактуроновая составляющая пектина является важной частью углеводного питания обитающих в природе дрожжей. Для мицелиальных грибов, например, родов *Aspergillus* и *Sclerotinia*, свойственно наличие мультигенных эндо-полигалактуроназных семейств (Bussink et al., 1992; Fraissinet-Tacher et al., 1995), что может свидетельствовать о высокой экологической значимости этого фермента.

Принимая во внимание полученные нами результаты и литературные данные (Eschstruth, Divol, 2011) о высокой пектинолитической активности дрожжей *S. paradoxus*, есть основание рекомендовать генофонд этого вида для селекционной работы с винными дрожжами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А20-120093090015-2.

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

- Боровкова А.Н., Михайлова Ю.В., Наумова Е.С. Молекулярно-генетические особенности биологических видов дрожжей рода *Saccharomyces* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 390–399.
- Borovkova A.N., Michailova Yu.V., Naumova E.S. Molecular genetic features of biological species of the genus *Saccharomyces* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 387–395.
- Наумов Г.И. Эколого-биогеографические особенности дрожжей *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaya и родственных видов: (I) ранние исследования // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 387–394.
- Naumov G.I. Ecological and biogeographical features of *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaya yeast and related species: I. The early studies // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 397–403.
- Наумов Г.И. Генетическая идентификация дрожжей *Saccharomyces kudriavzevii* из европейской популяции // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. № 1. С. 9–11.
- Наумов Г.И., Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Маснёф-Помаред И. Таксономия, экология и генетика дрожжей *Saccharomyces bayanus* – нового объекта в науке и практике // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 723–730.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Martynenko N.N., Masneuf-Potarède I. Taxonomy, ecology, and genetics of the yeast *Saccharomyces bayanus*: a new object for science and practice // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 735–742.
- Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярная филогения пектиназных генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces* // Микробиология. 2016а. Т. 85. Р. 703–712.
- Naumov G.I., Shalamitskiy M.Y., Naumova E.S., Martynenko N.N. Molecular phylogeny of pectinase genes *PGU* in the yeast genus *Saccharomyces* // Microbiology (Moscow). 2016а. V. 85. P. 717–726.
- Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Новое семейство пектиназных генов *PGU1b–PGU3b* у пектинолитических дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // ДАН. 2016б. Т. 467. С. 109–111.
- Naumov G.I., Shalamitskiy M.Y., Naumova E.S. New family of pectinase genes *PGU1b–PGU3b* of the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // Dokl. Biochem. Biophys. 2016б. V. 467. P. 89–91.
- Наумова Е.С., Наумов Г.И., Корхола М. Молекулярные кариотипы различных генетических линий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биотехнология. 1993. № 4. С. 2–5.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Korhola M. Molecular karyotypes of various genetic lines of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Bioteknologiya. 1993. № 4. P. 1–4.
- Наумова Е.С., Серпова Е.В., Корицунова И.В., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм α -галактозидазных генов *MEL* дрожжей *Saccharomyces* // Микробиология. 2011. Т. 80. Р. 496–507.
- Naumova E.S., Serpova E.V., Korshunova I.V., Naumov G.I. Molecular polymorphism of α -galactosidase *MEL* genes of

- Saccharomyces* yeasts // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 502–513.
- Наумова Е.С., Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 2. С. 30–37.
- Naumova E.S., M.Yu. Shalamitskiy, Naumov G.I. Molecular polymorphism of pectinase genes *PGU* of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* yeast // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. P. 882–887.
- Имишенецкий А.А., Кондратьева Т.Ф., Линькова М.А., Датунашвили Е.Н., Бурьян Н.И., Покровская С.С., Скорикова Т.К., Сониная Е.Г. Полиплоидный штамм дрожжей *Saccharomyces vini*, используемый для приготовления столовых вин. Патент SU 1495368.
- Bon E., Neuvéglise C., Casaregola S., Artiguenave F., Winckler P., Aigle M., Durrens P. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 5. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // FEBS Lett. 2000. V. 487. P. 37–41.
- Bussink H.J., Buxton F.P., Fraaye B.A., de Graaff L.H., Vissler J. The polygalacturonase of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes // Eur. J. Biochem. 1992. V. 208. P. 83–90.
- Divol B., Rensburg P. *PGU1* gene natural deletion is responsible for the absence of endo-polygalacturonase activity in some wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. 2007. V. 7. P. 1328–1339.
- Eschstruth A., Divol B. Comparative characterization of endo-polygalacturonase (*Pgu1*) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under wine-making conditions // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 91. P. 623–634.
- Fernández-González M., Ubeda J.F., Vasudevan T.G., Cordeiro Otero R.R., Briones A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 237. P. 261–266.
- Fischer G., James S.A., Roberts I.N., Oliver S.G., Louis E.S. Chromosomal evolution in *Saccharomyces* // Nature. 2000. V. 405. P. 451–454.
- Fraissinet-Tacher L., Raymond-Cotton P., Fevre M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum* // Curr. Genet. 1995. V. 29. P. 96–99.
- Gainvors A., Karam N., Lequart C., Belarbi A. Use of *Saccharomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices // Biotechnol. Lett. 1994. V. 16. P. 1329–1334.
- Gognies S., Gainvors A., Aigle M., Belarbi A. Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (*PGL1*) // Yeast. 1999. V. 15. P. 11–22.
- Hittinger C.T., Rokas A., Carroll S.B. Parallel inactivation of multiple *GAL* pathway genes and ecological diversification in yeasts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 14144–14149.
- 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.
- Kurtzman C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vandervatozyma* and *Zygoturulaspora* // FEMS Yeast Res. 2003. V. 4. P. 233–245.
- Liti G., Peruffo A., James S.A., Roberts I.N., Louis E.J. Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex // Yeast. 2005. V. 22. P. 177–192.
- Liti G., David B., Barton H., Louis E.J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces* // Genetics. 2006. V. 174. P. 839–850.
- Liti G., Carter D.M., Moses A.M., Warringer J., Parts L., James S.A., Davey R.P., Roberts I.N., Burt A., Koufopanou V., Tsai I.J., Bergman C.M., Bensasson D., O’Kelly M.J.T., van Oudenaarden A., Barton D.B.H., Bailes E., Nguyen Ba A.N., Jones M., Quail M.A., Goodhead I., Sims S., Smith F., Blomberg A., Durbin R., Louis E.J. Population genomics of domestic and wild yeasts // Nature. 2009. V. 458. P. 337–341.
- Liti G., Nguyen Ba A.N., Blythe M., Müller C.A., Bergström A., Cubillos F.A., Dafhnis-Calas F., Khoshraftar S., Malla S., Mehta N., Siow C.C., Warringer J., Moses A.M., Louis E.J., Nieduszynski C.A. High quality de novo sequencing and assembly of the *Saccharomyces arboricolus* genome // BMC Genomics. 2013. V. 14. P. 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-69>
- Louw C., La Grange D., Pretorius I.S., van Rensburg P. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavor // J. Biotechnol. 2006. V. 125. P. 447–461.
- Louw C., Young P.R., van Rensburg P., Divol B. Epigenetic regulation of *PGU1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. 2010. V. 10. P. 158–167.
- Löoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR based applications // Biotechniques. 2011. V. 50. P. 325–328.
- Naseeb S., James S.A., Alsammar H., Michaels C.J., Gini B., Nueno-Palop C., Bond C.J., McGhie H., Roberts I. N., Delneri D. *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 2046–2052.
- Naumov G.I. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex // J. Indust. Microbiol. 1996. V. 17. P. 295–302.
- Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S., Louis E.J., Roberts I.N. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* // Int. J. Evol. Microbiol. 2000a. V. 50. P. 1931–1942.
- Naumov G.I., Masneuf-Pomarède I., Naumova E.S., Aigle M., Dubourdieu D. Association of *S. bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations // Res. Microbiol. 2000b. V. 151. P. 683–691.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Aigle M., Masneuf-Pomarede I., Belarbi A. Genetic reidentification of the pectinolytic yeast strain SCPP as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001a. V. 55. P. 108–111.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Antunovics A., Sipiczki M. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 727–730.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Gaillardin C. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and Italy // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 274–279.

- Naumov G.I., Naumova E.S., Masneuf-Pomarède I. Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricola* Wang et Bai // Antonie van Leeuwenhoek. 2010. V. 98. P. 1–7.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Sniegowski P.D. Differentiation of European and Far East Asian populations of *Saccharomyces paradoxus* by allozyme analysis // Int. J. System. Bacteriol. 1997a. V. 47. P. 341–344.
- Naumov G.I., Nguyen H.-V., Naumova E.S., Michel A., Aigle M., Gaillardin C. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast // Int. J. Food Microbiol. 2001b. V. 65. P. 163–171.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Masneuf-Pomarède I., Aigle M., Dubourdieu D. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae* // Yeast. 2005. V. 22. P. 1099–1115.
- Panon G., Massiot P., Drilleau J.-F. Production d'enzymes pectinolytiques par les levures d'intérêt cidricole // Sciences des Aliments. 1995. V. 15. P. 31–42.
- Pérez-Torrado R., Barrio E., Querol A. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2018. V. 58. P. 1780–1790.
- Rementeria A., Rodriguez J.A., Cadaval A., Amenabar R., Muguruza J.R., Hernando F.L., Sevilla M.J. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain) // Ind. J. Food. Microbiol. 2003. V. 86. P. 201–207.
- Torriani S., Zapparoli G., Suzzi G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine // Antonie van Leeuwenhoek. 1999. V. 5. P. 207–215.
- Van Rensburg P., Pretorius I.S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations // S. Afr. J. Enol. Viticult. 2000. V. 21. P. 52–73.
- Vaughan-Martini A., Martini A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870) // The Yeast, a Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. V. 2. P. 733–746.
- Wang S.A., Bai F.Y. *Saccharomyces arboricola* sp. nov., a yeast species from tree bark // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 510–514.

Natural Polymorphism of Pectinase *PGU* Genes in the *Saccharomyces* Yeasts

E. S. Naumova^{1,*}, A. N. Borovkova^{1,2}, M. Yu. Shalamitskiy³, and G. I. Naumov^{1,†}

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 117519 Russia

²Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Magarach All-Russian National Institute for Vine and Winemaking, Russian Academy of Sciences, Yalta, 298600 Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Received December 11, 2020; revised January 12, 2021; accepted January 22, 2021

Abstract—The distribution and properties of the pectinase *PGU* genes in *Saccharomyces* yeasts of different species was studied. Application of molecular karyotyping and Southern hybridization revealed that *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, and *S. paradoxus* species had a single *PGU* gene located on the X chromosome. The other three species had polymeric *PGU* genes of different chromosomal localization: *S. mikatae* and *S. jurei* (chromosomes X and VIII), *S. bayanus* (X, I, and XIV). This is the first report on comparative analysis of the nucleotide and amino acid sequences of the *PGU* genes was carried out in all eight species of the genus *Saccharomyces*. Species-specificity of the *PGU* genes was revealed, as well as their intraspecific polymorphism in *S. kudriavzevii* and *S. paradoxus*, associated with the geographical origin of the strains. The most divergent proteins were Pgu1a (*S. arboricola*) and Pgu1b, Pgu2b, Pgu3b (*S. bayanus*), for which the level of similarity to the Pgu proteins of other *Saccharomyces* species did not exceed 89%. The highest similarity (>95%) was noted for the Pgu proteins of *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, and *S. cariocanus*, as well as *S. mikatae* and *S. jurei*. Significant intraspecific polymorphism of endo-polygalacturonase secretion was observed in the studied *Saccharomyces* species, except for the species *S. bayanus*, all studied strains of which had a relatively high activity. The ability to secrete active endo-polygalacturonase is probably a specific feature of this species.

Keywords: *Saccharomyces* yeasts, *PGU* genes, pectinase, endo-polygalacturonase, pectin, phylogenetic analysis, molecular karyotyping

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

НОВЫЕ ШТАММЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ЛИНДАНА
ACHROMOBACTER SP. NE1 И *BREVUNDIMONAS* SP. 242

© 2021 г. Д. О. Егорова^а, * Э. А. Назарова^а, В. А. Демаков^а

^аИнститут экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Урал, Россия

*e-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 03.11.2020 г.

После доработки 04.12.2020 г.

Принята к публикации 05.12.2020 г.

Впервые выделены штаммы *Achromobacter* sp. NE1 (GenBank MW132988) и *Brevundimonas* sp. 242 (GenBank MW132989), обладающие уникальной способностью использовать в качестве единственного источника углерода и энергии линдан и один из побочных продуктов, образующихся в процессе аэробной биотрансформации линдана, – 1,2,4-трихлорбензол (штамм NE1) и 2,5-дихлорфенол (штамм 242). Установлено, что штаммы содержат ген *linA*, кодирующий первый фермент деструкции линдана дегидрохлориназу, на 99.65–100% схожий с геном *linA* штаммов-деструкторов линдана рода *Sphingobium*.

Ключевые слова: линдан, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *linA*, 1,2,4-трихлорбензол, 2,5-дихлорфенол

DOI: 10.31857/S0026365621030034

Линдан (γ-гексахлорциклогексан, γ-ГХЦГ) – химически стабильное соединение, применявшееся в качестве пестицида в широких масштабах. В 2009 году линдан включен в перечень стойких органических загрязнителей в рамках Стокгольмской конвенции (Приложение А – уничтожение), ратифицированной Россией в 2011 г. (<http://chm.pops.int>). Исследования нескольких десятилетий показали, что одним из перспективных способов разложения линдана является бактериальная деструкция (Kumar, Pannu, 2018). Первые сообщения об анаэробном дехлорировании линдана появились в 1960-х годах, а об участии в процессе разложения линдана аэробных бактерий – в 1970-х годах (Lal et al., 2006, 2010; Camacho-Pérez et al., 2012). Из почв выделено и описано значительное количество бактериальных штаммов, осуществляющих полную или частичную трансформацию линдана, среди которых выявлены представители родов *Actinobacteria*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromohalobacter*, *Citriibacter*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Kokuria*, *Microbacterium*, *Pandorea*, *Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Trametes*, *Xanthomonas* (Lal et al., 2010; Zheng et al., 2011; Camacho-Pérez et al., 2012; Pannu, Kumar, 2017; Saez et al., 2017; Kumar, Pannu, 2018). Большинство штаммов-деструкторов лин-

дана являются представителями родов *Sphingobium* и *Sphingomonas*.

Биохимический путь трансформации линдана условно разделен на “верхний” и “нижний” и включает в себя стадии дегалогенирования и гидроксирования с последующим расщеплением циклической структуры молекулы (рис. 1). Побочными продуктами данного процесса являются 1,2,4-трихлорбензол (1,2,4-ТХБ) и 2,5-дихлорфенол (2,5-ДХФ) – химически стабильные и токсичные соединения (Lal et al., 2010; Zheng et al., 2011; Camacho-Pérez et al., 2012) (рис. 1). Возможность бактериальной деструкции 2,5-ДХФ описана для штамма *Cupriavidus nantongensis* X1^T (Fang et al., 2020). Несмотря на то, что разложение 1,2,4-ТХБ осуществляет широкий спектр бактерий, процесс биотрансформации является длительным (период полуразложения составляет 7.07–21.24 сут) (Song et al., 2011; Dong et al., 2015). Для штаммов-деструкторов линдана не описана способность осуществлять разложение 1,2,4-ТХБ и/или 2,5-ДХФ.

lin-Гены, кодирующие ферменты биодеструкции линдана, впервые были описаны для штамма *Sphingobium japonicum* UT26 (Lal et al., 2006). В настоящий момент *lin*-оперон выявлен у представителей родов *Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Shewanella*, *Sphingobium*, *Sphingomonas* и *Xanthomonas* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Разложение 1,2,4-ТХБ обуславливается действием ферментов, кодируе-

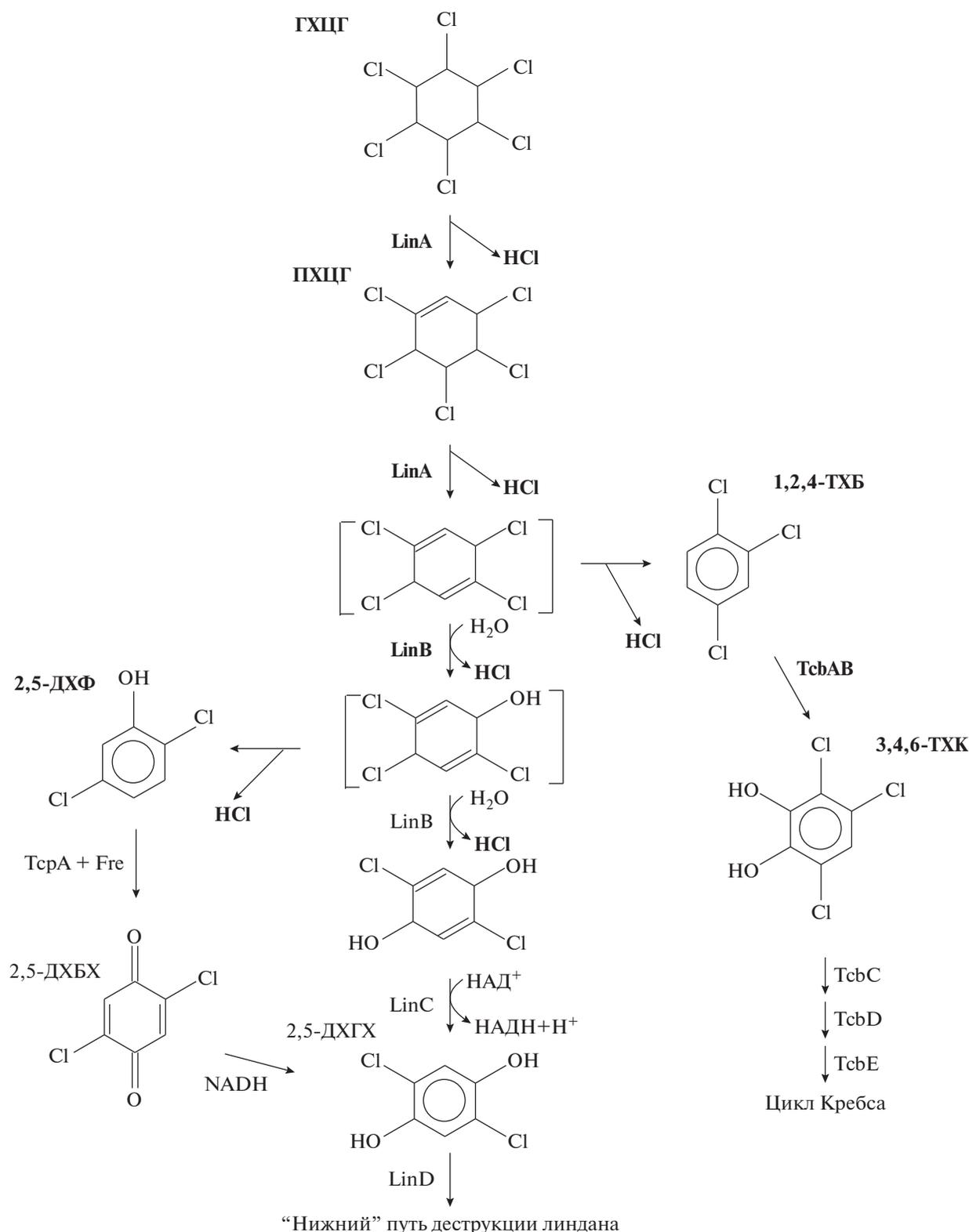


Рис. 1. “Верхний” путь деструкции линдана и образующихся продуктов (Lal et al., 2006; Camacho-Pérez et al., 2012; Fang et al., 2020; www.kegg.jp): ГХЦГ – γ -гексахлорциклогексан (линдан); ПХЦГ – γ -пентахлорциклогексен; 2,5-ДХГХ – 2,5-дихлоргидрохинон; 1,2,4-ТХБ – 1,2,4-трихлорбензол; 3,4,6-ТХК – 3,4,6-трихлоркатехол; 2,5-ДХФ – 2,5-дихлорфенол; 2,5-ДХБХ – 2,5-дихлорбензохинон. Жирным шрифтом обозначены элементы схемы, определяемые в настоящем исследовании.

мых *tcb*-опероном (*tcbABCDE*), тогда как бактериальное окисление 2,5-ДХФ описано только для комплекса ферментов монооксигеназа TcrA и НАД(Ф)Н:ФАД редуктаза Fre, кодируемых генами *tcrA* и *fre* (Fang et al., 2020; www.kegg.jp; http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Целью настоящей работы было выделение и изучение уникальных штаммов-деструкторов линдана.

Методом накопительного культивирования на минеральной среде K1 (Zaitsev et al., 1991) с линданом (0.3 г/л) в качестве селективного фактора, из почв, длительное время загрязненных хлорорганическими соединениями, было выделено 26 штаммов аэробных бактерий. В результате культивирования на среде K1, содержащей один из субстратов (0.3 г/л линдана, 0.1 г/л 1,2,4-ТХБ, 0.1 г/л 2,5-ДХФ, вносимых в виде ацетоновых растворов), для дальнейшего изучения были отобраны штаммы NE1 и 242, способные использовать в качестве источника углерода и энергии по два субстрата из указанных выше.

Морфо-физиологические признаки штаммов изучали по общепринятым методикам (Методы..., 1984). Тотальную ДНК штаммов получали методом щелочного лизиса. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием классических праймеров 27F и 1492R, как описано в работе (Weisburg et al., 1991). Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500xl ("Applied Biosystems", США), с применением реактивов Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v 3.1 ("Applied Biosystems", США), согласно рекомендациям производителя. Анализ нуклеотидных последовательностей и перевод в аминокислотные последовательности осуществляли с применением программы MEGA10, поиск гомологичных последовательностей осуществляли по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>).

Анализ морфо-физиологических признаков штамма NE1 позволил предположить, что данный штамм относится к классу *Betaproteobacteria*, порядку *Burkholderiales*. Далее филогенетическую принадлежность штамма оценивали на основании анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК, депонированной в GenBank под номером MW132988. Наибольший уровень сходства составил 99.79% с соответствующей последовательностью типового штамма *Achromobacter marplatensis* B2^T (GenBank EU150134).

В результате изучения морфо-физиологических признаков штамма 242 было предположено, что он принадлежит классу *Alphaproteobacteria*, порядку *Caulobacterales*. Анализ фрагмента гена 16S рРНК выявил 99.85% сходства с соответствующей последовательностью типового штамма *Brevundimonas diminuta* ATCC15257^T (GenBank GL883089).

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма *Brevundimonas* sp. 242 депонирована в GenBank под номером MW132989.

Для более подробного изучения разложения линдана, 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ штаммами *Achromobacter* sp. NE1 и *Brevundimonas* sp. 242 проводили опыты с отмытыми клетками (Egorova et al., 2020). Анализ концентрации субстрата и метаболитов проводили методами ГХ-МС, ВЭЖХ и спектрофотометрии (Egorova et al., 2020). Расчет скорости деструкции осуществляли по формуле: $V = (C_{\text{нач}} - C_{\text{кон}})/t$, где V – скорость деструкции субстрата, $C_{\text{нач}}$ – начальная концентрация субстрата, $C_{\text{кон}}$ – концентрация субстрата в конечный момент времени, t – время деструкции.

Штаммы *Achromobacter* sp. NE1 и *Brevundimonas* sp. 242 осуществляли деструкцию линдана за 16 сут на 35.9 и 26.4% соответственно, при этом в среде были выявлены ионы хлора (соответственно, 23.9 и 17.6% от максимально возможного) и γ -пентахлорциклогексен (γ -ПХЦГ) (рис. 1). Скорость разложения линдана штаммом NE1 составила 6.73 ± 0.03 мг/л сут, а штаммом 242 – 4.95 ± 0.02 мг/л сут. По эффективности и скорости разложения линдана представленные штаммы превосходят большинство описанных деструкторов (Zheng et al., 2011; Camacho-Pérez et al., 2012; Pannu, Kumar, 2017; Saez et al., 2017).

Обнаружение γ -ПХЦГ в среде позволило предположить, что в процессе разложения линдана участвуют Lin-ферменты (Camacho-Pérez et al., 2012). Молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей, амплифицированных с тотальной ДНК штаммов NE1 и 242, с использованием праймеров FGPlinA₁-433-69 5'-CGT AGA CAA GCG CCA AGA GG-3' и FGPlinA₂-434-411 5'-GGT GAA ATA GTT CGT GCA TC-3' и режима, описанного в работе (Thomas et al., 1996), показал высокий уровень сходства с последовательностями *linA*-генов (рис. 2). Уровень сходства фрагмента гена *linA* штамма *Achromobacter* sp. NE1 (GenBank MW150968) с наиболее близкородственными гомологичными последовательностями штаммов *Sphingobium* sp. S6 (GenBank MN649851.1) и *Sphingobium japonicum* UT26 (GenBank AP010803.1) составил 100 и 99.67% соответственно, а гена *linA* штамма *Brevundimonas* sp. 242 (GenBank MW150969) с гомологичной последовательностью штамма *Sphingobium indicum* B90A (GenBank CP013070.1) – 99.65%. Известно, что нуклеотидные последовательности гена *linA* штаммов-деструкторов линдана *S. indicum* B90A (Индия), *S. japonicum* UT26 (Япония) и *S. framcense* Sp⁺ (Франция) характеризуются 100%-ым сходством (Lal et al., 2006). Анализ деструктивных аминокислотных последовательностей LinA_{NE1}, LinA₂₄₂, LinA_{B90A}, LinA_{UT26} и LinA_{Sp+} показал уровень сходства 100%. Таким образом,

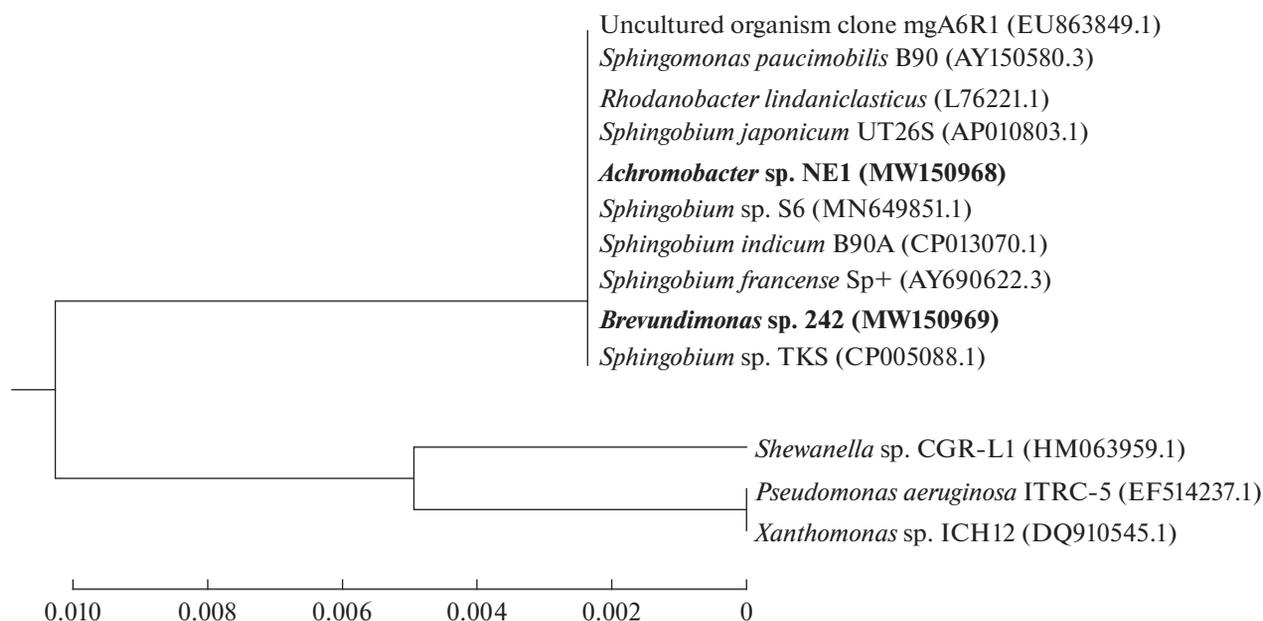


Рис. 2. Положение *linA*-генов штаммов *Achromobacter* sp. NE1 и *Brevundimonas* sp. 242 на филогенетическом дереве, построенном с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, вычисленная на основании “bootstrap”-анализа. В скобках указаны номера последовательностей *linA*-генов в GenBank.

можно предположить, что штаммы *Achromobacter* sp. NE1 и *Brevundimonas* sp. 242 осуществляют начальное дегалогенирование линдана по “верхнему” пути, под действием дегидрохлориназы LinA, характерной для бактерий рода *Sphingobium*.

Известно, что при разложении линдана по “верхнему” пути происходит образование опасных побочных продуктов – 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ (рис. 1) (Camacho-Pérez et al., 2012). При культивировании штамма *Brevundimonas* sp. 242 с линданом через 16 сут в среде зафиксировано 23.1 мг/л 1,2,4-ТХБ, а у штамма *Achromobacter* sp. NE1 – 32.8 мг/л 2,5-ДХФ. В условиях периодического культивирования на этапе отбора штаммов для исследования было установлено, что штамм NE1 разлагает 1,2,4-ТХБ со скоростью 2.71 ± 0.05 мг/л сут, а штамм 242 осуществляет деструкцию 2,5-ДХФ со скоростью 2.25 ± 0.02 мг/л сут. Анализ скорости деструкции субстратов, а также выявленных концентраций линдана, 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ через 16 сут культивирования позволяет предположить, что отсутствие в среде культивирования одного из побочных продуктов обусловлено дегративной активностью исследуемых штаммов.

При хроматографическом анализе культуральной среды в опытах с отмытыми клетками установлено, что разложение 1,2,4-ТХБ штаммом *Achromobacter* sp. NE1 происходит через стадию образования 3,4,6-трихлоркатехола (рис. 1). Известно, что данный путь биотрансформации обусловлен работой ферментов, кодируемых *tcb*-опероном (www.kegg.jp). Вероятно, штамм *Achromo-*

bacter sp. NE1 обладает уникальным сочетанием Lin- и Tcb-ферментативных систем.

Проведенные исследования не позволили установить промежуточные продукты разложения 2,5-ДХФ у штамма *Brevundimonas* sp. 242. В настоящее время описан один путь аэробной бактериальной трансформации 2,5-ДХФ – через стадию образования 2,5-дихлорбензохинона до 2,5-дихлоргидрохинона (рис. 1) (Fang et al., 2020). На основании полученных результатов можно предположить, что штамм 242 обладает ферментативными системами, схожими с комплексом TcrA+FcrE штамма *Cupriavidus nantongensis* X1^T, что в сочетании с ферментами деструкции линдана позволяет эффективно разлагать 2,5-ДХФ без накопления промежуточных продуктов.

Таким образом, в результате проведенного исследования впервые выделены штаммы-деструкторы линдана, принадлежащие родам *Achromobacter* и *Brevundimonas*. Уникальность штаммов *Achromobacter* sp. NE1 и *Brevundimonas* sp. 242 состоит в том, что начальное дегалогенирование линдана обусловлено действием дегидрохлориназы, кодируемой геном *linA*, наиболее близким к *linA*-гену известных штаммов-деструкторов линдана из рода *Sphingobium*. Следует отметить, что штаммы *Achromobacter* sp. NE1 и *Brevundimonas* sp. 242 обладают уникальной способностью разлагать наряду с линданом образующиеся при его деструкции побочные продукты – 1,2,4-ТХБ и 2,5-ДХФ. Подобные свойства для аэробных бактерий-деструкторов линдана описаны впервые.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовано оборудование молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, а также ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках НИОКР АААА-А19-119112290009-1 “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В исследовании не использованы в качестве объектов люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Герхардта Ф. и соавт. М.: Мир, 1983. Т. 1–3.

Methods for General and Molecular Bacteriology / Philipp Gerhardt, editor-in-chief. Eds. Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994. 791 p.

Camacho-Pérez B., Ríos-Leal E., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo M. Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: A mini review // J. Environ. Manag. 2012. V. 95. P. S306–S318.

Dong W.H., Zhang P., Lin X.Y., Zhang Y., Tabouré A. Natural attenuation of 1,2,4-trichlorobenzene in shallow aquifer at the Luhuagang’s landfill site, Kaifeng, China // Sci. Total Environ. 2015. V. 505. P. 216–222.

Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G., Kir’yanova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains // J. Hazard. Mater. 2020. V. 400. 123328.

Fang L., Qin H., Shi T., Wu X., Li Q.X., Hua R. Ortho and para oxydehalogenation of dihalophenols catalyzed by the monooxygenase TcpA and NAD(P)H:FAD reductase Fre // J. Hazard. Mater. 2020. V. 388. 121787.

Kumar D., Pannu R. Perspectives of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) biodegradation from the environment: a review // Bioresour. Bioproc. 2018. V. 5. P. 29.

Lal R., Dogra C., Malhotra S., Sharma P., Pal R. Diversity, distribution and divergence of *lin* genes in hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonads // Trends Biotech. 2006. V. 24. P. 121–130.

Lal R., Pandey G., Sharma P., Kumari K., Malhotra S., Pandey R., Raina V., Kohler H.P., Holliger C., Jackson C., Oakeshott J.G. Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010. V. 74. P. 58–80.

Pannu R., Kumar D. Process optimization of γ -hexachlorocyclohexane degradation using three novel *Bacillus* sp. strains // Biocat. Agric. Biothech. 2017. V. 11. P. 97–107.

Saez J.M., García V.C., Benimeli C.S. Improvement of lindane removal by *Streptomyces* sp. M7 by using stable microemulsions // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2017. V. 144. P. 351–359.

Song Y., Wang F., Kengara F.O., Bian Y.-R., Yang X.-L., Liu C.-Y., Jiang X. Improved biodegradation of 1,2,4-trichlorobenzene by adapted microorganisms in agricultural soil and in soil suspension cultures // Pedosphere. 2011. V. 21. P. 423–431.

Thomas J.-C., Berger F., Jacquier M., Bernillon D., Baud-Grasset F., Truffaut N., Norm P., Vogel T.M., Simonet P. Isolation and characterization of a novel γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 6049–6055.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.

Zaitsev G.M., Tsoi T.V., Grishenkov V.G., Plotnikova E.G., Boronin A.M. Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepeidonicum* and *Pseudomonas cepacia* strains // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 81. P. 171–176.

Zheng G., Selvam A., Wong J.W.C. Rapid degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) at low temperature by *Sphingobium* strains // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2011. V. 65. P. 612–618.

New Lindane-Degrading Strains *Achromobacter* sp. NE1 and *Brevundimonas* sp. 242

D. O. Egorova^{1,*}, E. A. Nazarova¹, and V. A. Demakov^{1,†}

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Department of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ural, Russia*

*e-mail: daryao@rambler.ru

Received November 3, 2020; revised December 4, 2020; accepted December 5, 2020

Abstract—Two strains were isolated, *Achromobacter* sp. NE1 (GenBank MW132988) and *Brevundimonas* sp. 242 (GenBank MW132989), which possessed a unique ability to use lindane and the intermediates of its aerobic biotransformation, 1,2,4-trichlorobenzene (strain NE1) and 2,5-dichlorophenol (strain 242) as a sole source of carbon and energy. The strains were found to contain the *linA* gene encoding dehydrochlorinase, the first enzyme of lindane degradation, exhibiting 99.65–100% sequence identity to the *linA* genes of *Sphingobium* degrader strains.

Keywords: lindane, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *linA*, 1,2,4-trichlorobenzene, 2,5-dichlorophenol

ВЫДЕЛЕНИЕ НОВОГО ХЕМОЛИТОТРОФНОГО СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩЕГО ФИРМИКУТА ИЗ ТЕРМАЛЬНОЙ СКВАЖИНЫ В ТЮМЕНИ

© 2021 г. И. А. Панова^а, М. А. Григорьев^а, Л. Б. Глухова^а, М. Р. Авакян^а, О. В. Карначук^а. *

^аКафедра физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики,
Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Поступила в редакцию 25.11.2020 г.

После доработки 01.12.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

Водород является ключевым энергетическим субстратом для микробных процессов в подземной биосфере. Известным примером экосистемы, основанной на гидрогенотрофном сульфатредукторе, “*Candidatus Desulforudis audaxviator*”, являются фракционные воды глубокой шахты по добыче золота в Южной Африке. В этом исследовании мы сообщаем о культивировании и выделении в чистую культуру нового облигатного хемолитотрофа, восстанавливающего сульфат при росте на водороде или формиате. Филогенетический анализ гена 16S рРНК штамма Tu-874 показал его кластеризацию с “*Candidatus Desulforudis audaxviator*”, который является ближайшим культивируемым родственником. Однако низкое сходство последовательностей гена 16S рРНК, составляющее 88.95%, предполагает, что организм представляет новую таксономическую группу надвидового уровня.

Ключевые слова: подземная биосфера, “*Candidatus Desulforudis audaxviator*”, сульфатредуцирующие бактерии, культивирование, хемолитотрофы

DOI: 10.31857/S0026365621030125

Подземные местообитания часто характеризуются низким содержанием органического вещества, с чем связано заселение этих биотопов хемолитоавтотрофными прокариотами. Водород является ключевым энергетическим субстратом для микробных процессов в подземной биосфере (Gregory et al., 2019). Наряду с биологическими реакциями источником H₂ могут являться абиотические процессы – радиолиз, серпентинизация, графитизация и катаклаз силикатов. Широко известным примером экосистемы, состоящей из единственного гидрогенотрофного организма “*Candidatus Desulforudis audaxviator*”, являются фракционные воды шахты Мпоненг в Южной Африке (Chivian et al., 2008). Авторы исследования показали, что источником формиата и водорода в термальных щелочных водах является радиолиз, в то время, как сульфат представляет преимущественный акцептор электронов. Геном “*Candidatus Desulforudis audaxviator*” содержит все необходимые пути для поддержания независимого биосинтеза, включая фиксацию азота и синтез всех аминокислот. В связи с этими особенностями метаболизма десульфурудиса вслед за расшифровкой генома последовали спекуляции о

возможности внеземной жизни, основанной на радиолизе (Atri et al., 2016).

После многочисленных попыток культивирования штамм “*Candidatus Desulforudis audaxviator*” ВУФ был выделен из глубинных вод Западно-Сибирского артезианского бассейна более чем через десять лет после определения последовательности композитного генома этого вида (Karnachuk et al., 2019). Эксперименты с чистой культурой показали, что, наряду с водородом, штамм ВУФ использует традиционные для сульфатредукторов органические доноры электронов – лактат, пируват, фумарат, сукцинат, пропионат, бутират, этанол, а также сахара – глюкозу и сахарозу, и не является облигатным хемолитотрофом.

Культивирование автотрофных гидрогенотрофов из подземной биосферы представляет значительные трудности в силу медленных скоростей роста. Другим препятствием при получении культур является низкий титр целевого организма в пробах воды. Концентрирование клеток путем фильтрации является неблагоприятным из-за резкой смены физико-химических условий. Анаэробные организмы могут быть особенно чувствительны к смене окислительно-восстановительного потенциала среды. Ранее мы показали, что микробные об-

Таблица 1. Физико-химические параметры воды скважины 3-р

Параметры и единицы измерения	Значения
pH	7.57
Температура, °C	54.0
<i>Eh</i> , mV	−461
Содержание в воде, мг/л:	
Na	4230
Mg	53.4
Ca	292
Si	5.71
K	19.3
Sr	9.45
B	2.95
Li	0.10
Fe	1.52
Ba	3.66
Se	0.019
P	0.005
Rb	0.017
Mn	0.25
Al	0.001
Ge	0.00048
Zn	0.0051
Cr	0.012
As	0.082
SO ₄ ²⁻	2.0

растания, формирующиеся на изливе глубинных термальных скважин, могут служить своеобразными фильтрами, концентрирующими организмы глубинной биосферы (Lukina et al., 2019, 2020). “Фильтрация” воды через микробные обрастания позволяет клеткам (или спорам) накапливаться в микроразонах с восстановительными условиями. Использование подобного инокулята может увеличивать эффективность культивирования. В этом исследовании мы сообщаем о выделении нового хемолитотрофного сульфатредуктора с использованием в качестве инокулята микробных обрастаний на устье глубинной нефтедобывающей скважины в Тюмени.

С целью выделения хемолитотрофов подземной биосферы были использованы микробные обрастания на изливе Ярской (3-р) термальной скважины в Тюмени. Скважина 3-р была сдана в эксплуатацию в 1953 году, и ее глубина составляет 2509 м. В настоящее время не известно, с какого горизонта происходит разгрузка артезианской воды. По данным Тюменского геологического управления вода скважины насыщена метаном, содержание которого достигает 63% газовой фазы, в воде также содержится этан, азот и углекислота. Общая минерализация воды составляет 11.8 г/л. В настоящее время скважина разгружается в бассейн, используемый в качестве СПА-центра. Пробы воды и микробных обрастаний были отобраны 25 февраля 2019 г. в местах стока термальной воды. Температуру, pH и окислительно-восстановительный потенциал измеряли pH-метром HI183141 (“Hanna Instruments”). Элементный состав воды определяли масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой, как описано ранее (Mardanov et al., 2016). Для культивирования использовали модифицированную (Карначук и соавт., 2006) среду Видделя–Бака (Widdel, Bak, 1992) с водородом или формиатом в качестве единственного донора электронов. В экспериментах с чистой культурой использовали следующие доноры электронов: 7.5 мМ формиат, 9 мМ ацетат, 7.3 мМ лактат, 13.5 мМ пропионат и 5 мМ глюкозу. В пенициллиновые флаконы со средой помещали небольшое количество матов (на кончике скальпеля), после чего инкубировали флаконы при температуре 55°C в анаэробных условиях. Для определения филогенетического положения изолята амплифицировали ген 16S рРНК с праймерами 27F-1492R. Выделение ДНК и условия амплификации проводили методами, описанными ранее (Frank et al., 2016).

Температура термальной артезианской воды скважины 3-р в момент отбора проб составляла 38.6°C, pH был нейтральным, 7.75 (табл. 1). Окислительно-восстановительный потенциал среды (−461 мВ) свидетельствовал о крайне восстановленных условиях, хотя сероводород, обычно присутствующий в восстановленных подземных водах, в воде скважины не обнаружили. Минерализация воды хлоридно-натриевого типа, содержание сульфата было близко к нулю. После инкубации кусочков микробных обрастаний в течение 1 мес. при температуре 55°C были получены накопительные сульфидогенные культуры, содержащие спорообразующие палочковидные клетки. Чистая культура была получена путем прогрева культуры при температуре 90°C в течение 30 мин и последующими десятикратными разведениями. Выделенная морфологически однородная культура суль-

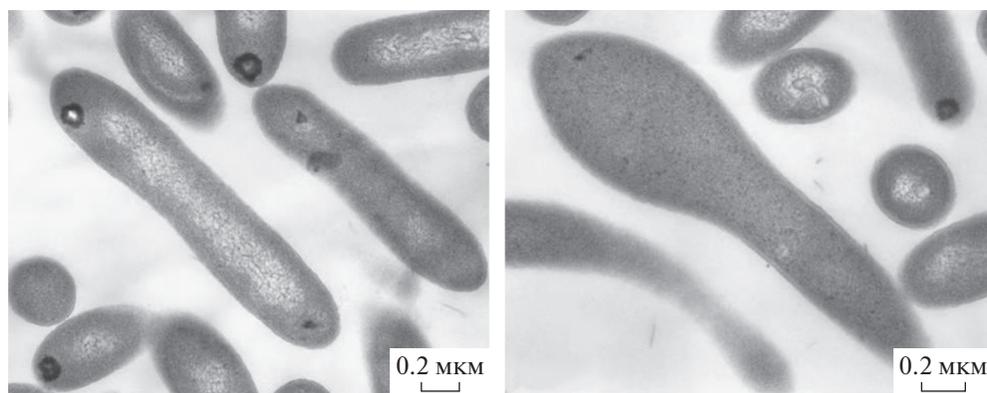


Рис. 1. Трансмиссионные электронные микрофотографии ультратонких срезов клеток штамма Tu-874 с электронно-плотными включениями.

фидогенов была обозначена как штамм Tu-874 и представляла спорообразующие палочки (рис. 1). Анализ последовательности гена 16S рРНК показал, что штамм Tu-874 филогенетически удален от известных культивируемых представителей семейства *Peptococcaceae* и его ближайшим родственником является “*Candidatus Desulforudis audaxviator*” со сходством последовательностей гена 16S рРНК 88.95% (рис. 2). Все ближайшие некультивируемые родственники штамма Tu-874 были обнаружены в подземных горизонтах, таких как глубинные фракционные воды карбонатов в Калифорнии (номер доступа Генбанка KF939375), подземные воды в Южной Африке (DQ251787) и щелочные термальные воды в Дании (AY753399), что подтверждает его происхождение из глубинных горизонтов.

В дополнение к водороду, штамм рос на формиате или смеси формиата с ацетатом. Эксперименты показали отсутствие роста штамма Tu-874 на других органических донорах электрона, включая лактат, пируват, этанол, глюкозу и фруктозу, демонстрируя облигатную хемолитотрофию. Ближайшим родственником штамма является “*Candidatus Desulforudis audaxviator*”, хотя значительное расхождение последовательностей гена 16S рРНК предполагает, что организмы относятся к разным родам и, возможно, к разным семействам. В отличие от “*Candidatus Desulforudis audaxviator*”, использующего широкий спектр органических доноров электрона, Tu-874 растет только на C1-соединениях. Электронная микроскопия выявила в клетках Tu-874 электронно-плотные включения, аналогичные предполагаемым ацидокальцисомам десульфуродиса. “*Candidatus Desulforudis audaxviator*” был обнаружен в различных географически удаленных экосистемах (Kjeldsen et al., 2007; Tiago, Verissimo, 2013). Обнаружение Tu-874 и характер

его роста свидетельствует о том, что отличные от десульфуродиса, но кластеризующиеся с ним в отдельную филогенетическую группу бактерии могут населять подземные горизонты. Энергетический метаболизм представителей группы основан на неорганических источниках энергии для восстановления сульфата. Факт низкого содержания сульфата в подземной воде может предполагать его использование в процессе сульфатредукции, косвенным подтверждением чего является высокое содержание бария и стронция. Дальнейшее определение последовательности генома прояснит таксономический уровень новой группы, представителем которой является Tu-874, а также идентифицирует наличие или отсутствие биохимических путей использования органических доноров электронов для сульфатредукции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим Романа Латынцева за помощь в отборе проб воды и матов в Тюмени.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом РФФ № 18-14-00130.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Вклад авторов: И.А. Панова — культивирование; М.А. Григорьев — культивирование; Л.Б. Глухова —

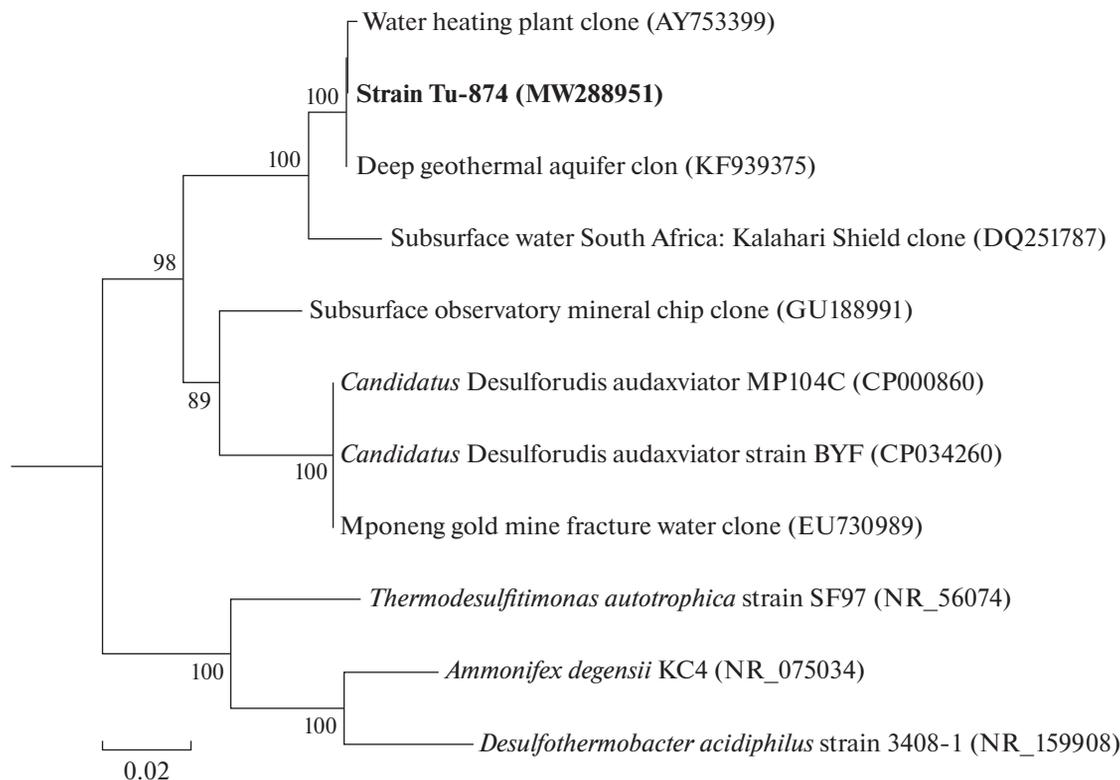


Рис. 2. Дерево, показывающее филогенетическое положение штамма Tu-874 на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК, определенное методом Neighbor-Joining. Бутстреппы рассчитаны из 1000 итераций. Дерево построено с использованием MEGA X.

выделение и амплификация ДНК; М.Р. Авакян – филогенетический анализ; О.В. Карначук – планирование экспериментов, отбор проб, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Atri D. On the possibility of galactic cosmic ray-induced radiolysis-powered life in subsurface environments in the Universe // J. R. Soc. Interface. 2016. V. 13. Art. 20160459.

Chivian D., Brodie E.L., Alm E.J., Culley D.E., Dehal P.S., DeSantis T.Z., Gihring T.M., Lapidus A., Lin L.H., Lowry S.R., Moser D.P., Richardson P.M., Southam G., Wanger G., Pratt L.M., Andersen G.L., Hazen T.C., Brockman F.J., Arkin A.P., Onstott T.C. Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth // Science. 2008. V. 10. P. 275–278.

Frank Y., Banks D., Avakian M., Antsiferov D., Kadychagov P., Karnachuk O. Firmicutes is an important component of microbial communities in water-injected and pristine oil reservoirs, Western Siberia, Russia // Geomicrobiol. J. 2016. V. 33. P. 387–400.

Gregory S.P., Barnett M.J., Field L.P., Milodowski A.E. Sub-surface microbial hydrogen cycling: natural occurrence and implications for industry // Microorganisms. 2019. V. 7. Art. 53. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020053>

Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // ISME J. 2019. V. 13. P. 1947–1959.

Karnachuk O.V., Pimenov N.V., Yusupov S.K., Frank Y.A., Puhakka Y.A., Ivanov M.V. Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 82–89.

Kjeldsen K.U., Kjellerup B.V., Egli K., Frølund B., Nielsen P.H., Ingvorsen K. Phylogenetic and functional diversity of bacteria in biofilms from metal surfaces of an alkaline district heating system // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 61. P. 384–397.

Lukina A.P., Avakyan M.R., Danilova E.V., Karnachuk O.V. Application of microbial mats for the isolation of spore-forming prokaryotes from deep biosphere // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 748–752.

Lukina A.P., Frank Y.A., Ivashenko D.A., Glukhova L.B., Danilova E.V., Avakyan M.R., Karnachuk O.V. Isolation of new thermophilic sulfidogens from microbial mat associated with groundwater discharge in the Tunkin valley // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 642–645.

Mardanov A.V., Panova I.A., Beletsky A.V., Avakyan M.R., Kadnikov V.V., Antsiferov D.V., Banks D., Frank Y.A., Pimenov

ov N.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V. Genomic insights into a new acidophilic, copper-resistant *Desulfosporosinus* isolate from the oxidized tailings area of an abandoned gold mine // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. P. fiw111.

Tiago I., Verissimo A. Microbial and functional diversity of a subterrestrial high pH groundwater associated to ser-

pentization // Environ. Microbiol. 2013. V. 15. P. 1687–1706.

Widdel F.F., Bak R. Gram negative mesophilic sulfate reducing bacteria // The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications / Eds. Balows A. et al. Berlin: Springer, 1992. P. 3352–3378.

Isolation of a Novel Chemolithotrophic Sulfate-Reducing Firmicute from a Tyumen Thermal Borehole

I. A. Panova¹, M. A. Grigoriev¹, L. B. Glukhova¹, M. R. Avakyan¹, and O. V. Karnachuk^{1,*}

¹Department of Plant Physiology, Biotechnology, and Bioinformatics, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Received November 25, 2020; revised December 1, 2020; accepted December 1, 2020

Abstract—Hydrogen is a key *energy*-yielding substrate for microbial processes in the deep biosphere. Fracture water of a deep gold mine in South Africa is a well-known example of the ecosystem based on a hydrogenotrophic sulfate reducer, “*Candidatus Desulforudis audaxviator*.” The present work reports the cultivation and pure culture isolation of a novel obligate chemolithotroph reducing sulfate during growth on hydrogen or formate. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of the strain Tu-874 showed its clusterization with its closest cultured relative, “*Candidatus Desulforudis audaxviator*.” However, the low 16S rRNA sequence similarity of 88.95% indicates that the organism represents a new taxonomic group above the species level.

Keywords: deep biosphere, “*Candidatus Desulforudis audaxviator*,” sulfate-reducing bacteria, cultivation, chemolithotrophs

НОВАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ “*DESULFORUDIS AUDAXVIATOR*”

© 2021 г. А. П. Лукина^а, О. В. Карначук^{а, *}

^аКафедра физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики,
Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 22.01.2021 г.

Медленнорастущие трудно культивируемые прокариоты требуют специальных условий при выращивании в лаборатории. Часто трудности, связанные с культивированием, препятствуют депонированию новых изолятов в коллекции и приданию им таксономического статуса. Сульфатредуцирующий фирмикут, “*Desulforudis audaxviator*” BYF, был выделен из воды глубокой термальной скважины в Западной Сибири. В этом исследовании мы продемонстрировали, что снижение концентрации кальция и фосфатов, а также дополнительное внесение в среду полиамина спермидина увеличивает скорость роста и образование биомассы бактерией.

Ключевые слова: “*Desulforudis audaxviator*”, культивирование, спермидин

DOI: 10.31857/S0026365621030101

В последние годы растет количество сообщений об успешном выделении в культуру медленнорастущих трудно культивируемых прокариот (Sone et al., 2018; Pascual et al., 2018). Эти организмы удается выращивать в лаборатории, однако низкие концентрации клеток в культуре и медленный рост часто препятствуют выполнению условий, необходимых для валидации организма и описания новых таксонов. Ярким примером является недавнее сообщение о культивировании археи “*Candidatus Prometheoarchaeum syntrophicum*”, принадлежащей к “Asgard”-археям, предположительным предкам эукариот (Imachi et al., 2020). Выделение медленнорастущего организма (со временем удвоения 14–25 дней) заняло более десяти лет. Медленный рост, мониторинг которого осуществляется путем количественной ПЦР, не позволил исследователям депонировать архею в две международные коллекции и выполнить условие, необходимое для таксономического описания. Из данных литературы известны примеры, когда культивирование прокариот может быть усовершенствовано не путем нахождения более эффективных энергетических субстратов, а изменением содержания в среде азота и фосфора. Классическим примером является культивирование новых ацидофильных метанотрофов и *Acidobacteria* из сфагновых болот с использованием питательных сред с низкой ионной силой и снижением содержания фосфатов (Dedysh, 2011).

Это исследование посвящено оптимизации среды культивирования выделенного ранее “*Desulforudis audaxviator*” BYF (Karnachuk et al., 2019). Первоначально бактерия была обнаружена во фракционных водах глубокой золотодобывающей шахты Мпоненг в Южной Африке (Chivian et al., 2008). Авторами был получен композитный геном бактерии после концентрирования ДНК из 5600 л фракционной воды, что было необходимо вследствие низкой концентрации клеток. Метагеномная и геномная информация показала, что этот штамм фактически является единственным обитателем экосистемы, и метаболизм организма основан на гидрогенотрофной сульфатредукции. На основании геологических наблюдений было предположено, что источником водорода в экосистеме является радиолиз воды, что породило спекуляции о возможной космической роли десульфурудиса (Atri et al., 2016). Все попытки культивирования организма на протяжении более десяти лет оставались безуспешными, что породило гипотезу об исключительно медленных скоростях роста и деления один раз в тысячу лет (Labonté et al., 2015). “*Desulforudis audaxviator*” BYF был выделен из глубоких подземных вод, вскрываемых термальной скважиной в поселке Белый Яр Томской области (Karnachuk et al., 2019). Артезианская вода скважины с температурой 40–45°C поступает с глубины 2 км, а ее состав определяется присутствием древней морской воды, разбавляемой со-

временными метеорными водами (Kadnikov et al., 2019). Общая минерализация воды составляет 1.8 г/л. Скорость роста штамма ВУФ в лабораторной культуре была значительно выше предполагаемых ранее и составляла 0.027 ч^{-1} (Karnachuk et al., 2019). Однако медленный рост при невысокой численности клеток препятствовал депонированию организма в международные коллекции и приданию валидного статуса роду и виду.

Целью этого исследования была оптимизация условий культивирования бактерии на основе геномной информации и полученных ранее данных об особенностях морфологии.

Наши эксперименты с чистой культурой “*Desulfurudis audaxviator*” ВУФ показали, что, наряду с водородом, организм использует традиционные для сульфатредукторов органические доноры электронов – лактат, пируват, фумарат, сукцинат, пропионат, бутират, этанол, а также сахара – глюкозу и сахарозу. Однако все попытки замены энергетического субстрата не повышали выход биомассы и скорость роста. Электронная микроскопия выявила в клетках бактерии электронно-плотные структуры, напоминающие ацидокальцисомы (Karnachuk et al., 2019). Дополнительные исследования элементного состава образований по описанной ранее схеме подтвердили, что электронно-плотные структуры обогащены кальцием и фосфором (рис. 1). Са и Р накапливались непосредственно в области предполагаемой ацидокальцисомы, в то время как распределение S и Fe в клетке было случайным. Образование сульфидов железа, часто связанных с клетками, является характерной особенностью роста сульфатредукторов (Ikkert et al., 2013). Мы предположили, что при выращивании бактерии на используемой ранее модифицированной среде Видделя–Бака (Karnachuk et al., 2019) избыток фосфора и кальция депонируется в ацидокальцисомах, что может приводить к дополнительным энергетическим затратам и снижению скорости роста. Глубинные воды, в которых обитает десульфурудис, характеризуются повышенной ионной силой по сравнению с пресноводными экосистемами из-за смешения древней морской воды с пресноводными осадками, питающими подземные горизонты. Несмотря на тот факт, что общая минерализация глубинной воды, вскрываемой скважиной в поселке Белый Яр, составляет 1.8 г/л, эти биотопы дефицитны по кальцию и магнию (Kadnikov et al., 2019). Содержание Са менее 10 мг/л и следовые количества фосфора были зафиксированы в воде (Frank et al., 2016). В силу специфики местообитания, простое разбавление основной среды, используемое исследователями при культивировании олиготрофов, не подходит для выращивания организмов из глубинных подземных горизонтов.

Для проверки гипотезы об ингибирующем действии высоких концентраций кальция и фосфора были поставлены эксперименты по определению кинетических параметров роста штамма ВУФ на среде со сниженным содержанием этих элементов. В экспериментах была использована пресноводная среда Видделя–Бака (Widdel, Bak, 1992), содержащая (в г/л): $\text{Na}_2\text{SO}_4 - 4$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.2$; $\text{NH}_4\text{Cl} - 0.25$; $\text{NaCl} - 1$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.4$; $\text{KCl} - 0.5$; $\text{CaCl}_2 - 0.113$. Дополнительно к основной среде вносили 2 мл раствора витаминов, 1 мл раствора микроэлементов, по 1 мл раствора Na_2SeO_3 и Na_2WO_4 . Формиат (7.5 мМ) и ацетат (2.5 мМ) использовали в качестве донора электронов и источника углерода. Ранее мы модифицировали среду Видделя–Бака для культивирования штамма ВУФ, внося удвоенное количество (48 г/л) восстановителя, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, и элементное железо, присутствие которого является необходимым для роста бактерии (Karnachuk et al., 2019). В этом исследовании в опытных вариантах снижали концентрацию солей кальция и фосфата. В первом варианте опыта концентрация CaCl_2 в модифицированной среде Видделя–Бака была снижена с 0.113 до 0.025 г/л без изменения других компонентов среды. Во втором варианте – концентрация KH_2PO_4 была снижена с 0.2 до 0.05 г/л основной среды. В контрольном варианте состав среды не изменяли. Для снижения концентрации фосфата и кальция в инокуляте для опытных вариантов проводили предварительные пересевы культуры на модифицированную среду с низкой концентрацией, так как культура не выдерживает отмывки путем центрифугирования. За ростом следили по количеству клеток в культуре, которое учитывали в трех повторностях, как описано ранее (Karnachuk et al., 2019).

Культивирование штамма ВУФ в двух опытных вариантах на модифицированных средах приводило к увеличению количества клеток в культуре по сравнению с контролем (рис. 2). Максимальная численность клеток в конце логарифмической фазы роста составляла 1.2×10^6 на среде со сниженной концентрацией кальция, в то время как в контроле не превышала 1.5×10^5 клеток/мл. Снижение концентрации кальция и фосфатов приводило к сокращению лаг-фазы по сравнению с контролем. Однако удельная скорость роста возросла до 0.046 ч^{-1} (время удвоения 15.1 ч) против 0.026 ч^{-1} (время удвоения 26.7 ч) в контроле только на среде с пониженным содержанием кальция. Оба экспериментальных варианта характеризовал ранний лизис клеток в конце стационарной фазы.

Геномная информация о метаболизме сложно культивируемой бактерии также может помочь в усовершенствовании условий культивирования (Karnachuk et al., 2020). Мы обратили внимание

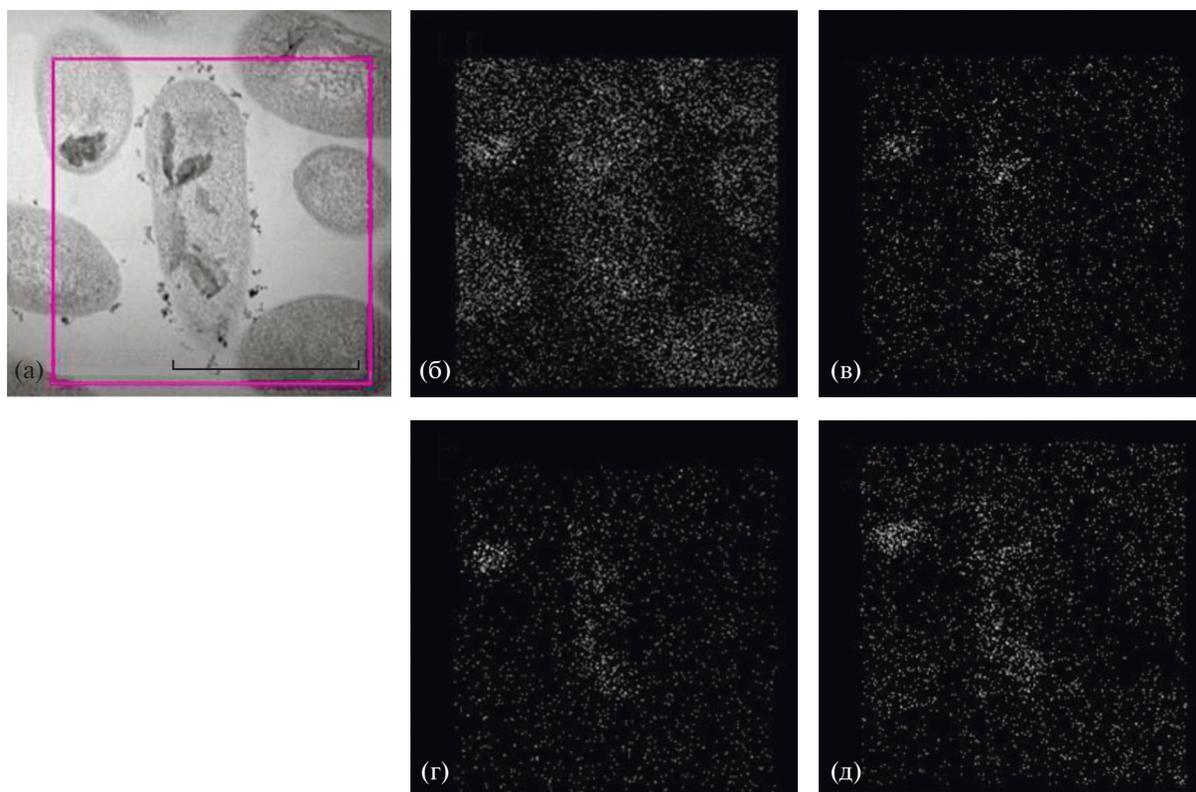


Рис. 1. Трансмиссионная электронная микрофотография ультратонких срезов клеток “*Desulforudis audaxviator*” BYF с электронно-плотными структурами (а). Картирование элементов с применением рентгеновского микроанализа (б–д): б – распределение серы; в – распределение железа; г – распределение фосфора; д – распределение кальция. Длина масштабной линейки – 600 нм.

на присутствие белков, участвующих в синтезе полиаминов в геноме “*Desulforudis audaxviator*”. Спермидинсинтаза и агманитаза, необходимая для синтеза предшественника спермидина, находятся в одном опероне, что предполагает существование действующего пути синтеза спермидина у бактерии. Хотя существует доказанная связь синтеза полиаминов с термофилией у прокариот, роль спермидина в метаболизме бактерий до сих пор остается малоизученной (Michael, 2018). Существуют предположения о возможности связывания полиаминов с пептидогликаном клеточной стенки, что повышает ее ригидность (Hirao et al., 2000; Hamana et al., 2012). Наиболее вероятной гипотезой мы считаем участие спермидина в защите от окислительного стресса. Ранее участие полиаминов, спермидина и путресцина, в защите от токсичного действия O_2 , супероксида и перекиси водорода было продемонстрировано на мутантах *E. coli* с нарушенным синтезом полиаминов (Chattopadhyay et al., 2003). В наших экспериментах мы дополнительно вносили спермидин (“Bio-Chemica PanReac AppliChem”) в модифицированную среду Видделя–Бака в концентрации 1.45 мг/л. В среде с добавлением спермидина наблюдали максимальную удельную скорость роста штамма

BYF, которая составляла 0.086 ч^{-1} (время удвоения 8.05 ч) (рис. 3), а максимальная концентрация клеток в конце логарифмической фазы достигала значения 7×10^5 кл./мл. Добавление спермидина так-

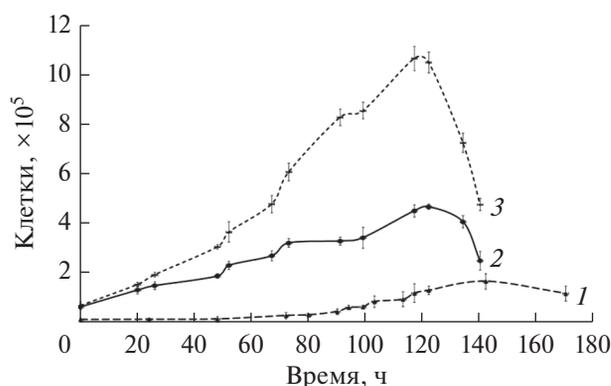


Рис. 2. Рост штамма “*Desulforudis audaxviator*” BYF на модифицированной среде Видделя с формиатом (представленный как количество клеток в мл среды): 1 – контроль; 2 – среда со сниженной концентрацией KH_2PO_4 ; 3 – среда со сниженной концентрацией $CaCl_2$. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение.

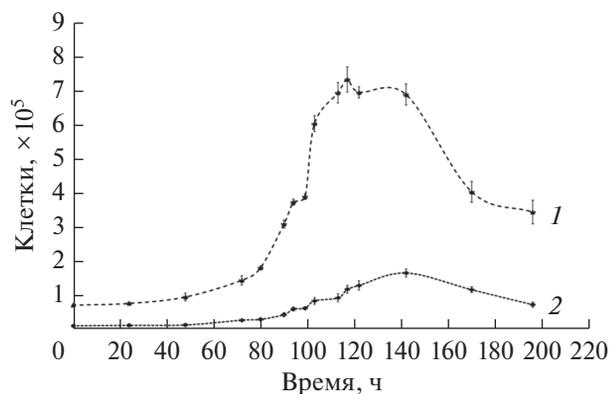


Рис. 3. Рост штамма “*Desulforudis audaxviator*” ВУФ на модифицированной среде Видделя с формиатом (представленный как количество клеток в мл среды): 1 – контроль; 2 – среда с добавлением спермидина. Вертикальные линии показывают стандартное отклонение.

же снижало длительность лаг-фазы. Таким образом, снижение концентрации кальция и фосфора в основной среде Видделя–Бака и дополнительное внесение спермидина позволяет выращивать культуру штамма “*Desulforudis audaxviator*” ВУФ в лабораторных условиях со скоростями, сопоставимыми для традиционных анаэробов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом РНФ № 18-14-00130.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: А.П. Лукина – культивирование; О.В. Карначук – планирование экспериментов, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Atri D. On the possibility of galactic cosmic ray-induced radiolysis-powered life in subsurface environments in the Universe // J. R. Soc. Interface. 2016. V. 13(123). P. 20160459.
 Chattopadhyay M.K., Tabor C.W., Tabor H. Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 2261–2265.
 Chivian D., Brodie E.L., Alm E.J., Culley D.E., Dehal P.S., DeSantis T.Z., Gihring T.M., Lapidus A., Lin L.H., Lowry S.R., Moser D.P., Richardson P.M., Southam G., Wanger G.,

Pratt L.M., Andersen G.L., Hazen T.C., Brockman F.J., Arkin A.P., Onstott T.C. Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth // Science. 2008. V. 10. P. 275–278.

Dedysh S.N. Cultivating uncultured bacteria from northern wetlands: knowledge gained and remaining gaps // Front. Microbiol. 2011. V. 2. Art. 184.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00184>

Frank Y.A., Kadnikov V.V., Lukina A.P., Banks D., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Sen'kina E.I., Avakyan M.R., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Characterization and genome analysis of the first facultatively alkaliphilic *Thermodesulfovibrio* isolated from the deep terrestrial subsurface // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 2000.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02000>

Hamana K., Itoh T., Sakamoto M., Hayashi H. Covalently linked polyamines in the cell wall peptidoglycan of the anaerobes belonging to the order *Selenomonadales* // J. Gen. Appl. Microbiol. 2012. V. 58. P. 339–347.

Hirao T., Sato M., Shirahata A., Kamio Y. Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica* // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 1154–1157.

Ikkert O.P., Gerasimchuk A.L., Bukhtiyarova P.A., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V. Characterization of precipitates formed by H₂S-producing, Cu-resistant Firmicute isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste // Antonie Van Leeuwenhoek. 2013. V. 103. P. 1221–1234.

Imachi H., Nobu M. K., Nakahara N., Morono Y., Ogawara M., Takaki Y., Takano Y., Uematsu K., Ikuta T., Ito M., Matsui Y., Miyazaki M., Murata K., Saito Y., Sakai S., Song C., Tasumi E., Yamanaka Y., Yamaguchi T., Kamagata Y., Tamaki H., Takai K. Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface // Nature. 2020. V. 577. P. 519–525.

Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Genome of the candidate phylum *Aminicenantes* bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle // Extremophiles. 2019. V. 23. P. 189–200.

Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated “*Candidatus Desulforudis audaxviator*” from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // ISME J. 2019. V. 13. P. 1947–1959.

Karnachuk O.V., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Sherbakova V.A., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Targeted isolation based on metagenome-assembled genomes reveals a phylogenetically distinct group of thermophilic spirochetes from deep biosphere // Environ. Microbiol. 2020. Epub ahead of print. PMID: 32869496.

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.1521832869496>

Kato S., Yamagishi A., Daimon S., Kawasaki K., Tamaki H., Kitagawa W., Abe A., Tanaka M., Sone T., Asano K., Kamagata Y. Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. e00807-18.

Labonté J.M., Field E.K., Lau M., Chivian D., Van Heerden E., Wommack K.E., Kieft T.L., Onstott T.C., Stepanauskas R. Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and vi-

ral infections in a deep subsurface Firmicutes population // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00349>

Michael A.J. Polyamine function in archaea and bacteria // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. P. 18693–18701.

Pascual J., Foesel B.U., Geppert A., Huber K.J., Boedeker C., Luckner M., Wanner G., Overmann J. *Roseisolibacter agri* gen. nov., sp. nov., a novel slow-growing member of the un-

der-represented phylum Gemmatimonadetes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 1028–1036.

Widdel F.F., Bak R. Gram negative mesophilic sulfate reducing bacteria // The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications / Eds. Balows A. et al. Berlin: Springer, 1992. P. 3352–3378.

A Novel Medium for Cultivation of “*Desulforudis audaxviator*”

A. P. Lukina¹ and O. V. Karnachuk^{1,*}

¹Department of Plant Physiology, Biotechnology, and Bioinformatics, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Received November 30, 2020; revised January 20, 2021; accepted January 22, 2021

Abstract—Slow-growing, hard-to-cultivate prokaryotes require special conditions for laboratory cultivation. The difficulty in cultivation may often prevent depositing the new isolates in the culture collections in order to validate their taxonomic status. The sulfate-reducing firmicute “*Desulforudis audaxviator*” strain BYF, has been isolated from a deep thermal borehole in West Siberia. In this study we showed that decreasing the concentrations of calcium and phosphate, as well as addition of a polyamine spermidine, increased the growth rate and biomass formation by this bacterium.

Keywords: “*Desulforudis audaxviator*,” cultivation, spermidine

К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН ЕЛИЗАВЕТЫ АЛЕКСАНДРОВНЫ БОНЧ-ОСМОЛОВСКОЙ

DOI: 10.31857/S0026365621030058

27 января 2021 г. исполнилось 70 лет со дня рождения видного российского микробиолога, члена редколлегии журнала “Микробиология” Елизаветы Александровны Бонч-Осмоловской.

Елизавета Александровна Бонч-Осмоловская – доктор биологических наук (1994 г.), профессор (2013 г.), член-корреспондент РАН (2016 г.), специалист в области разнообразия, метаболизма и экологии термофильных прокариот, ученица выдающегося микробиолога академика Г.А. Заварзина. С 1996 по 2017 годы она заведовала лабораторией гипертермофильных микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. За время существования возглавляемой Е.А. Бонч-Осмоловской лаборатории ее сотрудниками совершены десятки экспедиций в районы наземных и подводных гидротерм, изучены микробные сообщества подземных термальных местообитаний. С непосредственным участием и под руководством Е.А. Бонч-Осмоловской выделены и описаны многочисленные новые умеренно-, экстремально- и гипертермофильные археи и бактерии; создана единственная в своем роде коллекция термофильных прокариот, насчитывающая более 300 штаммов. Среди новых изолятов – представители новых таксонов, в том числе высокого ранга, микроорганизмы с новыми типами метаболизма (использующие новые источники энергии и акцепторы электронов), продуценты термостабильных ферментов. В сотрудничестве с Центром “Биоинженерия” РАН секвенированы и проанализированы десятки полных геномов термофильных архей и бактерий, выявлены гены, кодирующие ценные для биотехнологии новые ферменты. С 2018 года по настоящее время Е.А. Бонч-Осмоловская возглавляет отдел биологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН и заведует кафедрой микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Е.А. Бонч-Осмоловская – автор более 200 статей в отечественных и зарубежных журналах (в том числе в “Nature”), индексируемых в базах WoS и Scopus, соавтор книги “Экология микроорганизмов” (2013, 2015 гг.), автор более 20 глав в

книгах в российских и международных изданиях, руководитель большого числа российских и международных исследовательских проектов, в том числе проектов РФФИ, РНФ, Минобрнауки РФ. Научный коллектив, возглавляемый Е.А. Бонч-Осмоловской, был участником ряда Программ фундаментальных исследований Президиума РАН (в том числе “Молекулярная и клеточная биология”, “Происхождение биосферы и эволюция геобиологических систем”), а также проекта “Hotzyme” 7-й Европейской рамочной программы, посвященного поиску новых термостабильных ферментов для биотехнологии, и проекта “HotSolute” МОН РФ и Европейской Комиссии в программе Европейского союза “ERA CoBioTech”, посвященного поиску и изучению новых метаболитов и их продуцентов для сельскохозяйственной биотехнологии и косметической промышленности. Под руководством и при консультировании Е.А. Бонч-Осмоловской защищено 4 докторские и более 10 кандидатских диссертаций. Ею разработан ряд учебных курсов лекций для студентов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Е.А. Бонч-Осмоловская – постоянный член оргкомитетов и докладчик международных симпозиумов Extremophiles и Thermophiles, член президиума ISME (Международного общества микробной экологии), член редколлегии журналов “Микробиология”, “Central European Journal of Biology” и “Archaea”. В 2004 г. за выдающиеся успехи в исследованиях термофильных микроорганизмов Е.А. Бонч-Осмоловской была присуждена премия им. Моррисона Рогозы Американского микробиологического общества. В 2012 г. за цикл работ “Разнообразие термофильных прокариот” Е.А. Бонч-Осмоловская удостоена премии Президиума РАН им. С.Н. Виноградского, присуждаемой за выдающиеся работы в области общей микробиологии. В 2013 году она была избрана членом Американской Академии Микробиологии, в 2016 г. удостоена премии Берги (Bergey Award 2016) за выдающийся вклад в развитие систематики и геномики термофильных прокариот,

в 2018 г. избрана членом Европейской академии микробиологии.

С 2013 г. по настоящее время Е.А. Бонч-Осмоловская является заместителем председателя экспертного совета ВАК РФ по биологическим наукам, в 2017 г. избрана в состав Совета по науке при Министерстве образования и науки РФ, а также является Президентом Межрегиональной обще-

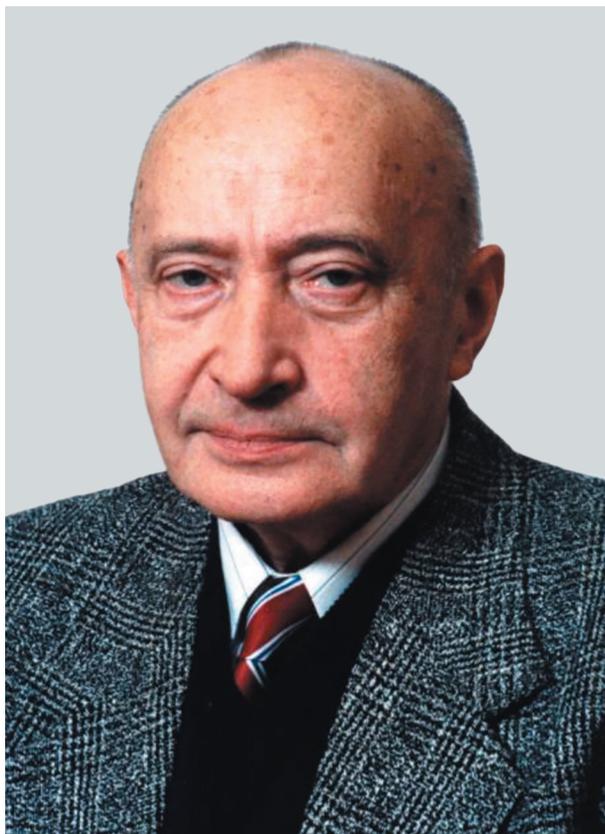
ственной организации “Микробиологическое общество”.

Бесспорный лидер и вдумчивый руководитель, Е.А. Бонч-Осмоловская пользуется большим доверием и заслуженным уважением коллег. Желаем Елизавете Александровне доброго здоровья и новых творческих успехов на благо российской науки.

Редколлегия журнала “Микробиология”

ПАМЯТИ ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА РАН ЛЬВА ВЛАДИМИРОВИЧА КАЛАКУЦКОГО

DOI: 10.31857/S002636562103006X



08 ноября 2020 г. ушел из жизни Лев Владимирович Калакуцкий – выдающийся отечественный микробиолог, ученый с мировым именем и безупречной репутацией. Лев Владимирович родился 11 мая 1932 г. в Москве, в семье служащих. В 1955 г. он окончил биолого-почвенный факультет МГУ им. М.В. Ломоносова и был принят на работу в Институт микробиологии АН СССР, где прошел путь от лаборанта до заведующего лабораторией. В 1961 году он защитил кандидатскую диссертацию (“О строении поверхности воздушного мицелия актиномицетов”), а в 1972 – докторскую (“Биология развития актиномицетов”). В 1976 г. по приглашению Г.К. Скрыбина Лев Владимирович перешел на работу в Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР (Пушино). В 1987 г. был избран членом-корреспондентом АН СССР.

Лев Владимирович Калакуцкий – яркий пример ученого-энциклопедиста, обладавшего глубокими профессиональными знаниями, организаторским талантом, научной честностью, высокой духовностью и активной жизненной позицией. Его идеи опережали время, а его широкий научный кругозор был хорошо известен как в стране, так и за рубежом. Его коллеги вспоминают случай, когда в одном из запросов Организации по экономическому сотрудничеству и развитию (ОЭСР) в Министерство образования и науки РФ о состоянии дел в области микробных ресурсов и доступа к ним, в сопроводительном письме стояла приписка: “Если Вы не знаете, как ответить на данные вопросы, спросите у профессора Калакуцкого”.

Основным направлением научных исследований Льва Владимировича было изучение разнообразия микроорганизмов (преимущественно актиномицетов). При непосредственном личном участии и под его руководством был выделен и детально описан ряд новых видов и родов этой группы микроорганизмов, получены оригинальные данные об их биологии, экологии, физиологии, изменчивости и циклам развития, а также изучены процессы отбора спонтанных вариантов в популяциях актиномицетов, охарактеризованы важные элементы их взаимоотношений с растениями. Этот цикл работ был отмечен премией им. С.Н. Виноградского АН СССР в 1983 г.

Лев Владимирович – автор и соавтор свыше 250 научных публикаций в российских и зарубежных изданиях – статей, научных обзоров монографического характера и монографий, научно-методических руководств по микробиологии и коллекционному делу, в их числе, в авторитетном международном издании “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”.

Значительный период жизни Льва Владимировича был посвящен становлению коллекционного дела в стране. В конце 1970-х годов он становится одним из инициаторов возрождения и развития Всесоюзной коллекции микроорганизмов, а в период 1980–2003 г. руководит отделом “Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ)”, функционирующим в составе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Эти годы характеризуются выходом ВКМ в между-

народное пространство профессиональной коллекционной деятельности, установлением научных и дружеских контактов со специалистами ведущих мировых коллекций. Лев Владимирович принимал участие в формировании и деятельности Европейской организации коллекций культур (ЕССО), официально созданной в 1981 г. Его знания, профессионализм и деловые качества были высоко оценены зарубежными коллегами, избравшими его Президентом ЕССО (1988 г.).

Сознавая масштабы задач, связанных с развитием фонда генетических микробных ресурсов для развития науки и страны, Лев Владимирович много времени уделял деятельности по объединению усилий организаций, заинтересованных в развитии биологических коллекций. В рамках возглавленного им проекта Программы научно-технического развития стран-членов СЭВ (КП НТП СЭВ) был опубликован первый Указатель (Каталог) видов микроорганизмов, поддерживаемых в 37 коллекциях, включая коллекции различных республик СССР и ряда стран социалистического лагеря. Для вошедших в проект коллекций был разработан единый стандарт и единый инструментарий информационной системы, создана общая база данных. Полученный ИБФМ в 1987 г. выделенный канал связи в зарубежные электронные сети был невероятным прорывом, позволившим к началу 90-х гг. создать активно работающую распределенную сеть коллекций стран-членов СЭВ. Следует отметить, что эти работы были выполнены задолго до начала организации западных центров биологических ресурсов и их сетевого взаимодействия.

В рамках проекта СЭВ институтом были получены из Болгарии первые пятнадцать ЭВМ типа “Правец”, не имеющих жестких дисков и работающих с дискетами для загрузки и сохранения данных. С присущей ему скромностью и ответственностью Лев Владимирович оставил в ИБФМ только две машины – в ВКМ и Центре вычислительной техники, тогда как остальные ЭВМ были отправлены в Киев, Минск, Ленинград, Баку, Ереван, Ташкент, Тарту, Вильнюс, Ригу и другие города. В развитие данного направления позднее были выпущены сводные электронные каталоги 17-ти коллекций России (2002 г.) и микроорганизмов, перспективных для агробiotехнологий, поддерживаемых в восьми российских и европейских коллекциях (2013 г.). Каталоги ВКМ и ряда других российских коллекций были позднее интегрированы в Глобальный каталог Всемирного центра данных о микроорганизмах (WDCM). Начиная с 2009 г., Лев Владимирович руководил работой коллектива ВКМ в международном проекте, в том числе по созданию Глобальной сети биологических ресурсных центров (GBRCN) и Пан-европейской распределенной инфраструктуры микробных ресурсов (MIRRI).

Необходимо отдельно отметить прозорливость Льва Владимировича и его настойчивость в организации использования компьютерных сетей для получения и накопления общедоступной научной информации и создания творческой продуктивной среды. Лев Владимирович участвовал в подобных проектах не только как идеолог и администратор, но и как харизматическая энциклопедическая личность, вносящая и поддерживающая важнейшую компоненту общего дела – высокий уровень профессионализма, научную и человеческую духовность, энтузиазм и веру в успех дела, чем заражал и привлекал новых участников.

Важнейшее значение Лев Владимирович придавал экспертной и научно-организационной деятельности. В разные периоды времени он принимал активное участие в работе многочисленных российских и международных научных организаций, комитетов и комиссий, в том числе, созданных по его инициативе. Он выполнял обязанности Президента Европейской организации коллекций культур, вице-президента Всесоюзного микробиологического общества, эксперта от Российской Федерации в составах рабочих групп ОЭСР по вопросам биобезопасности и доступа к генетическим ресурсам в рамках реализации положений Конвенции о биологическом разнообразии, работал в составе комитетов Всемирной организации коллекций культур и Подкомитета по таксономии актиномицетов Международного комитета по систематике прокариот, в качестве члена экспертного совета РФФИ по физико-химической биологии, руководителя Рабочей группы по выработке концепции Биологических ресурсных центров (БРЦ) в России при Межведомственной комиссии по генно-инженерной деятельности. Его экспертная и научно-организационная деятельность в коллекционной сфере была связана, в том числе, с организацией и проведением семинаров и слушаний по вопросам биологических коллекций на академических площадках, в Общественной палате РФ и на Круглом столе Комитета по науке и высоким технологиям Государственной Думы. Важной вехой стала подготовка раздела по биокolleкциям, не утратившего своей актуальности и в настоящее время, для Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года.

Лев Владимирович работал в составе редколлегий ряда ведущих российских и зарубежных изданий, таких как журналы Микробиология, Успехи современной биологии, Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, FEMS Microbiology Reviews, FEMS Microbiology Letters, Cytology и др. В 1990 г. он был избран ассоциированным членом “Bergey’s Manual Trust”. Л.В. Калакуцкий был экспертом РАН, членом ученых советов ИБФМ РАН, Объединенного ученого совета ФИЦ “Пушкинский научный

центр биологических исследований РАН” и Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Работа с молодежью и подготовка кадров для работы в науке — еще один важнейший аспект деятельности Льва Владимировича, которому он уделял много внимания. Среди его учеников 5 докторов и 20 кандидатов наук — известных ученых, успешно работающих сегодня в России и других странах мира. Своим Учителем считают Льва Владимировича также все те, кто пошел за ним по нелегкому пути профессиональной коллекционной деятельности, кто многому у него научился, и прежде всего, глубокой убежденности в необходимости создания современных биоресурсных центров для развития науки и страны и самоотверженному служению делу.

Лев Владимирович читал курсы лекций в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова и Пушинском государственном университете (ныне Пушинский естественно-научный институт), был членом Диссертационного совета при Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, на протяжении многих лет выполнял обязанности Председателя Диссертационного совета ИБФМ РАН — вплоть до расформирования совета в связи с реорганизацией института и его включения в ФИЦ Пушинский научный центр Биологических исследований Российской Академии Наук (ФИЦ ПНЦБИ РАН). Защиты под его председательством всегда проходили в оживленной и торжественной атмосфере, это были настоящие праздники науки.

Долгое время Лев Владимирович выполнял обязанности первого проректора по науке Пушинского государственного университета (ПушГУ) — первого отечественного ВУЗа, созданного в 1992 году по Постановлению Правительства РФ на базе институтов Российской Академии наук, прообразом организованного спустя десятилетие Академического университета в Санкт-Петербурге (ныне Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алфёрова РАН). В сферу ответственности Льва Владимировича на этапе формирования ПушГУ входили разработка методологии и программ обучения и помощь преподавателям в подготовке современных лекционных курсов, которые должны были отражать самые последние достижения в науке. Подпись “Проректор Л.В. Калакуцкий” на программе курса являлась своеобразным знаком качества курса.

Заслуги в научной и научно-педагогической деятельности Льва Владимировича были отмечены

присвоением ему в 2017 г. звания “Почетный работник науки и техники Российской Федерации”.

И все же становление и развитие коллекций микроорганизмов в стране было главным делом жизни Льва Владимировича. Он был авторитетным ученым-подвижником, настоящим патриотом России, много сделавшим не только для развития первой отечественной микробной коллекции — ВКМ, но и основателем всего направления профессиональной коллекционной деятельности в стране. Под его руководством ВКМ стала крупнейшей микробной коллекцией России по объему и разнообразию фонда, международно-признанным центром депонирования штаммов для целей патентной процедуры и депонирования типовых штаммов вновь описываемых видов микроорганизмов, достигла уровня мировых стандартов по всем видам коллекционной деятельности. Фонд и сервисные услуги ВКМ сегодня востребованы широким кругом организаций в стране и мире, а общее число научных публикаций, подготовленных с использованием штаммов коллекции, приближается к 9000. ВКМ и ряд других российских коллекций стартовали и продолжают успешно работать в международных проектах по информатизации микробных коллекций по программам Европейского Союза и Всемирного центра данных о микроорганизмах (WDCM) — несмотря на углубление международной изоляции России.

Как на любом непроторенном пути, многое из того, что сделано Львом Владимировичем и его соратниками для развития коллекционного дела в стране, было сделано скорее не “благодаря”, а “вопреки” — руководствуясь глубокой убежденностью в необходимости биоколлекций как ценного ресурса для развития науки и биоэкономики. В этой связи часто вспоминаются слова Льва Владимировича: “Я то уже, к сожалению, не увижу результатов, но, может быть, Вы еще доживете...”.

Многое из того, что было задумано Львом Владимировичем, еще предстоит воплотить в жизнь. Развитие сотрудничества и формирование в России действующих биоресурсных центров мирового уровня, объединенных в сеть и интегрированных с ведущими биоресурсными центрами мира и международными базами данных наук о жизни, и выход российской науки на передовые рубежи станет лучшим продолжением его дела и будет ему светлой памятью...

Редколлегия журнала “Микробиология”

ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА ВАЛЕРИЯ КОНСТАНТИНОВИЧА ЕРОШИНА (28.12.1932–26.07.2020)

DOI: 10.31857/S0026365621030071



26 июля 2020 г. ушел из жизни Валерий Константинович Ерошин, советский и российский микробиолог, работавший в области общей и промышленной микробиологии, доктор биологических наук, профессор, один из старейших сотрудников Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР/РАН (ИБФМ АН СССР/РАН), соратник основателя ИБФМ и первого директора академика Н.Д. Иерусалимского (1965–1967 гг.) и многолетнего директора академика Г.К. Скрыбина (1968–1988 гг.), заведующий лабораторией ИБФМ АН СССР/РАН, лауреат Государственной премии СССР, заслуженный деятель науки РФ.

Валерий Константинович Ерошин родился 28.12.1932. В 1955 г. закончил кафедру физиологии

растений биолого-почвенного факультета МГУ. После окончания МГУ был распределен во Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический институт (ВНИХФИ, Москва), где работал в экспедициях по поиску лекарственных растений, продуцирующих алкалоиды. Вскоре В.К. Ерошин был переведен на работу по проведению микробиологической трансформации стероидов в полупромышленных биореакторах, результатом которой явился обзор по стероидам, перспективному, развивающемуся тогда направлению, а также два авторских свидетельства по культивированию микроорганизмов.

Вскоре В.К. Ерошин поступил в аспирантуру Института микробиологии Академии Наук (ИНМИ АН СССР), в лабораторию члена-корреспондента Н.А. Красильникова. В 1963 г. в ИНМИ АН СССР защитил кандидатскую диссертацию по теме “Обследование грибов *Mucorales* на превращение стероида S в связи с получением гормонов”.

После успешной защиты диссертации В.К. Ерошин был рекомендован Ученым советом ИНМИ на должность старшего научного сотрудника в новый Институт биохимии и физиологии микроорганизмов (ИБФМ) Пущинского научного центра биологических исследований АН СССР, а с 1967 г. возглавил лабораторию микробиологической технологии ИБФМ (позднее, отдел физиологии роста микробных культур), которой руководил до выхода на пенсию в 2004 г. В конце 60-х–начале 70-х годов и в 80-е годы являлся заместителем директора по науке ИБФМ, руководимого академиком Г.К. Скрыбиным.

В 1967–1968 гг. В.К. Ерошин проходил стажировку в Великобритании у одного из основоположников моделирования и теории микробного роста, профессора S. John Pirt в Колледже королевы Елизаветы (Queen Elizabeth College) Лондонского университета, позднее ставшим частью Королевского колледжа Лондона (King’s College London).

Лаборатория, позднее отдел, возглавляемый В.К. Ерошиным, проводил фундаментальные и прикладные исследования в области изучения кинетики роста микроорганизмов и оптимизации параметров непрерывного культивирования. Сотрудниками лаборатории под руководством В.К. Ерошина

была сформулирована теория материально-энергетического баланса микробного роста. Новые положения и тезисы концепции были включены в перечень понятий, символов и обозначений, принятых IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) для универсального применения в описании параметров микробных процессов (*Eroshin V.K.* // *Pure Appl. Chem.* 1992. V. 64(7). P. 1047–1053. <http://dx.doi.org/10.1351/pac199264071047>). В 70–80-е годы В.К. Ерошин являлся членом этой комиссии и представителем СССР (1987–1989 гг.)

Теория материально-энергетического баланса микробного роста и разработанные приемы непрерывного культивирования микроорганизмов явились базисом для качественно новых подходов к изучению физиологии микроорганизмов, оценки процессов их выращивания для производства микробной биомассы в промышленных масштабах. На базе этих исследований в 1978 году В.К. Ерошин защитил докторскую диссертацию. Теория материально-энергетического баланса микробного роста была высоко оценена международным научным сообществом. Многие статьи В.К. Ерошина, выпущенные в разные годы, включены в top 1% и получили статус Highly Influential Citations. Одна из статей, опубликованных в 1978 в журнале *Biotechnology and Bioengineering* была признана одной из лучших статей журнала в 20 веке (*Erickson L.E., Minkevich I.G., Eroshin V.K.* Application of mass and energy balance regularities in fermentation // *Biotechnology and Bioengineering.* 1978. V. 20. № 10. P. 1595–1621. *Biotech-*

nol Bioeng. 2000, Mar 20;67(6):748-74. PMID: 10699856).

В 1971 г. В.К. Ерошин вместе с коллективом авторов получил Государственную премию СССР за участие в разработке научных основ микробиологического получения белка из углеводов нефти, которые явились базисом для создания крупномасштабного (до 1 млн тонн в год) производства микробных белково-витаминных добавок для животноводства и птицеводства. В 1980х гг. СССР производил две трети мирового объема “белка одноклеточных” (single cell protein), что обеспечивало его относительную автономность от внешних производителей белковых добавок, в первую очередь, соевого шрота.

Другим важным направлением работ лаборатории, возглавляемой В.К. Ерошиным, был микробиологический синтез липидов. Результатом этой работы было обнаружение и изучение штаммов микроорганизмов, синтезирующих в значительных количествах липиды, например, арахидоновую кислоту. Позднее, в перечень работ лаборатории были включены исследования по деградации ЭДТА.

В конце 80-х–начале 90-х годов В.К. Ерошин совмещал должность директора института ВНИИСинтезбелок (Москва) с работой в ИБФМ.

Профессор В.К. Ерошин награжден орденами Трудового Красного Знамени (1986), Серебряной медалью ВДНХ СССР (1972 и 1980), Золотой медалью ВДНХ СССР (1981, 1983 и 1987), и медалью Ветеран труда (1989).

Редколлегия журнала “Микробиология”

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0026365621030186

Введение

Международный журнал “Микробиология” (*Microbiology, Moscow*) публикуется одновременно на русском и английском языках и распространяется как в бумажной, так и в электронной формах. Статьи, направленные для публикации в русской версии журнала на русском языке, подлежат переводу и опубликованию в английской версии журнала. В этих целях, а также для защиты авторского права от незаконного использования просим авторов заполнить и подписать бланки типовых договоров (образцы приведены на сайтах

русская версия:

<http://sciencejournals.ru/journal/mikbio/>

английская версия:

<http://pleiades.online/ru/journal/micbio/>

на использование данного произведения (статьи) Издательством, которые вступают в силу с момента принятия статьи к публикации и подлежат аннулированию, если статья не принята или отклонена издательством. Авторам статьи, созданной в порядке выполнения служебного задания (обязанностей), необходимо получить согласие работодателя и приложить его к договору. Заполненные бланки договоров сканируются и направляются в электронном виде автором в редакцию журнала одновременно с электронной версией статьи.

Общие положения

Журнал “Микробиология” публикует экспериментальные работы по всем фундаментальным проблемам микробиологии. К публикации принимаются оригинальные работы, содержащие материалы, характеризующиеся научной новизной, включающие описание новых теоретических и методических подходов к исследованию микробиологических проблем. Не принимаются работы, посвященные вопросам медицинской и ветеринарной микробиологии, а также фитопатологии.

В разделе “Краткие сообщения” публикуются только оригинальные экспериментальные статьи приоритетного характера, требующие ускоренной публикации, объемом не более 7 страниц машинописного текста, включая абстракт (не более 100 слов), рисунки, таблицы и список литературы. Приводимый в “Кратких сообщениях” фактиче-

ский материал вторично в журнале публиковаться не будет.

Журнал публикует обзоры, теоретические и дискуссионные статьи по наиболее актуальным вопросам микробиологии, заказанные редколлегией или представленные авторами и одобренные редколлегией, а также рецензии на научные книги, справочники, учебники, методические руководства, изданные как в России, так и за рубежом. В разделе “Хроника” печатаются сообщения о работе микробиологических учреждений, юбилейных датах, научных съездах, конференциях и т.д. При подготовке рукописи статьи автору(ам) следует руководствоваться изложенными далее правилами, при несоблюдении которых редакция не принимает статью к рассмотрению.

Порядок представления рукописей

Редакция принимает рукописи на рассмотрение только через Авторский портал (электронную редакцию): <https://publish.sciencejournals.ru>.

Представляемые материалы: текст статьи (в формате Microsoft Word, шрифт Times New Roman, размер 12); рисунки и таблицы, подписи к рисункам, список литературы и резюме на русском и английском (желательно) языках, сведения об авторах с указанием адреса, почтового индекса, контактных телефонов (служебного и домашнего/мобильного), электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией и работу с корректурой. Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных (подписи сканируются).

Все страницы рукописи, в том числе список литературы, таблицы и подписи к рисункам пронумеровываются сквозной нумерацией. Обозначение одной цифрой нескольких страниц (например, 2а, 2б и т.д.) не допускается. В тексте статьи нумеруются не только страницы, но и строки.

При этом текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок (в формате tif или jpg) — отдельным файлом.

При представлении рукописи следует приложить в редакцию сопроводительное письмо от учреждения, в котором выполнена работа. В нем должно быть указано, что представленный мате-

риал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях. Авторам – гражданам Российской Федерации, следует указать, что работа может быть опубликована в открытой печати, а также приложить к сопроводительному письму один экземпляр экспертного заключения своей организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов. Все эти документы необходимо сканировать и присылать в электронном виде.

Оформление рукописей

Статьи, представляемые в редакцию, должны быть тщательно отредактированы авторами в рукописи. Сообщаемые в статье данные о методах и результатах экспериментальных исследований излагаются лаконично и ясно. Заглавие статьи должно быть кратким (без подзаголовков) и точ-

но отражать ее содержание. Серийные статьи в виде “Сообщение 1, Сообщение 2” и т.д. не принимаются.

Заголовки бывают трех уровней. Заголовки I уровня набираются отдельным абзацем, заглавными буквами:

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Заголовки II уровня набираются отдельным абзацем, строчными буквами, курсивом:

Вымывание оксидаз из талломов лишайников

Заголовки III уровня набираются как часть абзаца и выделяются полужирным шрифтом:

Амплификация и секвенирование генов 16S рРНК и РБФК.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В ОСАДКАХ ЮЖНОГО БАЙКАЛА, СОДЕРЖАЩИХ Fe/Mn КОНКРЕЦИИ

© 2017 г. Т. И. Земская^{a, *}, А. В. Ломакина^{a, b}, Е. В. Мамаева^a, А. С. Захаренко^a,
А. В. Лихошвай^a, Ю. П. Галачянц^{a, b}, Б. Миллер^c

^a*Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033, Россия*

^b*Иркутский научный центр СО РАН, Иркутск, 664033, Россия*

^c*Eawag, Швейцарский Федеральный Институт Водных Наук и Технологий, CH-6047 Кастаниенбаум, Швейцария*

**e-mail: tzema@lin.irk.ru*

Поступила в редакцию

После доработки

Принята к публикации

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Каждая статья должна содержать следующие разделы:

— аннотацию без заголовка и абзацного отступа, печатается в начале статьи и представляется на отдельном листе (не более 250 слов), которая должна полностью отражать результаты работы и ее новизну), а также список ключевых слов (не более 10, которые набираются строчными буквами. Например: *Ключевые слова:* алкалофилы, сульфидогенез, анаэробное разложение целлюлозы...);

— введение (без заголовка), где рассматриваются опубликованные близкие по тематике работы и формулируется цель исследования (отдельным абзацем);

раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, в котором содержатся сведения об объекте исследования (источнике его получения, названии коллекции), и дается описание новых использованных процедур, которое должно быть кратким, но позволяющим их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается

ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала (в кавычках) и страны (скобках).

раздел РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ;
раздел СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (не более 30 источников) с указанием всех авторов и полного заголовка статьи. Необходимо указать также английские версии статей для переводных журналов.

В разделе БЛАГОДАРНОСТИ должны публиковаться: (а) сообщения о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам и рецензентам (в особых случаях); (б) сообщения о предоставлении материалов, данных, компьютерного обеспечения, приборов во временное пользование; (в) информация о проведении исследований в центрах коллективного пользования; (г) помощь в технической подготовке текста; а также всё прочее, что оценивается как полезная помощь, но не является достаточным для того чтобы считаться вкладом в авторство работы. В разделе ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ – Информация о гран-

тах и любой другой финансовой поддержке исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ — в разделе указывается, что настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Раздел **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ** — заявление авторов об отсутствии конфликта интересов.

Далее в статье необходимо располагать Таблицы — каждая на отдельном листе.

Подписи к рисункам (с указанием номеров рисунков и условных обозначений) также даются на отдельной странице.

Общий объем статьи не должен превышать 20 страниц (включая текст, таблицы, список литературы и подписи к рисункам). Объем обзора — не более 30 страниц (включая список литературы).

Рукописи статей, в том числе список литературы и подписи к рисункам, представляются в формате Microsoft Word на странице А4 (29–30 строк на странице, шрифт № 12 Times New Roman). С левой стороны страницы оставляются чистые поля шириной 3–4 см.

Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел. Инициалы разделяются пробелами только при перечислении авторов на первой странице.

Точка не ставится после: заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков, подзаголовков, названий таблиц, размерностей (с — секунда, г — грамм, мин — минута, сут — сутки, град — градус).

Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, подписей к рисункам, краткой аннотации, ключевых слов, сокращений (нед. — неделя, мес. — месяц, г. — год, т. пл. — температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах ($T_{пл}$ — температура плавления).

В качестве символа умножения используется только “×”: 5×10 моль/л. Символ “·” применяется только в скалярных произведениях ($a \cdot b$), в

химических формулах ($CuSO_4 \cdot 7H_2O$). Русские подстрочные индексы не наклоняются. Английские — не наклоняются, если они являются сокращениями от каких-либо слов ($H_{mm} r_{tax}$) и наклоняются во всех остальных случаях (C_p).

Греческие символы не выделяются курсивом, за исключением тех случаев, когда курсивом выделен весь абзац.

Десятичные символы разделяются точкой, а не запятой: 5.25 (правильно), 5,25 (неправильно).

Проценты и промилле, а также градусы не отрываются пробелом от их числового значения: 15%, 25‰, 60°C; все остальные размерности отделяются от цифры пробелом. Дробные размерности: 8 мкг/мл, 10 ммоль/л. Для сложных размерностей

допускается использование как отрицательных степеней ($2 \text{ мкг л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, так и скобок ($562.2 \text{ мкг} / (\text{м}^2 \text{ сут})$) при обязательном соблюдении единообразия написания одинаковых размерностей по статье.

Интервалы (“от–до”) положительных температур: 20–45°C; отрицательных: –4...–18°C.

Каждая таблица и ее графы должны иметь заголовки, краткие, но написанные полностью, без сокращений.

Количество иллюстраций должно быть минимальным; они должны содержать минимум надписей (последние, по возможности, следует заменять цифрами или буквенными обозначениями, поясняемыми в подписи к рисунку; размещать рядом с рисунком легенду не следует). Фотографии печатаются только при абсолютной их необходимости; они должны быть контрастными. На микрофотографиях указывается масштаб изображения, расшифровка которого дается в подрисочной подписи. Условные обозначения на фотографиях делаются только на одном экземпляре. Каждый рисунок или фотография должны содержать подпись, включающую номер рисунка/фото, фамилию первого автора, название журнала, например: Рис. 1. Ст. Иванова И.И. и соавт., “Микробиология”. Статья должна содержать результаты собственных исследований автора, поэтому следует приводить ссылки лишь на важнейшие работы. Помещать названия цитируемых работ в тексте статьи или в сносах нельзя. Перечень литературы приводится в алфавитном порядке фамилий авторов работ. В тексте указывается фамилия (без инициалов) первого автора (или обоих авторов) в круглых скобках, например (Иванов, 2015; Иванов, Петров, 2015; Иванов и соавт. 2015).

В списке литературы должны приводиться следующие данные: для книг — фамилии и инициалы всех авторов (курсивом), полное название книги, город, издательство, год, количество страниц; для журналов — фамилии и инициалы всех авторов (курсивом), название статьи, сокращенное название журнала, год, том, номер, страницы; для статей или глав в сборниках: фамилии и инициалы всех авторов (курсивом), название статьи, полное название сборника, полный список редакторов, город, издательство, год, том (если есть), страницы. Для авторефератов диссертаций: фамилия и инициалы (курсивом), название (авторреферат диссертации на соискание ученой степени кандидата или доктора биологических наук), дата защиты, город, институт, где защищалась, год, количество страниц. Статьи, опубликованные в переводных журналах, цитируются как в русской, так и в английской версиях под одним номером. Примеры оформления списка цитируемой литературы приведены ниже. Статьи в журналах:

1. Мысякина И.С., Фунтикова Н.С., Медведев Ф.А. Состав стеринов артроспор и мицелия гриба *Mucor semalis* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 475–481.

Musyakina I.S., Funtikova N.S., Medvedev F.A. Sterol Composition of the Arthrospores and Mycelium of the Fungus Mucor hiemalis // Microbiology (Moscow). V. 71. № 4. P. 404–410.

2. Lund F., Frisvad J.C. Chemotaxonomy of *Penicillium auranthiogriseum* and related species // Mycol. Res. 1994. V. 98. № 5. P. 481–492.

Статьи в сборниках:

Huber H., Stetter K.O. Genus *I. Sulfolobus* // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. / Eds. Boone D.K., Castenholz R.W. N.Y.: Springer, 2001. V. 1. Part B. P. 198–200.

Книги:

Заварзин Г.А. Бактерии и состав атмосферы. М.: Наука, 1984. 192 с.

Современные методы в биохимии / Под ред. Ореховича В.Н.. М.: Мир, 1977. 392 с.

Диссертации:

Агеева С.М. Фенотипический и генотипический полиморфизм штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 08.12.2003. Москва: Институт микробиологии РАН, 2003. 25 с.

Авторские свидетельства и патенты:

Патент США. 2000. № 5891174.

А.С. № 1892872. Б.И. 1993. № 23. С. 20.

Тезисы:

Стрелкова Е.А., Журина М.В., Кондакова Т.В., Суворова Е.В. Стрессовые факторы и антибиотики как инструмент изучения молекулярных механизмов формирования биопленок. XXIII Межд. Зимняя молодежная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”. Россия. Москва. 2011. Тез. доклад. С. 30.

Ссылка на статью “в печати” должна означать, что данная статья принята к опубликованию в упомянутом журнале. Помещение в список всех работ, цитируемых в тексте статьи, обязательно.

Разрешаются только общепринятые современные сокращения различных мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. (в соответствии с общими правилами для авторов, опубликованными на сайте издательства — <http://pleiades.online/ru/authors/guidlines/prepare-electronic-version/text/>).

Это же относится к единицам измерения, которые должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная), и температуре — по шкале Цельсия, а также к названиям ферментов. Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов должны приводиться в соот-

ветствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используются строчные буквы, набранные курсивом (Italic); если речь идет о доминантных генах дрожжей — все буквы заглавные и курсивные, если же о мутантных генах дрожжей — все буквы строчные и курсивные.

Рукописи, оформленные без соблюдения настоящей инструкции, будут возвращены авторам для исправления до рассмотрения их редакцией. Рукописи, высылаемые для исправления в соответствии с замечаниями рецензентов, подлежат возврату в редакцию не позднее, чем через два месяца, в противном случае редакция устанавливает новую дату поступления статьи в соответствии с датой вторичного поступления рукописи. Получившие отрицательные отзывы и отклоненные редакцией рукописи авторам не возвращаются.

Минимальные требования, обязательные к соблюдению при упоминании и (или) описании микроорганизмов

1. В любых статьях, где приводятся результаты работы с конкретными штаммами микроорганизмов, первый раз в заголовке и разделах текста (аннотация, введение, материалы и методы исследования) следует указывать:

— полное наименование рода на латинском языке;

— видовой эпитет на латинском языке (если видовой эпитет отсутствует, можно пользоваться сокращенным обозначением sp. при полном наименовании рода);

— полное наименование подвида (варианта и т.п.) на латинском языке.

Примеры: *Micrococcus luteus*, *Streptomyces* sp., *Mucor circinelloides* var. *mandshuricus*.

Латинские наименования родов, видов и подвидов, а также наименования таксонов более высокого порядка (семейство, порядок, класс и т.д.) пишутся курсивом.

Во всех случаях необходимо учитывать современный уровень систематики и номенклатуры микроорганизмов.

2. При повторном упоминании наименований микроорганизмов наименование рода можно указывать сокращенно первой (заглавной) буквой или любым количеством букв, обеспечивающим однозначное понимание таксона читателями статьи (недопустимо, например, писать: “Ассоциация *M. luteus* и *M. purpurogena*”, следует писать: “Ассоциация *Micrococcus luteus* и *Micromonospora purpurogena*”). Наименование вида, подвида (варианта) и т.п. всегда указывается полностью (со строчной буквы). При отсутствии видовой эпи-

тета и употреблении сокращенного обозначения *sp.* родовое наименование не сокращается. Примеры: правильно *M. luteus*, *Streptomyces sp.*; неправильно *M. sp.*, *Str. sp.*

3. В методической части работы следует обязательно указывать местонахождение штаммов, откуда они поступили к автору статьи: из какой коллекции (приводится ее акроним, если он есть) или от какого лица, учреждения (приводится акроним, если он есть). В случае отсутствия акронимов дается полное название. При этом воспроизводится точное обозначение штамма (его номер, символ и т.п.), принятое в коллекции, учреждении, откуда штамм получен.

Примеры: *Micrococcus luteus* ATCC 12352, *Streptomyces sp.* ВКМ Ас-273, *Mucor circinelloides* var. *mandshuricus*, штамм А, получен от И.И. Петрова, КБП МГУ.

4. При описании нового таксона необходимо руководствоваться международными правилами номенклатуры микроорганизмов, в частности, находящими отражение в “Международном кодексе номенклатуры бактерий” (бактерии и археи) и “Международном кодексе ботанической номенклатуры” (грибы и водоросли).

При выборе и использовании названий бактерий и архей необходимо учитывать непрерывно пополняемое содержание “Списков одобренных названий бактерий” (<http://lpsn.dsmz.de>), а при выборе видовых названий грибов весьма желательно учитывать пополняемые списки опубликованных видов, доступные, например, в базе данных “Species fungorum” (www.speciesfungorum.org).

При необходимости упоминания в тексте статьи ранее опубликованных названий бактерий и архей, не включенных в списки одобренных, такие названия следует заключать в кавычки.

5. При описании нового рода бактерий и архей необходимо, а при описании других микроорганизмов желательно указывать типовой вид. При описании нового вида бактерий и архей необходимо, а при описании других микроорганизмов желательно указывать типовой штамм. При обозначении последнего указывается его авторская опознавательная ссылка, а также акроним и присвоенный штамму номер в той коллекции, в которую штамм передан для гарантированного сохранения и выдачи по запросам.

6. Описание нового таксона бактерий и архей следует сопроводить тщательно отредактированным диагнозом на английском языке, а при описании нового таксона грибов (дрожжей) – таким же диагнозом на латинском языке.

В случае первоописаний таксонов бактерий и архей на страницах журнала “Микробиология” необходимо указать номера депонирования типового штамма нового микроорганизма в двух международных коллекциях, расположенных в раз-

личных странах. Авторам соответствующих первоописаний следует в дальнейшем самостоятельно позаботиться о валидации предлагаемого названия (включении его в список одобренных). С этой целью в редакцию “Международного журнала систематической и эволюционной микробиологии” (МЖСЭМ) – International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) автором должно быть направлено письмо с приложением pdf файла статьи, содержащей полное оригинальное описание, а также сертификатов депонирования типового штамма, выданных теми коллекциями, из которых он может быть получен по запросам.

Свидетельством валидации является включение предлагаемого названия в очередное дополнение к списку одобренных названий: такие дополнения периодически публикуются на страницах МЖСЭМ.

7. Авторам первоописаний целесообразно внимательно следить за эволюционирующим содержанием “Минимальных стандартов”, рекомендуемых к использованию при описании конкретных групп микроорганизмов. Такие стандарты подготавливаются и периодически обновляются совещаниями экспертов таксономических подкомитетов по конкретным группам микроорганизмов в составе Международной комиссии по систематике прокариот. Содержание стандартов, по мере их готовности, публикуется на страницах МЖСЭМ. “Правила для авторов” указанного журнала являются полезным источником информации при подготовке к публикации всех таксономически ориентированных работ

(<http://ijs.sgmjournals.org/misc/if-ora.shtml>).

8. Первоописания таксонов, в особенности бактерий, архей и вирусов, как правило, сопровождаются информацией о характеристических первичных последовательностях нуклеиновых кислот и/или белков изучаемых объектов – в том числе с целью документации степени их родства с уже известными таксонами. Авторам публикаций в журнале “Микробиология” существенно иметь в виду, что своевременное электронное депонирование и регистрация результатов секвенирования в одной из общедоступных международных баз данных являются обязательными. В то же время они расширяют круг потенциально заинтересованных читателей предлагаемой статьи, в тексте которой необходимо дать ссылку на результат регистрации депонированных последовательностей.

Электронный вариант рукописи
(подробно об оформлении электронных вариантов см. на сайте издательства:

<http://pleiades.online/ru/authors/guidlines/prepare-electronic-version/>

Материалы статьи представляются в электронную редакцию в следующем виде: файл, содержащий

текст статьи и файл(ы), содержащий(е) иллюстрации в форматах jpg (или tif) и doc (или docx).

Технические требования к иллюстрациям приведены на сайте:

<http://pleiades.online/ru/authors/guidlines/prepare-electronic-version/images/>

Графические файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и каков порядок их расположения. Каждый файл должен содержать только один рисунок.

К комплекту файлов должна быть приложена опись (в виде отдельного файла), в которой обязательно должны быть указаны необходимые для издательства сведения: операционная система, название текстового редактора, имена файлов, название журнала, название статьи, фамилии и инициалы авторов.

В случае, если авторы статьи намерены самостоятельно переводить ее на английский язык, им необходимо сделать соответствующую пометку в профиле рукописи при ее загрузке на сайт электронной редакции.

Для более полного описания исследования, к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы и рисунки и пр.). Информация на сайте издательства:

<http://pleiades.online/ru/authors/guidlines/prepare-electronic-version/supplementary-materials/>

По всем возникающим вопросам следует обращаться в редакцию журнала по адресу — redaksiya@inmi.ru.

Редколлегия принадлежит исключительное право приема статьи к публикации или ее отклонения. Решение редколлегии является окончательным.

По решению редколлегии статья может быть возвращена автору(ам) на доработку, направлена на дополнительную рецензию, а также отклонена как по формальным, так и по научным соображениям. Редколлегия не вступает с авторами в полемику. Решение редколлегии сообщается автору(ам) не позднее 30 календарных дней с момента принятия редколлегией соответствующего решения. Возвращение редакцией рукописи статьи на доработку не означает, что статья принята к публикации. Доработанный вариант должен быть направлен в редакцию вместе с первоначальной версией и перечнем исправлений.

Издательство высылает автору по электронной почте корректуру статьи, которая должна быть проверена и возвращена. Исправления в корректуре против оригинала не допускаются. В исключительных случаях они могут быть приняты за счет авторского гонорара.

Автор(ры) несут всю ответственность за научное содержание, достоверность сведений, используемых в статье, а также за сохранение государственной и коммерческой тайны. После выхода журнала в свет автору высылаются в электронном виде тексты опубликованной статьи на русском и английском языках.

Вниманию читателей журнала!

Все права на материалы, опубликованные в журнале, защищены. Любое использование опубликованных материалов, полностью или частично, без разрешения издательства запрещается. Запросы относительно использования указанных материалов должны направляться в издательство Pleiades Publishing и ИКЦ “Академкнига”.