

СОДЕРЖАНИЕ

Том 90, номер 5, 2021

ОБЗОРЫ

- Связь водородного и серного метаболизма у пурпурных серных бактерий
М. Х. Хасимов, Т. В. Лауринавичене, Е. П. Петушкова, А. А. Цыганков 515
- Реакция бактерий на механические воздействия
*С. С. Евстигнеева, Е. М. Телешева, Д. И. Мокеев, И. В. Борисов,
Л. П. Петрова, А. В. Шелудько* 531

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Метагеномный анализ микробного сообщества в районе подземного горения угля в Кемеровской области выявил доминирование термофильных бактерий филумов *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae* и *Firmicutes*
В. В. Кадников, А. В. Марданов, А. В. Белецкий, О. В. Карначук, Н. В. Равин 543
- Термотолерантные метанотрофные бактерии из осадков реки Черная, Крым, и оценка их ростовых характеристик
*И. Ю. Ошкин, О. В. Данилова, Р. З. Сулейманов, Е. Н. Тихонова, Т. В. Малахова,
А. И. Мурашова, Н. В. Пименов, С. Н. Дедыш* 553
- Gemmata palustris* sp. nov., новый планктомицет, выделенный из низинного болота севера России
А. А. Иванова, И. С. Куличевская 564
- Филогенетическое разнообразие и потенциальная активность бактерий и грибов в подземных горизонтах месторождения урана
*Т. Л. Бабич, Е. М. Семенова, Д. Ш. Соколова, Т. П. Турова, С. Х. Биджиева,
Н. Г. Лойко, Г. И. Авдонин, Н. И. Луценко, Т. Н. Назина* 574
- Микробное разнообразие и возможная активность в водоносных горизонтах подземных хранилищ газа
*Т. Н. Назина, Л. А. Абукова, Т. П. Турова, Т. Л. Бабич, С. Х. Биджиева,
Д. С. Филиппова, Е. А. Сафарова* 589
- Разнообразие микробных сообществ, приуроченных к мелководным сипам в пойме реки Большая Речка, Западная Сибирь
О. В. Данилова, А. А. Иванова, И. Е. Терентьева, М. В. Глаголев, А. Ф. Сабреков 601
- Эффективность и механизмы бактерицидного действия на *Escherichia coli* супергидрофильной поверхности магниевого сплава
В. В. Каминский, А. М. Емельяненко, А. В. Алешкин, К. А. Емельяненко, Л. Б. Бойнович 613

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Ингибирующее действие норадrenalина на рост биопленок комменсала кожи человека *Cytococcus schroeteri* H01
*Н. Д. Данилова, О. В. Гераськина, Е. В. Дювенжи, А. В. Феофанов,
В. К. Плакунов, А. В. Ганнесен* 618

ХРОНИКА

- Памяти профессора Дмитрия Григорьевича Звягинцева (09.03.1932–08.05.2021) 623

Contents

Vol. 90, No. 5, 2021

Reviews

Relations between Hydrogen and Sulfur Metabolism in Purple Sulfur Bacteria

M. K. Khasimov, T. V. Laurinavichene, E. P. Petushkova, and A. A. Tsygankov 515

Response of Bacteria to Mechanical Stimuli

*S. S. Evstigneeva, E. M. Telesheva, D. I. Mokeev, I. V. Borisov,
L. P. Petrova, and A. V. Shelud'ko* 531

Experimental Articles

Metagenomic Analysis of the Microbial Community in the Underground Coal Fire Area (Kemerovo Region, Russia) Revealed Predominance of Thermophilic Members of the Phyla *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae*, and *Firmicutes*

V. V. Kadnikov, A. V. Mardanov, A. V. Beletsky, O. V. Karnachuk, and N. V. Ravin 543

Thermotolerant Methanotrophic Bacteria from Sediments of the River Chernaya, Crimea, and Assessment of Their Growth Characteristics

*I. Yu. Oshkin, O. V. Danilova, R. Z. Suleimanov, E. N. Tikhonova, T. V. Malakhova,
I. A. Murashova, N. V. Pimenov, and S. N. Dedysh* 553

Gemmata palustris sp. nov., a Novel Planctomycete from a Fen in Northwestern Russia

A. A. Ivanova, I. S. Kulichevskaya 564

Phylogenetic Diversity and Potential Activity of Bacteria and Fungi in the Deep Subsurface Horizon of an Uranium Deposit

*T. L. Babich, E. M. Semenova, D. Sh. Sokolova, T. P. Tourova, S. Kh. Bidzhieva,
N. G. Loiko, G. I. Avdonin, N. I. Lutsenko, and T. N. Nazina* 574

Diversity and Possible Activity of Microorganisms in Underground Gas Storage Aquifers

*T. N. Nazina, L. A. Abukova, T. P. Tourova, T. L. Babich, S. Kh. Bidzhieva,
D. S. Filippova, and E. A. Safarova* 589

Microbial Community Composition of Floodplains Shallow-Water Seeps in the Bolshaya Rechka Floodplain, Western Siberia

O. V. Danilova, A. A. Ivanova, I. E. Terent'eva, M. V. Glagolev, and A. F. Sabrekov 601

Efficiency and Mechanisms of Bactericidal Effect of Superhydrophilic Magnesium Alloy Surface against *Escherichia coli*

*V. V. Kaminsky, A. M. Emelyanenko, A. V. Aleshkin,
K. A. Emelyanenko, and L. B. Boinovich* 613

Short Communications

Inhibitory Effect of Norepinephrine on Biofilm Growth of the Human Skin Commensal *Kytococcus schroeteri* H01

*N. D. Danilova, O. V. Geraskina, E. V. Diuvenji, A. V. Feofanov,
V. K. Plakunov, and A. V. Gannesen* 618

In Memoriam Professor D. G. Zvyagintsev (09.03.1932–08.05.2021) 623

СВЯЗЬ ВОДОРОДНОГО И СЕРНОГО МЕТАБОЛИЗМА У ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2021 г. М. Х. Хасимов^а, Т. В. Лауринавичене^а, Е. П. Петушкова^а, А. А. Цыганков^а, *

^аИнститут фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, 142290 Россия

*e-mail: ttt-00@mail.ru

Поступила в редакцию 09.03.2021 г.

После доработки 03.04.2021 г.

Принята к публикации 05.04.2021 г.

В обзоре рассматривается роль пурпурных серных бактерий в глобальном цикле водорода и серы, экология и физиология этих бактерий в связи с метаболизмом серы и водорода. Представлены сведения о пяти типах гидрогеназ, участвующих в поглощении или выделении водорода, а также о разнообразных ферментах, участвующих в окислении/восстановлении серных соединений. Успехи в биохимии и генетике ферментов из этих микроорганизмов позволяют проанализировать взаимосвязь процессов на новом уровне.

Ключевые слова: молекулярный водород, гидрогеназы, метаболизм серы, *Thiocapsa*, *Allochromatium*, пурпурные серные бактерии

DOI: 10.31857/S0026365621050104

Пурпурные серные бактерии являются аноксигенными фототрофными организмами, которые способны использовать серные соединения и водород как в светозависимых, так и темновых процессах. Это существенно для выживания в природных экосистемах, а также при их использовании в биотехнологических процессах. В представленном обзоре рассматривается взаимосвязь водородного и серного метаболизма у пурпурных серных бактерий с акцентом на роль гидрогеназ. Следует отдать должное классическим работам И.Н. Гогова, В.М. Горленко, Р.Н. Ивановского, Е.Н. Кондратьевой, Н. Пфеннига, Г. Трюпера и Г. ван Гемердена и соавторов, которые изучали экологию и физиологию пурпурных бактерий и, в частности, выделение/поглощение водорода и использование серных соединений. Успехи в биохимии и генетике ферментов, участвующих в этих процессах, позволяют проанализировать их взаимосвязь на новом уровне. Ферменты водородного и серного метаболизма изучались и в другой группе фототрофных бактерий — зеленых серных бактериях. Однако к настоящему моменту экспериментальных свидетельств взаимосвязи метаболизма водорода и серы у этой группы бактерий, исключая очевидную конкуренцию за восстановление пула убихинонов, не представлено.

КРУГОВОРОТ БИОВОДОРОДА И СЕРЫ

В природе многие микробиологические процессы протекают с выделением или поглощением водорода. С участием микроорганизмов, выделяющих или поглощающих H₂, формируется глобальный цикл водорода, связанный с геохимическими циклами других элементов, таких как углерод, сера и азот (Кондратьева, Гогов, 1981; Vignais, Billoud, 2007; Greening et al., 2015; Teng et al., 2019). В круговороте последних элементов, в частности, серы, так или иначе участвуют все микроорганизмы. Способностью к выделению и поглощению H₂ обладает достаточно большое, но ограниченное число микроорганизмов: примерно одна треть секвенированных геномов (Peters et al., 2015; Greening et al., 2016; Greening, Boyd, 2020). Эти микроорганизмы таксономически и физиологически не связаны между собой, и их представители обнаруживаются в разных местообитаниях. Ключевая роль водорода во взаимодействии разных видов общепризнана в таких экосистемах, как гидротермальные источники, анаэробные отложения и пищеварительный тракт животных, но, видимо, не ограничивается этим (Vignais, Billoud, 2007; Schwartz et al., 2013). Некоторые микроорганизмы образуют тесно связанные ассоциации на основе межвидового переноса водорода.

Поглощение молекулярного водорода и использование его как источника энергии описано у аэробных микроорганизмов, сульфатредукто-

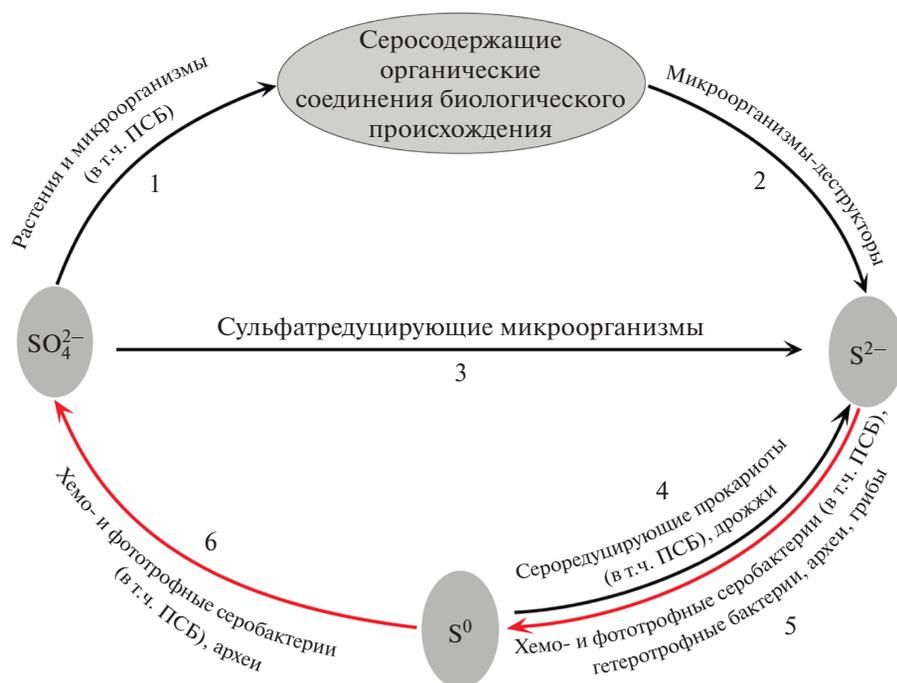


Рис. 1. Круговорот серы в природе (по Грабович, 1999). 1 – ассимиляция сульфатов; 2 – минерализация органических серосодержащих соединений; 3 – сульфатредукция; 4 – сероредукция; 5 – окисление сульфида; 6 – окисление серы.

ров, ацетогенов и метаногенов, а также в процессах восстановления железа или галореспирации и в фумаратном дыхании. Кроме того, он является донором электронов для анаэробных фототрофов. Наряду с этим существуют вспомогательные процессы, в которых H_2 -поглощающая активность связана с H_2 -выделяющей активностью в той же самой клетке, т.е. наблюдается рециклизация водорода (Schwartz et al., 2013).

Образование молекулярного водорода как конечного продукта имеет место у микроорганизмов, осуществляющих брожение или анаэробное окисление CO . Кроме того, H_2 является побочным продуктом при азотфиксации и окислении фосфита (Schwartz et al., 2013). С точки зрения биотехнологий важна как способность микроорганизмов к выделению H_2 (биотоплива), так и способность к поглощению H_2 в процессах ремедиации, т.е. деградации токсических биополлютантов, таких как ароматические и алифатические галоген-содержащие вещества (Teng et al., 2019).

Сера относится к элементам с переменной валентностью (от -2 до $+6$), что обеспечивает ее химическую и биологическую подвижность. В виде неорганических соединений сера бывает в окисленной форме (сульфаты, полисульфаты и др.), в восстановленной форме (сульфиды) и в молекулярной. Цикл серы включает в себя окислительную и восстановительную ветви, а также превращения серы

без изменения ее валентности (Кондратьева, 1996; Грабович, 1999). Восстановительная часть цикла серы включает обратный переход от SO_4^{2-} к S^{2-} и осуществляется преимущественно биологическим путем (рис. 1). Ассимиляция сульфата для биосинтетических целей осуществляется многими микроорганизмами (рис. 1, путь 1). При последующей минерализации органических серосодержащих соединений образуется сульфид (рис. 1, путь 2). Прямое образование сульфида из сульфата связывается в основном с деятельностью сульфатредуцирующих бактерий и архей в процессе диссимиляционной сульфатредукции (анаэробного дыхания) (рис. 1, путь 3). Сероводород может образовываться также при восстановлении элементарной серы с использованием двух механизмов (рис. 1, путь 4). Во-первых, путем диссимиляционной сероредукции (серного дыхания) с участием мезофильных и термофильных прокариот, что сопровождается синтезом АТФ. Во-вторых, за счет т.н. облегченного брожения, т.е. футильного сброса электронов без синтеза АТФ с участием прокариот и дрожжей (Грабович, 1999).

Окислительная часть круговорота серы (рис. 1, пути 5, 6) включает переход от S^{2-} к SO_4^{2-} , который в зависимости от условий может протекать без участия или с участием микроорганизмов, таких как хемо- и фототрофные серобактерии, археи и

гетеротрофные микроорганизмы (Кондратьева, 1996; Грабович, 1999). Процесс может идти не до конца, с накоплением промежуточных продуктов, таких как элементарная сера, полиотионаты, сульфит (Грабович, 1999).

Таким образом, пурпурные серные бактерии участвуют как минимум в 4 из 6 ветвей круговорота серы, что подчеркивает их значимость.

ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ ПСБ

Пурпурные серные бактерии (ПСБ) относятся к порядку *Chromatiales* (класс гаммапротеобактерий), два из четырех семейств которого являются фототрофными: *Chromatiaceae* и *Ectothiorhodospiraceae*, фенотипически различающиеся по локализации элементарной серы – внутриклеточной или внеклеточной соответственно. Члены *Chromatiaceae* принадлежат к трем филогенетическим группам: а) морские и галофильные виды, относящиеся к *Halochromatium*, *Isochromatium* и *Marichromatium*; б) пресноводные виды, относящиеся к *Chromatium* и *Thiocystis*; в) морские/пресноводные виды *Thiocapsa* и *Amoebobacter* (Ghosh, Dam, 2009). В обзоре будет сделан акцент на два наиболее изученных вида – *Allochromatium vinosum* (ранее *Chromatium vinosum*) и *Thiocapsa roseopersicina* BBS. В 2009 г. таксономический статус последнего штамма был пересмотрен и выделен в самостоятельный вид *Thiocapsa bogorovii* sp. nov. (Турова и соавт., 2009). К сожалению, до сих пор авторы, работающие с этой бактерией, придерживаются прежней номенклатуры. Поэтому в обзоре даны преимущественно названия, использованные авторами конкретных исследований. Двойные названия использованы в тех случаях, где нужно подчеркнуть различия между штаммами *Thiocapsa*, которые могут оказаться межвидовыми.

ПСБ являются фототрофными бактериями, осуществляющими бактериальный тип фотосинтеза, т.е. в отличие от высших растений и водорослей они не используют воду в качестве восстановителя и не образуют O_2 . Вместо воды для этих бактерий характерно использование сульфида или других восстановленных серных соединений. Основные сведения по физиологии ПСБ суммированы в монографии Е.Н. Кондратьевой и нескольких обзорах (Кондратьева, 1996; Madigan, 2003; Madigan, Jung, 2009; Imhoff, 2014). Большинство ПСБ могут расти в автотрофных условиях, их способность использовать другие источники углерода весьма ограничена. Среди ПСБ есть виды, которые могут расти в темноте в аэробных или микроаэробных условиях, причем ряд микроорганизмов используют органические вещества в качестве окисляемых субстратов и источников углерода. Другие ПСБ в темноте при наличии O_2 окисляют сульфид, тиосульфат и водород. Что ка-

сается роста в анаэробных темновых условиях, существуют неоднозначные мнения, поскольку строго анаэробные условия соблюдаются не всегда.

К настоящему времени накоплено много данных, касающихся геохимической деятельности и распространения ПСБ (Кондратьева, 1996; Van Gemerden, Mas, 1995; Overmann, 1997; Imhoff, 2005, 2014; Madigan, Jung, 2009). В небольших количествах аноксигенные фототрофные бактерии присутствуют практически во всех водоемах, а также в затопляемых почвах и зонах морских приливов. Места массового обитания фототрофных бактерий обычно делят на три типа: термальные источники, мелководные (соленые и пресные) водоемы, стратифицированные водоемы (Горленко и соавт., 1977; Нетрусов и соавт., 2013). В водоемах физико-химические условия закономерно изменяются с увеличением глубины: снижается температура, освещенность, редокс потенциал и pO_2 , но может увеличиваться соленость. Также в придонных слоях максимальна концентрация сероводорода за счет деятельности сульфатредуцирующих бактерий. ПСБ живут в водоемах на границе аэробно-анаэробных зон, где сохраняется достаточная освещенность для поддержания фотосинтеза в дневное время и мало кислорода. Глубина, на которой обнаруживается этот слой (обычно несколько метров, иногда десятки метров), варьирует в зависимости от характеристик водоема (Van Gemerden, Mas, 1995). Местообитания ПСБ, как правило, напрямую связаны с наличием серных соединений и жизнедеятельностью сульфатредуцирующих бактерий. Поскольку ПСБ используют восстановленные соединения серы в качестве доноров электрона для фотосинтеза, они могут образовывать ассоциации с серо- или сульфатредуцирующими бактериями, в которых партнеры зависят друг от друга. Сульфатредуцирующие бактерии образуют сульфид, необходимый ПСБ, а от продуктов окисления сульфида (сульфат, сера) в свою очередь зависит деятельность сульфатредуцирующих бактерий (Overmann, van Gemerden, 2000; Peduzzi et al., 2003; Bhatnagar et al., 2020). В таком замкнутом цикле один и тот же атом серы используется многократно (Overmann, van Gemerden, 2000). При высоких концентрациях серы сульфатредуцирующие бактерии также зависят от органических соединений, образуемых ПСБ.

Кроме того, ПСБ обнаруживаются на дне, в пограничном слое осадков, который обычно составляет лишь несколько миллиметров и находится под слоем окисленных фототрофов. В таких условиях обычно формируются циано-бактериальные маты. *Thiocapsa* и *Allochromatium* – постоянные обитатели морских микробных матов, где они образуют окрашенный слой ниже расположения цианобактерий (van Gemerden, Mas, 1995). Такие микробные маты характеризуются высокими плотностями популяций микроорганизмов,

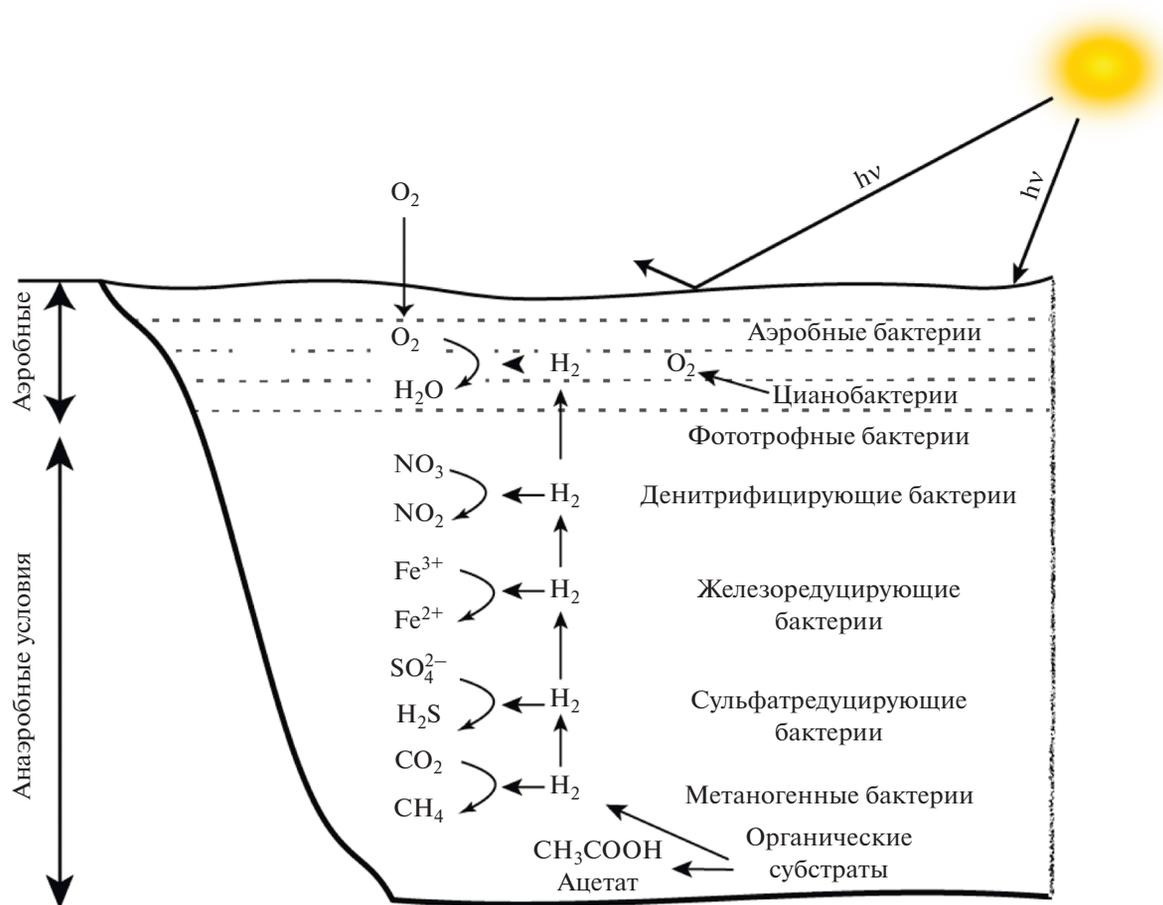


Рис. 2. Анаэробный и аэробный бактериальный метаболизм в водных стратифицированных системах. Схема иллюстрирует вертикальное распределение различных окислительно-восстановительных реакций, катализируемых H_2 -образующими и H_2 -потребляющими сообществами. Вертикальная стрелка указывает на уменьшение содержания H_2 от дна к поверхности (по Vignais, Billoud, 2007).

между которыми, несмотря на конкуренцию, устанавливаются и взаимовыгодные отношения, основанные, как правило, на совместном использовании серных соединений. Взаимодействие микроорганизмов изучается и в лабораторных смешанных культурах, например, между разными видами *Chromatium* (van Gemerden, Mas, 1995), между ПСБ и зелеными серобактериями (Pringault et al., 1999; Masse et al., 2002), между ПСБ и бесцветными серобактериями (Visscher et al., 1992; van der Ende et al., 1996; Overmann, van Gemerden, 2000).

Если связь местообитания ПСБ с наличием (и использованием) восстановленных серных соединений очевидна и коррелирует с возможностью выращивания ПСБ в таких условиях, то в отношении молекулярного водорода нет определенных выводов. В водоемах водород образуется преимущественно за счет ферментации органических соединений в придонных слоях и диффундирует к поверхности, таким образом создавая градиент H_2 (рис. 2). Согласно этой схеме ПСБ

находятся на границе аэробно/анаэробной зоны, однако концентрация H_2 в этой зоне неизвестна. Скорее всего, водород здесь не накапливается, а используется сразу же по мере образования.

Можно обратиться к исследованиям, касающимся градиента концентрации растворенного водорода в зависимости от глубины придонного слоя и типа акцептора, используемого при анаэробном дыхании за счет окисления водорода. Они распределяются в направлении от дна к поверхности следующим образом: 7–10 нМ H_2 , метаногенез или CO_2 редукция; 1–1.5 нМ H_2 , сульфатредукция; 0.2 нМ H_2 , Fe(III) редукция; менее 0.05 нМ H_2 , Mn(IV) или нитрат редукция (Lovely, Goodwin, 1988). Такое распределение определяется конкуренцией за продукты ферментации между процессами с разными акцепторами электрона, причем доминирующий процесс контролирует концентрацию H_2 , ингибируя использование следующего термодинамически выгодного акцептора, пока концентрация доминирующего

окислителя не снизится до лимитирующего уровня (Vandieken et al., 2014). Таким образом, можно предположить, что ПСБ обитают при концентрации <0.05 нМ. Однако можно исходить и из того, что ПСБ зависят от продуктов метаболизма сульфатредуцирующих бактерий (сульфида) и, следовательно, должны быть локализованы вблизи них, т.е. при концентрации около 0.2 нМ H_2 . Тем не менее прямые указания на характерные для ПСБ концентрации H_2 отсутствуют.

Как же ПСБ могут использовать H_2 при условии его доступности? Известно, что на свету ПСБ могут ассимилировать CO_2 и расти на минеральных средах в присутствии не только серных соединений, но и H_2 (Кондратьева, Гоготов, 1981). В темноте многие виды ПСБ могут расти в аэробных условиях за счет дыхания, используя серные соединения. При этом чувствительность к кислороду неодинакова у разных видов, а *T. roseopersicina* BBS (*T. bogorovii*) может расти даже при атмосферном pO_2 в отличие от других штаммов *T. roseopersicina*, например, 6311, который растет при pO_2 1% (Кондратьева, 1996; Overmann, Pfennig, 1992). Вероятно, в таких условиях ПСБ могли бы использовать и H_2 , во всяком случае суспензии клеток ПСБ могут поглощать H_2 в присутствии O_2 (Кондратьева, Гоготов, 1981). Что касается роста в темновых анаэробных условиях, он, по-видимому, невозможен (Кондратьева, 1996). Исследования темнового метаболизма показали, что суспензии бактерии *T. roseopersicina* BBS в анаэробных условиях в темноте способны использовать запасные полисахариды или глюкозу и восстанавливать S^0 до H_2S (Красильникова, 1976). Для этих же целей может использоваться и молекулярный водород (Красильникова, 1976; Laurinavichene et al., 2007).

Очевидно, что основным типом метаболизма ПСБ является фототрофия, при которой эксплуатируется главное преимущество ПСБ – возможность использовать энергию света. Однако в природе освещенность непостоянна в течение суток. Поэтому метаболизм фототрофных бактерий должен быть адаптирован не только к использованию солнечной энергии, но также химической энергии (хемосинтез), и если не для роста, то, во всяком случае, для поддержания жизнедеятельности при отсутствии света. Известно, что даже при минимальном содержании кислорода в темноте *Chromatium okenii* способна фиксировать CO_2 , окисляя сульфид, но в анаэробных условиях этого не наблюдали (Berg et al., 2019).

Суточные колебания в содержании запасных продуктов ПСБ обнаружены в природных популяциях. Ранее было показано, что содержание гликогена и серы ночью снижается, а днем возрастает (Del Don et al., 1994; Mas, van Gemerden, 1995). Однако в недавних работах обнаружено,

что колебания в содержании гликогена в течение суток (день/ночь) незначительны, также не отмечен синтез полигидроксипутирата (Berg et al., 2019). Авторы считают, что использование кислорода может иметь место даже в местообитаниях, считающихся анаэробными, поскольку O_2 может потребляться так быстро, что его концентрация постоянно ниже пределов обнаружения (Berg et al., 2019).

В лабораторных экспериментах природные условия были имитированы при изучении хемостатных культур *T. roseopersicina* M1 в циклическом режиме (день, аэробно/ночь, анаэробно). При этом гликоген синтезировался на свету и расходовался в темноте, причем в темноте наблюдали синтез Бхл (de Wit, van Gemerden, 1990; Mas, van Gemerden, 1995). В недавних экспериментах с *Thiodictyon syntrophicum* Cad16 при моделировании природных условий также наблюдали темновое окисление глюкозы с образованием сероводорода за счет использования серных глобул (Luedin et al., 2018). Интересно, что в микроаэробных природных условиях у этого штамма изменения при чередовании день/ночь, как выяснилось, затрагивают лишь 1% белков в протеоме, причем днем отмечена положительная регуляция аэробного дыхания, а ночью – стресс-реактивных механизмов (Luedin et al., 2019).

Предполагалось, что темновое восстановление серы не представляет собой неспецифическую побочную реакцию, но является необходимым процессом диссимиляторного метаболизма и служит для поддержания жизнедеятельности в темноте (Pfennig, Biebl, 1981). В то же время эти процессы не могут обеспечить конкурентоспособный рост ПСБ в отсутствие света (Madigan, Jung, 2009). Следует отметить, что в работах, описывающих образование сульфида в темноте, делается акцент на разложение гликогена, а про возможность использования H_2 для этих целей есть лишь единичные упоминания. Можно предположить, что по исчерпанию гликогена ПСБ могут использовать для той же цели экзогенные органические вещества или водород. При этом они будут испытывать конкуренцию с другими микроорганизмами за донор электрона, но, вероятно, иметь преимущество в виде эндогенных запасов акцептора электрона (серы).

Таким образом, можно с определенностью говорить о связи физиологии и экологии ПСБ с метаболизмом серных соединений. Однако в отношении метаболизма водорода такой определенности нет, хотя возможность выделять и поглощать водород существует и подкреплена наличием нескольких ферментов, участвующих в этих процессах (см. далее).

МЕТАБОЛИЗМ ВОДОРОДА И ГИДРОГЕНАЗЫ ПСБ

Фототрофные пурпурные бактерии способны к росту в разнообразных условиях: на свету автотрофно, миксотрофно или гетеротрофно, в темноте гетеротрофно или автотрофно. В некоторых условиях рост может происходить с выделением или использованием водорода, т.е. H_2 может являться акцептором электронов, донором электронов и источником энергии (Цыганков, Хуснутдинова, 2014). В качестве побочной реакции выделение водорода на свету катализируют нитрогеназы (НГ), однако для их депрессии необходимы специальные условия, как правило, азотное лимитирование или использование молекулярного азота.

Основные ферменты, катализирующие окисление и выделение H_2 — это металлоферменты гидрогеназы (ГД). Гены, кодирующие ГД, идентифицированы в 51 типах бактерий и архей. Гидрогеназные гены присутствуют в разных пропорциях в почвенных, водных и ассоциированных с хозяином метагеномах, что свидетельствует об их широком распространении. Предполагается, что содержание кислорода является главным фактором, влияющим на распределение этих генов в разных экосистемах (Greening et al., 2016). За счет значительной диверсификации ГД стало возможным использование реакций выделения/поглощения H_2 для поддержания роста и выживания микроорганизмов в широком диапазоне условий.

Гидрогеназы подразделяют на 8 основных групп, включающих [NiFe]-гидрогеназы, [FeFe]-гидрогеназы, а также [Fe]-гидрогеназы (Vignais, Billoud, 2007; Calusinska et al., 2010). В обзоре Цыганкова и Хуснутдиновой рассматривается 9 групп ГД (Цыганков, Хуснутдинова, 2014). Высказана точка зрения, что эта классификация недостаточна отражает разнообразие функций экспериментально изученных ГД (Greening et al., 2016). Поэтому были предложены уточнения классификации с учетом филогении аминокислотных последовательностей, металл-связывающих мотивов, прогнозируемой организации генов и биохимических характеристик (Greening et al., 2016). Согласно уточненной классификации выделяют четыре группы (22 подгруппы) [NiFe]-гидрогеназ, три группы (6 подгрупп) [FeFe]-гидрогеназ и небольшую группу [Fe]-гидрогеназ. У пурпурных бактерий обнаружены [NiFe]-гидрогеназы, относящиеся к группам 1, 2b, 3b, 3d и 4 (Цыганков, Хуснутдинова, 2014), по классификации, предложенной ранее (Vignais, Billoud, 2007). К настоящему времени в связи с появлением вновь описанных геномов и по современной классификации (Greening et al., 2016) у пурпурных бактерий обнаружены ГД группы 1 (1c, 1e, 1d), подгруппы 2b, подгруппы 3b и 3d, группы 4 (под-

группы 4a, 4b, 4c, 4d, 4e), а также [FeFe]-гидрогеназы группы А. ПСБ способны синтезировать ГД группы 1 (1c, 1e, 1d), подгруппы 2b, подгрупп 3b и 3d, а также подгруппы 4e (Greening et al., 2016). Кроме того, ген, кодирующий [Fe-Fe]-гидрогеназу группы А, обнаружен у *Thiorhodococcus drewsii*, однако данных о его экспрессии нет.

Гидрогеназы группы 1

Подгруппа 1c объединяет ГД, участвующие в фумаратном дыхании, причем с возможностью обратной реакции. Гены таких гидрогеназ обнаружены у *Lamprocystis purpurea*, *Thyocystis violascens* и *Thiorhodovibrio* sp. 970 (Greening et al., 2016). Эти гидрогеназы не выделены, и их роль в фумаратном дыхании указанных бактерий не описана.

Подгруппа 1d включает мембранно-связанные водородпоглощающие гидрогеназы, донирующие электроны в пул убихинонов через цитохром. Наиболее хорошо биохимически и молекулярно-биологически изучена гидрогеназа HupSL из пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* (Serebryakova et al., 1984). Гены ГД такого типа обнаружены у *T. roseopersicina* BBS (*T. bogorovii*), *T. roseopersicina* 6311, *T. marina*, *Thioflavococcus mobilis*, *Thyocystis violascens*, *Thiorhodococcus drewsii*, *L. purpurea* и *Thiorhodovibrio* sp. 970 (Greening et al., 2016). Туда же относятся гидрогеназы *Ralstonia eutropha* (Fritsch et al., 2011), *Escherichia coli* (Volbeda et al., 2013), *Aquifex aeolicus* (Brugna-Guiral et al., 2003). Синтез этих гидрогеназ, как правило, регулируется в зависимости от концентрации H_2 посредством сенсорных гидрогеназ. Однако у *T. roseopersicina* BBS сенсорная ГД не функционирует, и синтез гидрогеназы HupSL регулируется тиосульфатом (Nagy et al., 2016). Этот тип ГД напрямую участвует в донировании электронов при фотоавтотрофном росте с использованием водорода. Кроме того, у пурпурных несерных бактерий именно этот тип гидрогеназ поддерживает хемолитоавтотрофный рост бактерий при низкой концентрации кислорода. Их функцию также связывают с участием в поглощении (рециклизации) водорода, выделяемого нитрогеназой на свету, поэтому с целью увеличения выхода водорода создаются мутанты, лишенные этой ГД. В ряде случаев авторам удалось продемонстрировать преимущество таких мутантов при получении водорода. Однако показано, что это преимущество проявлялось лишь при росте в микроаэробных условиях и использовании органических доноров электронов с низкой степенью восстановленности (условным зарядом) углерода, например, малата и сукцината (Laurinavichene et al., 2017).

Подгруппа 1e в новой классификации объединяет ГД *isp* типа. Это гидрогеназы, у которых между генами, кодирующими малую и большую субъединицу, расположены гены *isp1* и *isp2*. Наи-

более хорошо изучены ферменты этого типа у *T. roseopersicina* BBS (Gogotov et al., 1978) и *A. vinosum* (van Heerikhuizen et al., 1981). Это мембранно-ассоциированные ГД, активный центр которых расположен в периплазме, а закрепление на мембране, по-видимому, происходит за счет трансмембранного белка Isp1 (Tengolics et al., 2014). Согласно классификатору ГД, функции гидрогеназ Isp фундаментально связаны с серным метаболизмом и заключаются в серном дыхании с использованием водорода как донора электронов и серы в качестве терминального акцептора (Søndergaard et al., 2016).

Сенсорные гидрогеназы (группа 2b)

Это цитоплазматические ферменты, функция которых заключается в регуляции синтеза других ГД в ответ на появление H_2 . При этом регуляция осуществляется с использованием каскадного гистидин-киназного механизма (Greening et al., 2016). Такие ГД обнаружены и у несерных, и у серных пурпурных бактерий (Цыганков, Хуснутдинова, 2014). Несмотря на то, что у пурпурной серной бактерии *T. roseopersicina* BBS обнаружены гены такой гидрогеназы (Kovacs et al., 2002), участие ее в регуляции синтеза других ГД не доказано (Kovacs et al., 2005b). Аналогичная ГД обнаружена у *R. eutropha* (Lenz, Friedrich, 1998). ГД такого типа свойственна низкая активность в сочетании со стабильностью в присутствии кислорода, что может быть обусловлено особенностями газового канала (Fritsch et al., 2013). Среди ПСБ гены таких ГД встречаются у других штаммов *T. roseopersicina*, *T. marina*, *L. purpurea*, *Thiorhodococcus drewsii* (Greening et al., 2016).

Обратимые гидрогеназы, взаимодействующие с НАДФ или НАД (группа 3b и 3d)

ГД группы 3 – это ферменты, имеющие диафоразную часть. Предполагается, что их роль состоит в поддержании редокс статуса клетки (Appel, Schulz, 1998). В условиях избытка внутриклеточного восстановителя (НАДФН или НАДН) ГД групп 3b и 3d выделяют водород. При недостатке восстановителя и наличии водорода эти ГД восстанавливают НАД (3b) или НАДФ (3d). При этом у *T. roseopersicina* BBS процесс поглощения водорода может быть светозависим (Rakhely et al., 2007).

ГД типа 3b (НАДФ-зависимые) обнаружены у *A. vinosum* и *Thiorhodospira sibirica* (Greening et al., 2016). Для экстремальных термофильных архей *Pyrococcus furiosus* отмечено, что H₂h-1 ГД 3b типа способна к восстановлению серы в присутствии H_2 (Ma et al., 1993). Однако ГД 3b типа у пурпурных серных бактерий биохимически не охаракте-

ризованы, и их роль в метаболизме еще предстоит выяснить.

ГД типа 3d (НАД-зависимые) обнаружены, наряду с *A. vinosum*, у *T. roseopersicina* BBS (Kovacs et al., 2005a), *T. roseopersicina* 6311, *T. marina*, *Thiorhodovibrio* sp. 970, *Thioflavicoccus mobilis*, *L. purpurea*, *Thiocystis violascens*, *Thiorhodococcus drewsii*, *Thiohalocapsa* sp. PB-PSB1 (Greening et al., 2016). Следует отметить, что гидрогеназный модуль (HoxYH) этой ГД выделен в чистом виде (Long et al., 2007), и показано, что она содержит лишь один FeS кластер в малой субъединице. Авторам не удалось получить полный комплекс, обладающий диафоразной частью.

Мембрансвязанные гидрогеназы, выделяющие водород (группа 4e)

Группа 4e объединяет так называемые Ech ГД. Это ферменты, выделяющие водород, взаимодействуя с восстановленным ферредоксином. Наиболее хорошо изучена роль Ech ГД у метаногенной археобактерии *Methanosarcina barkeri* Fusaro (Meuer, Kuettner, 2002). У этой бактерии показано, что в зависимости от субстратов эта мембранно-связанная ГД участвует или в поглощении водорода, или в его выделении. Гены этой ГД обнаружены у таких ПСБ, как *Thioflavicoccus mobilis*, *Thiocystis violascens* и *A. vinosum*. Однако роль этого фермента в метаболизме ПСБ неясна, сам фермент не выделен и не охарактеризован.

Таким образом, метаболизм водорода у ПСБ наиболее подробно изучен у *T. roseopersicina* BBS и *A. vinosum*. У *T. roseopersicina* BBS к настоящему времени обнаружено 4 экспрессируемых гидрогеназы: HupSL, Hox1, Hox 2 и HydSL (Rakhely et al., 2004; Palagy-Meszaros et al., 2009; Maroti et al., 2010). Структурные гены *hydSL* у *T. roseopersicina* не кластеризованы с аксессуарными генами (Kovacs et al., 2002), что не свойственно для генов ГД, но показано, что в ее сборке участвуют гены группы *hup*, а также специфичная эндопептидаза *hynD* (Maroti et al., 2003). Гены большой и малой субъединиц разведены генами *isp1/isp2*, предположительно связанными с серным метаболизмом. В последнее время ГД такого типа называют также *isp*-гидрогеназами (Greening et al., 2016), они обнаружены в геномах ряда микроорганизмов (Søndergaard et al., 2016).

У *A. vinosum* в геноме обнаружено 5 гидрогеназ: мембранно-связанные HydSL, HupSLC и, предположительно, ферредоксин-зависимая ГД; цитоплазматическая НАД-зависимая HoxEFUYH; возможно, мембранно-ассоциированная НАДФ-зависимая гидрогеназа, близкая к ГД, участвующим в восстановлении серы. Три последних ГД не изучены и их роль в метаболизме ПСБ неизвестна.

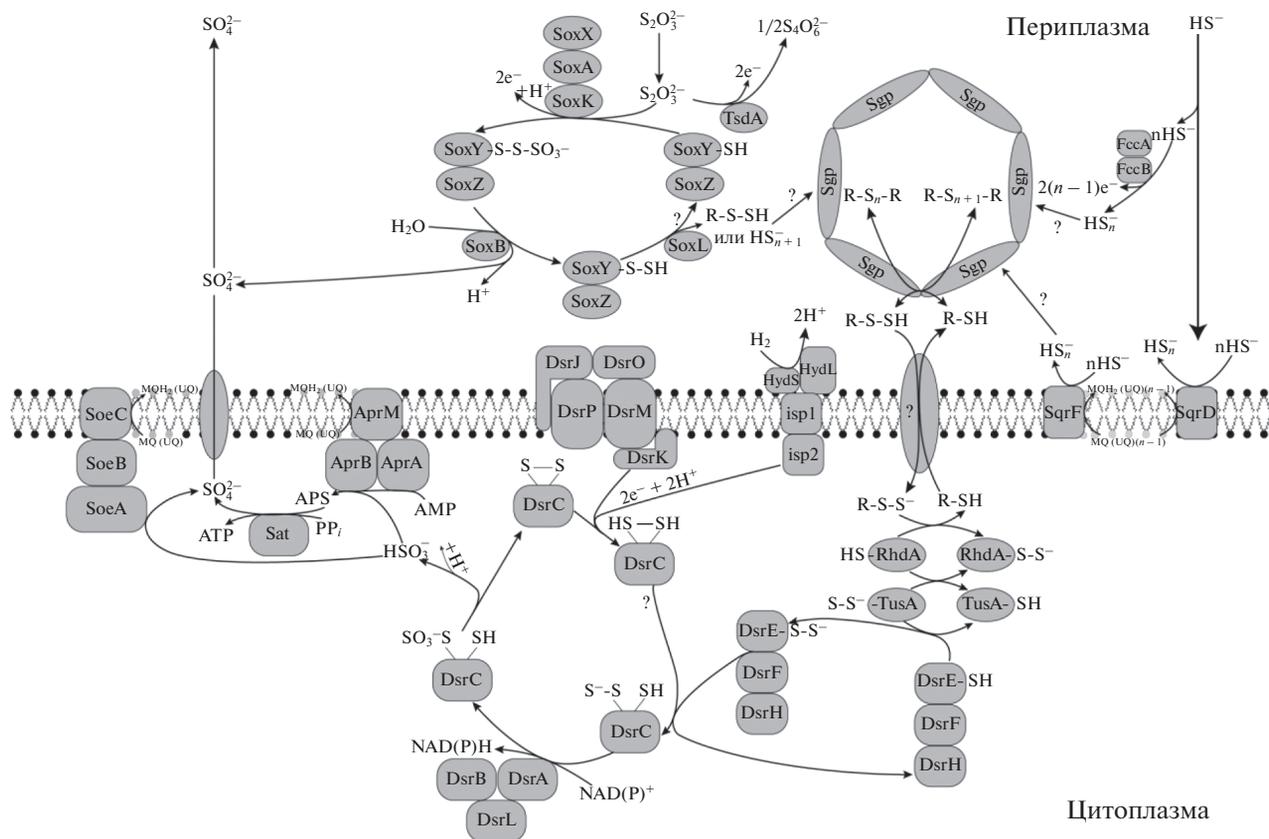


Рис. 3. Модель путей окисления серных соединений у *A. vinosum* и связь серного метаболизма с HydSL гидрогеназой (по Dahl, 2017).

Такое разнообразие ГД способно обеспечить процессы, связанные с выделением или поглощением водорода, как в аэробных, так и анаэробных условиях, в т.ч. связанные с окислением/восстановлением серы. Это аноксигенный фотосинтез, дыхание, брожение, фиксация CO_2 , сенсорные механизмы.

МЕТАБОЛИЗМ СЕРЫ У ПСБ

Для конструктивного метаболизма в качестве источника серы большинство ПНСБ и отдельные представители ПСБ используют сульфаты в процессе ассимиляторной сульфатредукции. Однако значительное число ПСБ не используют сульфат, некоторые не используют тиосульфат или серу, но все используют сульфид (Кондратьева, 1996; Frigaard, Dahl, 2009; Dahl, 2015). Метаболизм серы у ПСБ характеризуется разнообразием биохимических путей, при этом в исследованиях основное внимание уделяется окислительным процессам, которые имеют место при фотосинтезе или аэробном дыхании, а восстановительные (анаэробные) процессы освещены мало. У ПСБ окисление серных соединений начинается с образования серных глобул, которые у семейства *Chromatiaceae* распо-

жены внутриклеточно, в периплазме, а у представителей *Ectothiorhodospiraceae* – внеклеточно (Patragulwanit et al., 1998; Frigaard, Dahl, 2009). Известен также один вид *Thiorhodospira sibirica*, у которого сера откладывается и внеклеточно, и внутриклеточно (Bryantseva et al., 1999).

Наиболее подробно изучен серный метаболизм у *A. vinosum* с использованием не только биохимического и структурного анализа ферментов, но и системного подхода, включая сравнительный геномный анализ, профили транскриптомики, протеомики, метаболомики (Weissgerber et al., 2013, 2014a, 2014b; Dahl, 2015). Имеющаяся информация о возможных путях метаболизма серы у ПСБ обобщена в обзорах К. Даль (Dahl, 2015, 2017) и представлена на рис. 3.

Окисление тиосульфата ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)

Окисление тиосульфата у ПСБ возможно двумя путями: с образованием тетраионата ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) или его диспропорционированием с образованием сульфата (SO_4^{2-}) и молекулярной серы с участием Sox-пути, причём у *A. vinosum* есть ферменты обоих путей. В тетраионатном пути используется пери-

плазматическая цитохром *c*-тиосульфатоксидоредуктаза TsdA, которая связана с фотосинтетической или дыхательной ЭТЦ через фьюжн белок TsdBA или высокопотенциальный железо-серный белок HiPIP (Dahl, 2017). Несмотря на видимое отсутствие серных глобул в некоторых условиях роста, их образование является обязательной стадией окисления тиосульфата у *A. vinosum* и других ПСБ. У них сульфановая сера с участием SoxY переносится на запасную серу с нулевой валентностью (Welte et al., 2009). В отличие от этого, окисление тиосульфата у некоторых факультативно хемо- или фотолитотрофных бактерий происходит через Sox-путь, но без образования запасной серы, при этом оба атома серы в тиосульфате окисляются до сульфата (Frigaard, Dahl, 2009).

Окисление сульфида (HS^-)

Предполагается наличие двух путей окисления сульфида: через сульфид:хинон оксидоредуктазы SqrD и SqrF с восстановлением пула убихинонов/менахинонов или через флавоцитохром *c*-сульфиддегидрогеназу FccAB (Reinartz et al., 1998; Gregersen et al., 2011; Weissgerber et al., 2011). У представителей *Chromatiaceae* как правило функционируют оба пути, тогда как у *Ectothiorhodospiraceae* обнаружен только второй путь (Dahl, 2017). Считается, что он приспособлен для окисления сульфида при низких концентрациях, т.к. обладает высокой аффинностью (Brune, 1995). В обоих случаях продуктами окисления сульфида являются полисульфиды, но механизм образования из них серных глобул пока не ясен.

Окисление серы (экстраклеточной и внутриклеточной)

Элементарная сера (S^0) состоит из колец S_8 (S_7) и цепочек полимерной серы и практически нерастворима в воде. У ПСБ сера сначала поступает в клетку с формированием внутриклеточных серных глобул и лишь затем окисляется до сульфата. Серные глобулы представляют собой длинные цепочки серы, которые могут заканчиваться органическими остатками (Prange et al., 2002). У *A. vinosum* глобулы имеют белковую оболочку, состоящую из 4 гидрофобных белков, SgpABCD (Brune, 1995). Относительное количество мРНК соответствующих генов возрастает в присутствии сульфида или тиосульфата в среде (Weissgerber et al., 2013). Эти гены обнаруживаются у представителей семейства *Chromatiaceae*, но не *Ectothiorhodospiraceae*. В качестве транспортеров в цитоплазму экстраклеточной или периплазматической серы предположительно выступают низкомолекулярные перисульфиды, например, перисульфид глутатионамида. У *A. vinosum* существует обширная

сеть переноса серы на основе Cys-SSH с последовательной передачей атомов серы на активный центр сульфитредуктазы через каскад промежуточных перисульфидов белков с участием роданазы (RhdA) и белков TusA, DSrE2A, DsrE, DsrC (Dahl, 2015, 2017). Как полагают, цитоплазматические ферменты всегда имеют дело с серой, связанной с белками, а не со свободными серными соединениями. Таким образом, предотвращается возможное токсическое действие сульфида, а с другой стороны, такие белки могут служить серным депо в цитоплазме, способствуя быстрой адаптации клеток к меняющимся условиям (Dahl, 2015; Tanabe et al., 2019).

Обычно запасная сера рассматривается как донор электронов для фотосинтеза или дыхания. Ранее считалось, что серные глобулы могут служить также резервным электронным акцептором для осуществления рудиментарного серного дыхания. В анаэробных условиях в темноте ПСБ могут восстанавливать серу до сульфида (van Gemerden, 1968; Truper, 1984). Этот процесс может быть связанным с окислением гликогена до полигидроксibuтирата и диссипированием избытка восстановительных эквивалентов (van Gemerden, 1968). Однако в последнее время эти процессы изучались мало.

Для окисления внутриклеточной серы предположительно используются два пути: Dsr-путь, использующий обратимую диссимиляторную сульфитредуктазу rDsrAB, и новый путь с использованием ферментов, аналогичных гетеродисульфидредуктазе (Hdr), обнаруженный у некоторых фототрофных представителей *Ectothiorhodospiraceae* (Venceslau et al., 2014; Dahl, 2017). У фототрофов rDsrAB отвечает за образование сульфита при окислении в цитоплазме перисульфидной серы белка DsrC (Stockdreher et al., 2014; Venceslau et al., 2014; Tanabe et al., 2019). Недавно установлено, что железо-серный флавопротеин DsrL является переносчиком электронов от НАДН к DsrAB (Löffler et al., 2020). У *T. roseopersicina* и *C. vinosum*, как и у других ПСБ, есть гены диссимиляторной сульфитредуктазы *dsrE-C*, *dsrM* и *dsrK*, причем соответствующие белки *dsrM* и *dsrK* обнаруживают значительную гомологию с белками, участвующими в водородном метаболизме – *isp1* и *isp2* (Dahl et al., 1999).

Окисление сульфита SO_3^{2-} до сульфата SO_4^{2-}

Для окисления сульфита, находящегося в периплазме, могут использоваться два типа систем: Sog и Sox, из которых у ПСБ есть только вторая, хотя и в измененном виде. Она не включает SoxCD белков, но использует периплазматический субстрат-связывающий белок SoxYZ (Dahl et al., 2013). Использование сульфита, находящегося в цитоплазме, может протекать непрямой (*sat*, *aprBA*) или прямым путем (*soe*). Непрямой путь

осуществляется через аденозин-5' фосфосульфат (АФС), с участием АФС редуктазы (AprVA) и АТФ сульфурилазы (Sat) (Dahl, 1996; Frigaard, Dahl, 2009). Предполагается, что электроны, освобождающиеся при образовании АФС из сульфита и АМФ, передаются на белок AprM, являющийся мембранным якорем (Meuer, Kuever, 2007). АФС редуктазный путь полностью отсутствует у *Ectothiorhodospiraceae*, обнаружен не у всех представителей *Chromatiaceae*, и, хотя есть у *A. vinosum*, но не является обязательным (Dahl, 2017). У этого организма основным сульфитоокисляющим ферментом является мембранно-связанный железосерный молибдопротеин SoeABC (прямой путь).

Ассимиляция сульфата SO_4^{2-}

Многие фототрофные бактерии способны ассимилировать и восстанавливать сульфат в отсутствие восстановленных соединений серы. В то же время некоторые виды, живущие в местообитаниях, богатых сероводородом, полностью утратили способность к сульфатредукции. Характерно, что пурпурные бактерии, не способные к фотоорганотрофному росту, не способны и к ассимиляции сульфата (Imhoff, 2005; Sander, Dahl, 2009). В частности, у *T. roseopersicina* BBS не обнаружено способности к ассимиляционной сульфат редукции, хотя пути окисления серных соединений близки к *A. vinosum*.

Ассимиляция сульфата и диссимиляторное окисление серы представляют собой отдельные пути, включающие специализированные ферменты. У *A. vinosum* поглощение сульфата осуществляется при участии периплазматической субстрат-связывающей транспортной системы (CysATWP), внутри клетки сульфат активируется АТФ-сульфуриазой (Frigaard, Dahl, 2009; Sander, Dahl, 2009). У *A. vinosum* отсутствует ген АФС киназы и присутствует ген АФС редуктазы, т.е. ассимиляция сульфата протекает без промежуточного образования ФАФС, как и у высших растений. Под действием АФС редуктазы происходит восстановительное расщепление АФС с образованием сульфита и АМФ, и далее сульфит восстанавливается до сульфида под действием ферредоксин-зависимой сульфитредуктазы (Dhillon et al., 2005; Frigaard, Dahl, 2009). Присутствие *cysB* означает, что гены ассимиляторной сульфатредукции экспрессируются только в отсутствие восстановленных серных соединений (Neuman et al., 2000).

СВЯЗЬ МЕТАБОЛИЗМА ВОДОРОДА И СЕРЫ У ПСБ

Физиологические процессы

Почти полвека тому назад проводились детальные физиологические исследования водородного и серного метаболизма у ПСБ в связи с

изучением типа питания (см. работы Кондратьевой, Гоготова, Ивановского, Pfennig, Truper, van Gemerden). Исследования проводились главным образом на серных бактериях, относящихся к родам *Allochromatium* и *Thiocapsa*.

Известно, что ПСБ используют серные соединения в качестве доноров электрона для роста на свету за счет фотосинтеза и в микроаэробных условиях в темноте за счет дыхания (см. раздел 2). В ряде случаев в качестве доноров электрона рядом с серными соединениями (или вместо них) может использоваться молекулярный водород (Кондратьева, Гоготов, 1981; Imhoff, 2005). Это означает, что серные соединения и H_2 могут рассматриваться как альтернативные доноры электронов для одних и тех же восстановительных процессов. Некоторые примеры конкуренции между ними будут рассмотрены ниже.

Внутриклеточная сера, образующаяся при использовании серных соединений, может служить также и акцептором электронов. Этот независимый от света процесс идет с образованием сульфида, а в качестве основных доноров электрона используются запасные полисахариды или экзогенные органические вещества, а также молекулярный водород. Последнее было показано на примере суспензий клеток *T. roseopersicina* BBS (Красильникова, 1976; Кондратьева, 1996; Laurinavichene et al., 2007). Предполагается, что эти процессы могут иметь энергетическое значение, но их роль в метаболизме ПСБ не доказана.

Помимо поглощения водорода возможно также выделение H_2 с использованием серных соединений (тиосульфат, сера), причем реакция протекает исключительно на свету. Ранее считалось, что этот процесс имеет место только в азотфиксирующих условиях и требует участия нитрогеназы (Кондратьева, Гоготов, 1981). Позднее было установлено, что при репрессии нитрогеназы выделение водорода может катализировать одна или даже две ГД (см. ниже, а также раздел 3). Полученные данные указывают на связь между водородным и серным метаболизмом с одной стороны и фотосинтезом с другой.

Связь отдельных ГД с метаболизмом серы

В последнее время водородный и серный метаболизм были изучены на генетическом уровне с уточнением возможных ферментативных путей. Следует отметить, что ферменты метаболизма водорода изучали главным образом у *T. roseopersicina* BBS, а ферменты метаболизма серы у *A. vinosum*, т.е. у бактерий близких во многих отношениях. Обнаружение четырех функционирующих NiFe гидрогеназ у *T. roseopersicina* (см. раздел 3) поставило вопрос, какая именно ГД принимает участие в том или ином ранее описанном процессе, в

частности, в связи с метаболизмом серы. Получение мутантов, лишенных той или иной ГД или же содержащих единственную ГД, позволило высказать гипотезы о функциях каждой ГД и провести экспериментальные исследования (Rakhely et al., 2004, 2007; Laurinavichene et al., 2007). Дальнейший прогресс в этой области связан с выяснением структуры ГД оперонов, особенностей структурных и электрон-транспортных субъединиц ГД. Как уже упоминалось выше, в гидрогеназном опероне HupSL гены большой и малой субъединиц разбединены генами *isp1* и *isp2*, причем последний имел сходство с гетеродисульфидредуктазой D метаногенов и с DsrK субъединицей комплекса, участвующего в окислении серы у ПСБ, что являлось косвенным указанием на связь этой ГД с серным метаболизмом (Rakhely et al., 1998; Dahl et al., 1999; Palágyi-Mészáros et al., 2009; Tengolics et al., 2014).

Текущие результаты пока не дают четкой картины взаимосвязи водородного метаболизма с серным, но освещают ее отдельные звенья с участием той или другой ГД.

Нур ГД. Основная функция мембранно-связанной поглощающей Нур ГД связана с передачей электронов от водорода в пул убихинонов/менахинонов с дальнейшим их использованием при анаэробном фотосинтезе или дыхании (Vignais, Billoud, 2007). Очевидно, Нур ГД непосредственно не участвует в восстановлении или окислении серных соединений. Однако на основании того, что эта гидрогеназа, как и у пурпурной несерной бактерии *R. capsulatus* (Vignais, 2001), содержит цитохром *c* (НурС), связывающий поглощение водорода с восстановлением убихинонов, а также косвенных данных, полученных на мутанте GB1131, содержащем только НурSL ГД (Laurinavichene et al., 2007), можно полагать, что серные соединения могут быть конкурентным к H_2 донором электронов при фотосинтезе и в темновых аэробных условиях.

Интересно, что H_2 не является регулятором синтеза этого фермента у *T. roseopersicina*, в отличие от аналогичных H_2 -поглощающих ГД, вследствие отсутствия экспрессии сенсора ГД НурTUV. Вместо этого синтез регулируется концентрацией тиосульфата, т.е. серного соединения и конкурентного донора электронов (Nagy et al., 2016). В настоящее время предполагается тройной механизм контроля НурSL ГД у *T. roseopersicina*, в которой тиосульфат является первичным регулятором: при высокой концентрации тиосульфата синтез фермента репрессирован (независимо от присутствия/отсутствия регулятора hupO или другой ГД). При низкой концентрации тиосульфата экспрессия НурSL ГД повышена, однако при удалении Нох1 ГД активность и экспрессия НурSL понижаются, а при дополнительном уда-

лении hupO – повышаются. При этом H_2 становится дополнительным модулятором экспрессии hup в hox1 мутанте. Таким образом, в настоящее время НурО рассматривается как звено, связывающее метаболизм тиосульфата с сетью ГД у *T. roseopersicina* (Nagy et al., 2016).

Нох ГД (1). Цитоплазматическая Нох1 гидрогеназа при репрессии НГ может участвовать в выделении H_2 на свету, в поглощении H_2 на свету, а также в темновом выделении водорода (Rakhely et al., 2004, 2007; Laurinavichene et al., 2007). Показано, что количество НудВ увеличивается в 4.5 раза при росте *A. vinosum* на сульфиде (Weissberger et al., 2014a). На свету для выделения водорода могут использоваться серные соединения, донирующие электроны в фотосинтетическую электрон-транспортную цепь (сульфид, тиосульфат, S^0). Так как окисление серных соединений является светозависимым процессом, то и выделение H_2 из серных соединений также зависит от света. В этом случае видна прямая связь серного и водородного путей. В темноте субстратами для выделения H_2 являются органические соединения (эндогенные или экзогенные углеводы). Они же могут служить восстановителями для серных соединений с образованием сульфида, следовательно, здесь возможна конкуренция между двумя путями использования субстрата – “водородным” и “сульфидным”. При репрессии НГ выделение H_2 на свету у мутанта GB1121 (Нох⁺) *T. roseopersicina*, не имеющих Нур и Нур ГД, сохраняется на уровне дикого типа и обеспечивается исключительно Нох гидрогеназой (Rakhely et al., 2007). При наличии НГ у того же мутанта выделение H_2 находится на уровне дикого типа, но существенно ниже, чем у мутанта M539 (с нарушением синтеза всех ГД). Из этого следует, что рециклизация H_2 может обеспечиваться и Нох1 гидрогеназой (Rakhely et al., 2007). Предполагается, что эта ГД может также использовать H_2 как дополнительный донор электронов для фиксации CO_2 на свету, но в присутствии серных соединений, что означает косвенную связь между серным метаболизмом и Нох1 гидрогеназой (Laurinavichene et al., 2007).

У *T. roseopersicina* BBS обнаружена еще одна гидрогеназа Нох типа (Maroti et al., 2010). Если Нох1 гидрогеназа проявляет активность при избытке тиосульфата, то Нох2 наиболее активна при малом содержании тиосульфата и при добавлении глюкозы. В этих условиях клетки выделяли водород. В условиях азотфиксации Нох2 ГД была способна к рециклизации выделяющегося за счет НГ водорода. Таким образом, обе Нох ГД являются обратимыми, причем только Нох1 гидрогеназа связана с серным метаболизмом.

Hyd ГД (isp тип). Как уже отмечалось выше, эта гидрогеназа считается связанной с серным метаболизмом.

У *T. roseopersicina* экспрессия HydSL гидрогеназы в анаэробных условиях активируется регулятором FnrG (Kovacs et al., 2005c; Vignais, 2009). Такие регуляторы Fnr-типа необходимы для перехода от аэробного к анаэробному метаболизму. Кроме того, показано, что тиосульфат не влияет на уровень экспрессии этого фермента у *T. roseopersicina* (Tengolicks et al., 2014). При изучении культуры ПСБ *Thiodictyon syntrophicum* Cad 16^T, растущей в циклически меняющихся условиях анаэробно (свет)/микрóaэробно (темнота), идентифицированы 50 белков, синтез которых заметно изменяется при смене условий, однако ГД в их числе не обнаружена (Luedin et al., 2019).

У *A. vinosum* было проведено детальное изучение экспрессии генов, белков и метаболитов при фотоавтотрофном росте (с использованием разных источников серы) и фотогетеротрофном росте с использованием малата (Weissgerber et al., 2013, 2014a, 2014b). При росте на сульфиде было обнаружено значительное увеличение уровня мРНК для оперона *hyd* (Alvin_2036–Alvin_2040), кодирующего HydSL гидрогеназу (Weissgerber et al., 2013). Далее было показано, что количество белков Isp1 и Isp2 также увеличивается в 2–3 раза при росте на сульфиде, тиосульфате, сере (Weissgerber et al., 2014a). У мутанта Alvin_2036–Alvin_2040 с канамициновой вставкой не обнаружилось серьезных изменений роста или ассимиляции сульфата. Однако при его выращивании при повышенной концентрации сульфида (8 мМ) скорость запасаания внутриклеточной серы понизилась почти в 2 раза по сравнению с родительским штаммом. При этом общее содержание серы не изменилось. Не изменились также скорости окисления тиосульфата, серы и сульфида. Авторы считают, что это указывает на роль ГД в запасаании серы (Weissgerber et al., 2014a). Возможная связь ГД с серным метаболизмом представлена на рис. 3. Гидрогеназный Isp1–Isp2 комплекс может переносить электроны от H₂, окисляемого в периплазме, через мембранно-связанный *b*-цитохром (DsrM-подобный Isp1) и мембран-ассоциированный цитоплазматически ориентированный DsrK-подобный белок (Isp2) на цитоплазматический гетеродисульфид. При этом DsrC-дисульфид (рис. 3) может быть донором серы для комплекса HydSL гидрогеназы и Isp1–Isp2 белков. При этом следует учитывать, что, несмотря на однонаправленный характер реакций, указанных на этом рисунке, ряд реакций могут быть обратимыми, в частности, реакции, катализируемые HydSL гидрогеназой.

Ранее было показано, что HydSL гидрогеназа *T. roseopersicina* участвует в независимом от света

восстановлении запасной серы в атмосфере водорода (Laurinavichene et al., 2007). Физиологическая роль этой реакции неясна, однако есть свидетельства, что она требует присутствия электрон-транспортных субъединиц Isp1 и Isp2 (Palágyi-Mészáros et al., 2009). Позднее с использованием мутанта GB2131 (Hyd⁺), содержащего только эту ГД, было продемонстрировано ее участие в светозависимом образовании H₂ из тиосульфата и серы, т.е. в реакции, характерной для Hox ГД (Tengolicks et al., 2014). Причем серные соединения могут использоваться не только для выделения H₂, но и для образования сульфида. Поскольку количества образованного H₂ и сульфида находятся в обратной зависимости, эти процессы рассматриваются как конкурентные (Tengolicks et al., 2014). В соответствии со стандартным редокс-потенциалом восстановление серы (т.е. образование сульфида) предпочтительнее, чем образование H₂, хотя потенциал сильно зависит от фактической концентрации (Tengolicks et al., 2014). Другое объяснение этой обратной взаимосвязи у мутанта GB2131 (Hyd⁺) заключается в возможности поглощения H₂, выделяемого Hox гидрогеназой, с восстановлением S⁰ и образованием сульфида, т.е. рециклизации H₂ (Rákhely et al., 2007; Weissberger et al., 2014a).

Несмотря на многочисленные доказательства участия HydSL гидрогеназы в реакциях окисления/восстановления серных соединений, пока не очевидно, какие преимущества бактериям дает наличие этой гидрогеназы (причем синтезируемой конститутивно). Следует отметить, что по нашим оценкам доля этой гидрогеназы среди других белков может составлять до 0.05%, что может подтверждать ее принадлежность к белкам энергетического метаболизма. Однако мутант, лишенный HydSL гидрогеназы, в лабораторных условиях на стандартной среде растет не хуже дикого штамма. Можно предположить, что этот фермент важен в природных условиях при непостоянстве концентраций субстратов/доноров электрона и изменяющейся освещенности. До сих пор такие условия не были промоделированы в лабораторных экспериментах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, гидрогеназы ПСБ, хотя и по-разному, но функционально связаны с серным метаболизмом. Причем можно видеть и прямую связь (выделение/поглощение H₂ с использованием серных соединений), и конкурентные взаимоотношения (образование или H₂, или сульфида при использовании сахаров; окисление или серных соединений, или H₂ при аэробном дыхании). Учитывая, что роль некоторых ГД у ПСБ до сих пор неясна, нельзя исключить, что связь метабо-

лизма серы и H_2 окажется еще более тесной, чем представляется в настоящий момент.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФ № 19-14-00255.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горленко В.М., Дубинина Г.А., Кузнецов С.И. Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977. 288 с.
- Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Горленко В.М., Иванов М.В., Каравайко Г.И., Кожевин П.А., Колотилова Н.Н., Котова И.Б., Максимов В.Н., Ножневникова А.Н., Семенов А.М., Турова Т.П., Юдина Т.Г. Экология микроорганизмов. М.: Юрайт, 2013. 268 с.
- Грабович М.Ю. Участие прокариот в круговороте серы // Соросовский образовательный журн. 1999. Т. 12. С. 16–20.
- Кондратьева Е.Н. Автотрофные прокариоты. М.: МГУ, 1996. 312 с.
- Кондратьева Е.Н., Гоготов И.Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука; 1981. 344 с.
- Красильникова Е.Н. О темновом анаэробном метаболизме *Thiocapsa roseopersicina* // Микробиология. 1976. Т. 45. С. 372–374.
- Krassilnikova E.N. Anaerobic metabolism of *Thiocapsa roseopersicina* in the darkness // Mikrobiologiya (Russ.). 1976. V. 45. P. 372–374.
- Турова Т.П., Кеппен О.И., Ковалева О.Л., Слободова Н.В., Берг И.А., Ивановский Р.Н. Филогенетическое положение пурпурной серной бактерии *Thiocapsa* sp. штамм ВВS на основании анализа генов 16S рРНК, *cbbL* и *nifH* и описание его в качестве вида *Thiocapsa bogorovii* sp. nov. // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 381–392.
- Tourova T., Keppen O.I., Kovaleva O.L., Slobodova N.V., Berg I.A., Ivanovsky R. Phylogenetic characterization of the purple sulfur bacterium *Thiocapsa* sp. ВВS by analysis of the 16S rRNA, *cbbL*, and *nifH* genes and its description as *Thiocapsa bogorovii* sp. nov., a new species // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 339–349.
- Цыганков А.А., Хуснутдинова А.Н. Участие H_2 в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 3–26.
- Tsygankov A.A., Khusnutdinova A.N. Hydrogen in metabolism of purple bacteria and prospects of practical application // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 1–22.
- Appel J., Schulz R. Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: Hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising? // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 1998. V. 47. P. 1–11.
- Berg J.S., Pjevac P., Sommer T., Buckner C.R.T., Philippi M., Hach P.F., Liebeke M., Holtappels M., Danza F., Tonolla M., Sengupta A., Schubert C.J., Milucka J., Kuypers M.M.M. Dark aerobic sulfide oxidation by anoxygenic phototrophs in anoxic waters // Environ. Microbiol. 2019. V. 21. P. 1611–1626.
- Bhatnagar S., Cowley E.S., Kopf S.H., Castro S.P., Kearney S., Scott C., Dawson S.C., Hanselmann K., Emil Ruff S.E. Microbial community dynamics and coexistence in a sulfide-driven phototrophic bloom // Environ. Microbiome. 2020. V. 15. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1186/s40793-019-0348-0>
- Brugna-Guiral M., Tron P., Nitschke W., Stetter K.-O., Burlat B., Guigliarelli B., Bruschi M., Giudici-Ortoni M.T. [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: Properties, function, and phylogenetics // Extremophiles. 2003. V. 7. P. 145–157.
- Brune D.C. Sulfur compounds as photosynthetic electron donors // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration. V. 2 / Ed. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Dordrecht: Springer, 1995. P. 847–870.
- Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Kompantseva E.I., Imhoff J.F., Süling J., Mityushina L. *Thiorhodospira sibirica* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic purple sulfur bacterium from a Siberian soda lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1999. V. 49. P. 697–703.
- Calusinska M., Happe T., Joris B., Wilmolte A. The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective // Microbiology (SGM). 2010. V. 156. P. 1575–1588.
- Dahl C. Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum* // Microbiology (SGM). 1996. V. 142. P. 3363–3372.
- Dahl C. Cytoplasmic sulfur trafficking in sulfur-oxidizing prokaryotes // IUBMB Life. 2015. V. 67. P. 268–274.
- Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic bacteria // Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Metabolism, Bioenergetics, and Omics / Ed. Hallenbeck P.C., Cham: Springer Int. Publishing, 2017. P. 27–66.
- Dahl C., Franz B., Hensen D., Kesselheim A., Zigann R. Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process // Microbiology (SGM). 2013. V. 159. P. 2626–2638.
- Dahl C., Rákhely G., Pott-Sperling A.S., Fodor B., Takacs M., Toth A., Kraeling M., Gyorfí K., Kovacs A., Tusz J., Kovacs K.L. Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 180. P. 317–324.
- de Wit R., van Gemerden H. Growth and metabolism of the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* under combined light/dark and oxic/anoxic regimens // Arch. Microbiol. 1990. V. 154. P. 459–464.
- Del Don C., Hanselmann K.W., Peduzzi R., Bachofen R. Biomass composition and methods for the determination of

- metabolic reserve polymers in phototrophic sulfur bacteria // *Aquat. Sci.* 1994. V. 56. P. 1–15.
- Dhillon A., Goswami S., Riley M., Teske A., Sogin M. Domain evolution and functional diversification of sulfite reductases // *Astrobiology*. 2005. V. 5. P. 18–29.
- Frigaard N.U., Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria // *Advances in Microbial Physiology* / Ed. Poole R. Academic Press, 2008. V. 54. P. 103–200.
- Fritsch J., Lenz O., Friedrich B. The maturation factors HoxR and HoxT contribute to oxygen tolerance of membrane-bound [NiFe] hydrogenase in *Ralstonia eutropha* H16 // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 2487–2497.
- Fritsch J., Lenz O., Friedrich B. Structure, function and biosynthesis of O₂-tolerant hydrogenases // *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. V. 11. P. 106–114.
- Ghosh W., Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. P. 999–1043.
- Greening C., Biswas A., Carere C.R., Jackson C.J., Taylor M.C., Stott M.B., Cook G.M., Morales S.E. Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H₂ is a widely utilised energy source for microbial growth and survival // *ISME J.* 2016. V. 10. P. 761–777.
- Greening C., Boyd E. Editorial: Microbial hydrogen metabolism // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 56. P. 1–4.
- Greening C., Constant P., Hards K., Morales S.E., Oakeshott J.O., Russell R.J., Taylor M.C., Berney M., Conrad R., Gregory M., Cook G.M. Atmospheric hydrogen scavenging: from enzymes to ecosystems // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 1190–1199.
- Gregersen L.H., Bryant D.A., Frigaard N.-U. Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria // *Front. Microbiol.* 2011. V. 2. Art. 116. P. 1–14.
- Gogotov I.N., Zorin N.A., Serebriakova L.T., Kondratieva E.N. The properties of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1978. V. 523. P. 335–343.
- Imhoff J.F. Family Chromatiaceae // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn. / Ed. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. N.Y.: Springer, 2005. V. 2. P. 3–9.
- Imhoff J.F. The Family Chromatiaceae // *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria* / Ed. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. P. 151–178.
- Kovács K.L., Fodor B., Kovács Á.T., Csanádi G., Maróti G., Balogh J., Arvani S., Rákhely G. Hydrogenases, accessory genes and the regulation of [NiFe] hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina* // *Int. J. Hydrogen Energy*. 2002. V. 27. P. 1463–1469.
- Kovács K.L., Kovács A.T., Maróti G., Meszaros L.S., Balogh J., Latinovics D., Fulop A., David R., Doroghazi E., Rákhely G. The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina* // *Biochem. Soc. Trans.* 2005a. V. 33. P. 61–63.
- Kovács Á.T., Rákhely G., Balogh J., Maróti G., Cournac L., Carrier P., Mészáros L.S., Peltier G., Kovács K.L. Hydrogen independent expression of *hupSL* genes in *Thiocapsa roseopersicina* BBS // *FEBS J.* 2005b. V. 272. P. 4807–4816.
- Kovács Á.T., Rákhely G., Browning D.F., Fulop A., Maróti G., Busby S.J., Kovács K.L. An FNR-type regulator controls the anaerobic expression of *hyn* hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina* // *J. Bacteriol.* 2005c. V. 187. № 8. P. 2618–2627.
- Laurinavichene T.V., Rákhely G., Kovács K.L., Tsygankov A.A. The effect of sulfur compounds on H₂ evolution/consumption reactions, mediated by various hydrogenases, in the purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* // *Arch. Microbiol.* 2007. V. 188. P. 403–410.
- Laurinavichene T., Kitashima M., Nagashima K.V.P., Sato T., Sakurai H., Inoue K., Tsygankov A. Effect of growth conditions on advantages of *hup⁻* strain for H₂ photoproduction by *Rubrivivax gelatinosus* // *Int. J. Hydrogen Energy*. 2017. V. 42. P. 8497–8504.
- Lenz O., Friedrich B. A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 12474–12479.
- Löffler M., Wallerang K.B., Venceslau S.S., Pereira I.A.C., Dahl C. The iron-sulfur flavoprotein DsrL as NAD(P)H: acceptor oxidoreductase in oxidative and reductive dissimilatory sulfur metabolism // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 578209. P. 1–15.
- Long M., Liu J., Chen Z., Bleijlevens B., Roseboom W., Albracht S.P.J. Characterization of a HoxEFUYH type of [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* and some EPR and IR properties of the hydrogenase module // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007. V. 12. P. 62–78.
- Lovley D.R., Goodwin S. Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1988. V. 52. P. 2993–3003.
- Luedin S.M., Pothier J.F., Danza F., Storelli N., Frigaard N.-U., Wittwer M., Tonolla M. Complete genome sequence of “*Thiodictyon syntrophicum*” sp. nov. strain Cad16T, a photolithoautotrophic purple sulfur bacterium isolated from the alpine meromictic Lake Cadagno // *Stand. Genom. Sci.* 2018. V. 13. P. 1–14.
- Luedin S.M., Storelli N., Danza F., Roman S., Wittwer M., Pothier J.F., Mauro Tonolla M. Mixotrophic growth under micro-oxic conditions in the purple sulfur bacterium *Thiodictyon syntrophicum* // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 384. P. 1–15.
- Ma K., Schicho R.N., Kelly R.M., Adams M.W.W. Hydrogenase of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 5341–5344.
- Madigan M.T. Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments // *Photosynth. Res.* 2003. V. 76. P. 157–171.
- Madigan M.T., Jung D.O. An overview of purple bacteria: systematics, physiology, and habitats // *The Purple Phototrophic Bacteria* / Ed. Hunter C.N., Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. P. 1–15.
- Maróti G., Fodor B.D., Rákhely G., Kovács Á.T., Arvani S., Kovács K.L. Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 2218–2227.
- Maróti J., Farkas A., Nagy I.K., Maróti G., Kondorosi E., Rákhely G., Kovács K.L. A second soluble Hox-type NiFe enzyme completes the hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina* BBS // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 5113–5123.

- Mas J., Van Gernerden H. Storage products in purple and green sulfur bacteria // *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* / Ed. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. Ch. 45. P. 973–990.
- Massé A., Pringault O., de Wit R. Experimental study of interactions between purple and green sulfur bacteria in sandy sediments exposed to illumination deprived of near-infrared wavelengths // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 2972–2981.
- Meyer B., Kuever J. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfur-oxidizing prokaryotes // *Microbiology (SGM)*. 2007. V. 153. P. 3478–3498.
- Meuer J., Kuetner H. Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 5632–5637.
- Nagy I.K., Kovács K.L., Rákhely G., Maróti G. HupO, a novel regulator involved in thiosulfate-responsive control of HupSL [NiFe]-hydrogenase synthesis in *Thiocapsa roseopersicina* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. V. 82. P. 2039–2049.
- Neumann S., Wynen A., Trüper H.G., Dahl C. Characterization of the *cys* gene locus from *Allochromatium vinosum* indicates an unusual sulfate assimilation pathway // *Mol. Biol. Rep.* 2000. V. 27. P. 27–33.
- Overmann J. Mahoney Lake: A case study of the ecological significance of phototrophic sulfur bacteria // *Advances in Microbial Ecology* / Ed. Jones J.G. Boston, MA: Springer US, 1997. P. 251–288.
- Overmann J., van Gernerden H. Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities // *FEMS Microbiol. Rev.* 2000. V. 24. P. 591–599.
- Overmann J., Pfennig N. Continuous chemotrophic growth and respiration of *Chromatiaceae* species at low oxygen concentrations // *Arch. Microbiol.* 1992. V. 158. P. 59–67.
- Palágyi-Mészáros L.S., Maróti J., Latinovics D., Balogh T., Klement E., Medzihradzky K.F., Ryperli G., Koverl K.L. Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS // *FEBS J.* 2009. V. 276. P. 164–174.
- Pattaragulwanit K., Brune D.C., Trüper H.G., Dahl C. Molecular genetic evidence for extracytoplasmic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum* // *Arch. Microbiol.* 1998. V. 169. P. 434–444.
- Peduzzi S., Tonolla M., Hahn D. Isolation and characterization of aggregate-forming sulfate-reducing and purple sulfur bacteria from the chemocline of meromictic Lake Cadagno, Switzerland // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003. V. 45. P. 29–37.
- Peters J.W., Schut G.J., Boyd E.S., Mulder D.W., Shepard E.M., Broderick J.B., King P.W., Adams M.W.W. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell. Res.* 2015. V. 1853. P. 1350–1369.
- Pfennig N., Biebl H. The dissimilatory sulfur-reducing bacteria // *The Prokaryotes* / Ed. Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. Berlin, Heidelberg: Springer, 1981. P. 941–947.
- Prange A., Chauvistré R., Modrow H., Hormes J., Trüper H.G., Dahl C. Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur // *Microbiology (SGM)*. 2002. V. 148. P. 267–276.
- Pringault O., de Wit R., Kühl M. A microsensor study of the interaction between purple sulfur and green sulfur bacteria in experimental benthic gradients // *Microb. Ecol.* 1999. V. 37. P. 173–184.
- Rákhely G., Colbeau A., Garin J., Vignais P.M., Kovács K.L. Unusual organization of the genes coding for HydSL, the stable [NiFe]hydrogenase in the photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 1460–1465.
- Rákhely G., Kovács Á.T., Maróti G., Fodor B.D., Csanadi G., Latinovics D., Kovács K.L. Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD⁺-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 722–728.
- Rákhely G., Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A., Kovács K.L. The role of Hox hydrogenase in the H₂ metabolism of *Thiocapsa roseopersicina* // *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* 2007. V. 1767. P. 671–676.
- Reinartz M., Tschäpe J., Brüser T., Trüper H.G., Dahl C. Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum* // *Arch. Microbiol.* 1998. V. 170. P. 59–68.
- Sander J., Dahl C. Metabolism of inorganic sulfur compounds in purple bacteria // *The Purple Phototrophic Bacteria* / Ed. Hunter C.N., Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. P. 595–622.
- Schwartz E., Fritsch J., Friedrich B. H₂-metabolizing prokaryotes // *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry* / Ed. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. P. 119–199.
- Serebryakova L.T., Zorin N.A., Gogotov I.N. Isolation and properties of hydrogenase from *Rhodospseudomonas capsulata* // *Biochemistry (Moscow)*. 1984. V. 49. P. 1241–1247.
- Søndergaard D., Pedersen C.N.S., Greening C. HydDB: A web tool for hydrogenase classification and analysis // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 34212. P. 1–8.
- Stockdreher Y., Sturm M., Josten M., Sahl H.-G., Dobler N., Zigann R., Dahl C. New proteins involved in sulfur trafficking in the cytoplasm of *Allochromatium vinosum* // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 12390–12403.
- Tanabe T.S., Leimkühler S., Dahl C. The functional diversity of the prokaryotic sulfur carrier protein TusA // *Adv. Microbial Physiol.* 2019. V. 75. P. 233–277.
- Teng Y., Xu Y., Wang X., Christie P. Function of biohydrogen metabolism and related microbial communities in environmental bioremediation // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 106. P. 1–14.
- Tengölics R., Mészáros L., Gyóri E., Doffkay Z., Kovács K.L., Rákhely G. Connection between the membrane electron transport system and Hyn hydrogenase in the purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* BBS // *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* 2014. V. 1837. P. 1691–1698.

- Truper H.G.* Phototrophic bacteria and their sulfur metabolism // Sulfur: Its Significance for Chemistry, for the Geo-, Bio- and Cosmospere and Technology / Ed. Müller A., Krebs B., 1984. V. 5. P. 367–382.
- van den Ende F.P., Laverman A.M., van Gernerden H.* Coexistence of aerobic chemotrophic and anaerobic phototrophic sulfur bacteria under oxygen limitation // FEMS Microbiol. Ecol. 1996. V. 19. P. 141–151.
- van Gernerden H.* On the ATP generation by *Chromatium* in darkness // Arch. Mikrobiol. 1968. V. 64. P. 118–124.
- van Gernerden H., Mas J.* Ecology of phototrophic sulfur bacteria // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria / Ed. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. P. 49–85.
- van Heerikhuizen H., Albracht S.P.J., Slater E.C., van Rheenen P.S.* Purification and some properties of the soluble hydrogenase from *Chromatium vinosum* // Biochim. Biophys. Acta – Enzymol. 1981. V. 657. P. 26–39.
- Vandieken V., Finke N., Thamdrup B.* Hydrogen, acetate, and lactate as electron donors for microbial manganese reduction in a manganese-rich coastal marine sediment // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 87. P. 733–745.
- Venceslau S.S., Stockdreher Y., Dahl C., Pereira I.A.C.* The bacterial heterodisulfide DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism // Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg. 2014. V. 1837. P. 1148–1164.
- Vignais P.M.* Regulation of hydrogenase gene expression // The Purple Phototrophic Bacteria / Ed. Hunter C.N., Daldal F., Thurnauer M.C., Beaty J.T. Springer Science + Business Media B.V. 2009. P. 743–757.
- Vignais P.M., Billoud B.* Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview // Chem. Rev. 2007. V. 107. P. 4206–4272.
- Vignais P.M., Billoud B., Meyer J.* Classification and phylogeny of hydrogenases // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. P. 455–501.
- Visscher P.T., van den Ende F.P., Schaub B.E.M., van Gernerden H.* Competition between anoxygenic phototrophic bacteria and colorless sulfur bacteria in a microbial mat // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 101. P. 51–58.
- Volbeda A., Darnault C., Parkin A., Sargent F., Armstrong F.A., Fontecilla-Camps J.C.* Crystal structure of the O₂-tolerant membrane-bound hydrogenase 1 from *Escherichia coli* in complex with its cognate cytochrome *b* // Structure. 2013. V. 21. P. 184–190.
- Weissgerber T., Dobler N., Polen T., Latus J., Stockdreher Y., Dahl C.* Genome-wide transcriptional profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* DSM 180T during growth on different reduced sulfur compounds // J. Bacteriol. 2013. V. 195. P. 4231–4245.
- Weissgerber T., Sylvester M., Kröninger L., Dahl C.* A comparative quantitative proteomic study identifies new proteins relevant for sulfur oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* // Appl. Environ. Microbiol. 2014a. V. 80. P. 2279–2292.
- Weissgerber T., Watanabe M., Hoefgen R., Dahl C.* Metabolic profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* during growth on different reduced sulfur compounds and malate // Metabolomics. 2014b. V. 10. P. 1094–1112.
- Weissgerber T., Zigann R., Bruce D., Chang Y.-J., Detter J.C., Han C., Hauser L., Jeffries C.D., Land M., Munk A.C., Tapia R., Dahl C.* Complete genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180(T) // Stand. Genomic Sci. 2011. V. 5. P. 311–330.
- Welte C., Hafner S., Krätzer C., Quentmeier A., Friedrich C.G., Dahl C.* Interaction between Sox proteins of two physiologically distinct bacteria and a new protein involved in thiosulfate oxidation // FEBS Lett. 2009. V. 583. P. 1281–1286.

Relations between Hydrogen and Sulfur Metabolism in Purple Sulfur Bacteria

M. K. Khasimov¹, T. V. Laurinavichene¹, E. P. Petushkova¹, and A. A. Tsygankov^{1,*}

¹*Institute of Basic Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: ttt-00@mail.ru

Received March 9, 2021; revised April 3, 2021; accepted April 5, 2021

Abstract—The review considers the role of purple sulfur bacteria in the global cycles of hydrogen and sulfur, as well as the ecology and physiology of these bacteria in relation to the metabolism of sulfur and hydrogen. Information is presented on five types of hydrogenases involved in consumption or production of hydrogen, as well as on various enzymes involved in the oxidation/reduction of sulfur compounds. Advances in the biochemistry and genetics of the enzymes from these microorganisms make it possible to analyze the interconnection of processes at a new level.

Keywords: molecular hydrogen, hydrogenases, sulfur metabolism, *Thiocapsa*, *Allochromatium*, purple sulfur bacteria

РЕАКЦИЯ БАКТЕРИЙ НА МЕХАНИЧЕСКИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2021 г. С. С. Евстигнеева^а, Е. М. Телешева^а, Д. И. Мокеев^а,
И. В. Борисов^а, Л. П. Петрова^{а, **}, А. В. Шелудько^{а, *}

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: shel71@yandex.ru

**e-mail: petrova_lp@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2021 г.

После доработки 02.05.2021 г.

Принята к публикации 09.05.2021 г.

Бактерии быстро приспосабливаются к изменениям окружающей их среды, используя сенсорные системы, с помощью которых постоянно исследуют свое окружение. Одно из распространенных мнений состоит в том, что такие системы реагируют на сигналы, имеющие химическую природу. Но бактерии часто испытывают воздействия механических сил, например, при переходе из планктонного состояния в неподвижное. Однако механические воздействия редко рассматривались как сигнал, который бактерии могли бы почувствовать и отреагировать. Тем не менее, бактерии воспринимают механические стимулы, генерируют сигналы и формируют ответ. В обзоре мы анализируем информацию о том, каким образом бактерии реагируют на механические воздействия, а также кратко описываем механизмы, позволяющие преобразовывать поступающие сигналы в соответствующие ответы.

Ключевые слова: бактерии, механочувствительность, механотрансдукция, подвижность, биопленки, роение, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*

DOI: 10.31857/S0026365621050050

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СРЕДЫ ВЛИЯЮТ НА ПОВЕДЕНИЕ БАКТЕРИЙ

Микроорганизмы способны заселять разнообразные по своим свойствам места обитания, которые характеризуются гетерогенностью и динамичностью физико-химических и механических свойств (Dufrêne, Persat, 2020). Бактерии быстро приспосабливаются к изменениям окружающей их среды, используя сенсорные системы, с помощью которых постоянно исследуют свое окружение (Berg, 1975; Bible et al., 2008; Vladimirov, Sourjik, 2009; Chawla et al., 2020; Fajardo-Cavazos, Nicholson, 2021). Свободно плавающие в жидких средах (планктонные) бактерии взаимодействуют со множеством факторов. Это могут быть абиотические особенности среды, другие микробы, а также крупные многоклеточные организмы. Подвижность вкупе с разнообразными проявлениями таксиса способствует быстрым ответам бактерий на изменения в окружающей среде и позволяет им активно искать оптимальную для обитания нишу (Berg, 1975; Sauer, 2004; Flemming, Wingender, 2010; Guttenplan et al., 2013).

Плавающие бактерии движутся вперед под действием толкающего усилия вращающихся жгутиков, а когда направление вращения органелл меняется на обратное, развивается тянущее уси-

лие, которое заставляет бактерию двигаться назад или кувыркаться (Taylor, Koshland, 1974; Berg, 1975; Lele et al., 2013). Это повторяется многократно (ориентация клетки при этом меняется на угол различной величины), и в результате траектория движения клетки получается ломаная. Вращение жгутика вызывает вращение клетки (Taylor, Koshland, 1974; Berg, 1975; Chawla et al., 2020), но в противоположном направлении, однако, поскольку клетка все же значительно массивнее жгутика, она совершает намного меньше оборотов. Таким образом, в планктонной культуре подвижные бактерии испытывают определенную механическую нагрузку со стороны среды, которая может меняться в результате гидродинамического сдвига или изменения механических свойств окружения. Увеличение вязкости/плотности среды увеличивает нагрузку на жгутик (Chawla et al., 2020), что сказывается на скорости перемещения клеток и может повлиять как на морфологию бактерий, так и на их поведение (McCarter, 1999; Whitchurch et al., 2004; Belas, Suvanasuthi, 2005; Harshey et al., 2015; Petrova et al., 2020).

Сталкиваясь с вязкими/гелеобразными/плотными средами и поверхностями, бактерии переходят от свободного плавания к роению, то есть зависящему от работы двигательных органелл (жгутиков), межклеточных контактов, продукции

сурфактантов и ряда других факторов согласованному перемещению по влажным поверхностям (Harshey et al., 2015). Для колонизации поверхностей роение используют разные виды бактерий (Harshey et al., 2015), в том числе патогенные *Vibrio parahaemolyticus* и *Proteus mirabilis*, почвенные бактерии *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum baldaniorum*, клетки которых для реализации этого способа подвижности увеличиваются в размере и дополнительно синтезируют многочисленные жгутики (McCarter et al., 1988; Kawagishi et al., 1996; Moens et al., 1996; Scheludko et al., 1998; Velas, Suvanasthi, 2005; Petrova et al., 2020).

У глубоководных морских бактерий подвижность, обусловленная жгутиками, изменяется в ответ на перепады давления (Elloe et al., 2008; Wang F. et al., 2008). Предполагают, что в глубинах океана фенотип роящихся бактерий может быть предпочтительнее фенотипа планктонных клеток (Dufrière, Persat, 2020). В зависимости от давления планктонные клетки этих микробов дифференцируются к фенотипу роящихся. Глубоководные бактерии *Photobacterium profundum* и *Shewanella piezotolerans*, оптимально растущие при высоком давлении, сохраняют подвижность под давлением в тысячу раз выше атмосферного (Dufrière, Persat, 2020), что не характерно для *E. coli* и других микробов, которые не способны адаптироваться к подобным условиям (Elloe et al., 2008). Геном пьезофила *Ph. profundum* содержит два кластера жгутиковых генов: один кодирует полярный жгутик, а другой предполагаемый кластер – систему латеральных жгутиков (Elloe et al., 2008). Латеральные жгутики синтезируются под высоким давлением или в средах с высокой вязкостью и обеспечивают подвижность в этих условиях (Elloe et al., 2008). Активация генов, кодирующих систему латеральных жгутиков, зависит от наличия полярной флагеллы, не функционирующей при высоком давлении. Эти наблюдения позволили сделать заключение, что клетки *Ph. profundum* чувствуют изменение давления и вязкости полярным жгутиком и реагируют, активируя синтез латеральных жгутиков, обеспечивая подвижность в условиях высокого давления (Dufrière, Persat, 2020). Аналогично *Sh. piezotolerans* инициирует роение при повышении давления (Wang et al., 2008; Dufrière, Persat, 2020).

Плавающие планктонные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* могут кардинально менять способ перемещения и переходить к тянущей подвижности за счет механической работы пилей IV типа по вязким/гелеобразным поверхностям (Whitchurch et al., 2004; McCallum et al., 2017). Двигательные органеллы также часто обеспечивают физический контакт микробов с различными поверхностями, включая других членов экологического сообщества, выступая в роли адгезинов (Croes et al., 1993; Шелудько и соавт., 2010).

Подвижность и жгутики способствуют попаданию бактерий на интерфейс, подходящую для строительства биопленки (граница раздела плотной/жидкой или жидкой/газовой сред), проникновению в уже существующую биопленку и распространению биопленки по поверхности (Hough et al., 2010). Бактериальные биопленки представляют собой пространственно и метаболически структурированные сообщества микроорганизмов, заключенных в матрикс, состоящий в основном из полисахаридов (ПС), белков и экстраклеточных ДНК (Flemming, Wingender, 2010). Жгутики и пили бактерий также интегрированы в матрикс и поддерживают его архитектуру, зависящую от многих факторов, включая гидродинамические условия, концентрацию питательных веществ, подвижность бактерий и их коммуникацию друг с другом. В процессе строительства биопленок бактериями с разной физиологией и характером взаимодействия с колонизируемым объектом выявлены общие этапы: адгезия клеток к поверхности, формирование микроколоний, монослоя и многослойной биопленки. По мере старения биопленки претерпевают дисперсию, в результате которой бактерии переходят к планктонному образу жизни и к поиску новых местообитаний (Verstraeten et al., 2008; López et al., 2010; Flemming, Wingender, 2010; Guttenplan et al., 2013). Распад биопленок может происходить тремя путями: эрозией, сбрасыванием и дисперсионным распылением клеток (Kaplan, 2004). Данная стадия очень важна, так как приводит не столько к гибели клеток биопленки, сколько к появлению новых свободноживущих клеток, способных к образованию новой пленки (Sauer, 2004). Дисперсия чаще всего является ответом на изменение внешней среды (гидродинамический сдвиг, прекращение поступления питательных веществ или, наоборот, резкое их появление) (Sauer, 2004; Shelud'ko et al., 2019).

Разнообразие регуляторных механизмов формирования и структурных элементов биопленок сопоставимо с количеством видов и даже штаммов бактерий, эти биопленки образующих. Нередко у разных штаммов бактерий одного вида выявляется разный арсенал сигналов и путей, значимых для реализации того или иного поведенческого ответа (López et al., 2010; Flemming, Wingender, 2010; Bogino et al., 2013).

Таким образом, бактериям приходится испытывать разнообразные механические воздействия. О реализации восприятия таких воздействий, передаче сигнала о них и соответствующих индивидуальных или групповых ответов бактерий (изменение подвижности, переход от свободного плавания к роению, адгезия на поверхности, формирование колоний и биопленок и пр.) пока известно немного (Ellison, Brun, 2015; Persat, 2017; Chawla et al., 2020). Известны примеры участия в вышеназванных процессах белков внешней мембраны, экстраклеточных

точных органелл – пилей I и IV типа, жгутиков, первыми вступающих в контакт с микроокружением бактерий (Otto, Silhavy, 2002; Kuchma et al., 2012; Cairns et al., 2013; Belas, 2014; Blanka et al., 2015; Narapanahalli et al., 2015; Luo et al., 2015; Persat et al., 2015; Rodesney et al., 2017).

Молекулярные механизмы механочувствительности относительно хорошо изучены только у эукариот (Iskratsch et al., 2014; Ohashi et al., 2017; Fajardo-Cavazos, Nicholson, 2021). Поэтому получение наиболее полных сведений о структурах и молекулярных событиях, обеспечивающих механоответы бактерий, является актуальной и важной задачей.

МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ОБОЛОЧКИ

Прикрепившись к твердой поверхности, бактерии ощущают силу адгезии. Эта сила создает механическое напряжение, вызывающее обратимые деформации клеточной оболочки (Chen et al., 2014). Известно, что активность мембранных механочувствительных каналов бактерий, открывающихся при деформации липидного бислоя клеточной мембраны, способствует осморегуляции (Sukharev et al., 1999; Booth, 2014). Выявленные у некоторых бактерий чувствительные к деформации клеточной стенки мембранные белки входят в состав сенсорно-регуляторных систем, передающих механосигналы к генетическому аппарату клетки (Otto, Silhavy, 2002).

У *Escherichia coli* двухкомпонентная сенсорно-регуляторная система СrxA/СrxR воспринимает разнообразную пертурбации оболочки. Получая сигнал из периплазмы, гистидинкиназа СrxA фосфорилирует цитоплазматический регулятор ответа СrxR, включающий транскрипцию контролируемых генов (Ruiz, Silhavy, 2005). Прикрепление к гидрофобной поверхности активирует зависимую от СrxR транскрипцию генов (Otto, Silhavy, 2002). Мутанты по гену *сrxA* нечувствительны к контактам, следовательно, гистидинкиназа СrxA может воспринимать сигнал, индуцируемый при прикреплении бактерий к поверхности. Для соответствующей активации системы Сrx необходим белок NlpE. Предполагается, что NlpE может быть сенсором поверхности, а состояние этого белка “считывается” системой Сrx. Неизвестно, как сила адгезии влияет на NlpE и активирует опосредуемую СrxA передачу сигнала. Возможно, что контакт с поверхностью индуцирует изменения конформации NlpE, а СrxA воспринимает эти изменения как появление белка с неправильным фолдингом (Otto, Silhavy, 2002).

Роль сенсорно-регуляторной системы СrxA/СrxR в восприятии сигнала, индуцируемого при прикреплении бактерий к поверхности, была оспорена

(Kimkes, Heinemann, 2018). В работе Kimkes и Heinemann (2018) не удалось обнаружить активации Сrx-системы при контакте бактерий с поверхностью как на клеточном уровне, так и в случае популяции. Однако при сравнении этого исследования с другими работами (Otto, Silhavy, 2002; Shimizu et al., 2016) можно отметить ряд методологических различий, которые затрудняют окончательную трактовку роли NlpE–СrxA/СrxR в зондировании поверхности. Очевидно, что противоречивые выводы (Otto, Silhavy, 2002; Shimizu et al., 2016; Kimkes, Heinemann, 2018) указывают на необходимость дальнейшего изучения участия NlpE–СrxA/СrxR в ответе бактерий на прикрепление к поверхности.

Система Сrx обнаружена у многих грамотрицательных бактерий и, кроме поддержания состояния белков периплазмы, регулирует вирулентность и ряд других фенотипических характеристик (Raivio, 2005; Vogt, Raivio, 2012). Например, при контакте с гидрофобными поверхностями энтерогеморрагических (ЕНЕС) штаммов *E. coli* система NlpE–Сrx регулирует работу системы секреции III типа (Shimizu et al., 2016).

МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ, ОПОСРЕДОВАННАЯ ПИЛЯМИ

Механосенсорные функции, по-видимому, могут выполнять пили I и IV типов. Гетерополимерные пили I типа опосредуют адгезию бактерий на субстратах (Busch, Waksman, 2012). Пили IV типа – длинные тонкие органеллы, попеременно вытягивающиеся и сжимающиеся за счет полимеризации и деполимеризации субъединиц белка-пилина. Они определяют тянущую подвижность бактерий и формирование их микроколоний на поверхностях (McCallum et al., 2017). У *E. coli* адгезивная субъединица FimH пилей I типа, по-видимому, может воспринимать силу сдвига, что приводит к усилению адгезии бактерий к поверхности (Thomas et al., 2002).

У *P. aeruginosa* ассоциированный с поверхностью адгезин PilY1 необходим для биосинтеза пилей и для прикрепления бактерий к поверхности клеток эукариот, а также, предположительно, участвует в регуляции роения псевдомонад. В 2014 г. было показано, что PilY1 может выполнять функции бактериального механосенсора. Оказалось, что наряду с минорными пилинами PilW и PilX, PilY1 необходим для вирулентности, индуцируемой контактом с поверхностью. Мутантные по генам других пилинов псевдомонады были дефектны по синтезу пилей, но сохраняли вирулентность, что свидетельствует об участии PilY1, PilW и PilX в регуляции вирулентности, независимой от синтеза пилей. С помощью направленного мутагенеза было доказано участие PilY1 в регуляции вирулентности бактерий, хотя и непонятно, обязана

ли эта регуляция механосенсингу (Siryaporn et al., 2014).

Основным структурным компонентом пилей IV типа являются субъединицы белка-пилина PilA. Полимеризация и деполимеризация мономеров PilA регулируется, соответственно, моторами PilB и PilT (Burrows, 2012). Индуцируемое контактом с поверхностью увеличение содержания сАМР зависит от пилина PilA, что предполагает участие пилей IV типа в восприятии контакта *P. aeruginosa* с поверхностью (Luo et al., 2015; Persat et al., 2015). Мутации в моторах PilB и PilT, а также прикрепление к менее плотным поверхностям снижали выраженность механоответов (Persat et al., 2015). Исследования на изолированных пиях IV типа показали, что их нити могут менять конформацию под воздействием натяжения (Biais et al., 2010; Beaussart et al., 2014), что, возможно, запускает каскад бактериальных реакций на механическое воздействие (Persat, 2017).

При контакте *P. aeruginosa* с поверхностями фактор транскрипции Vfr выступает как позитивный регулятор систем секреции III типа и тянущей подвижности, определяемой пиями, и как негативный регулятор роения. Транскрипцию гена, кодирующего Vfr, активирует вторичный мессенджер циклический аденозинмонофосфат (сАМР). Уровень экспрессии зависимых от Vfr генов повышен в колониях, растущих на твердых поверхностях, и подавлен в планктонных клетках. С использованием флуоресцентного репортера транскрипции было доказано, что активация зависимых от сАМР/Vfr ответов при контакте с поверхностью действительно является ответом на механическое воздействие. Этот ответ зависит от активности мотора пилей IV типа и от передачи сигналов через сенсорную систему Chp. Система Chp гомологична Che-системе хемотаксиса *E. coli*. Метил-акцептирующий белок PilJ, являющийся сенсором внешних стимулов, контролирует уровень фосфорилирования гистидинкиназы ChpA и соответствующего ей регулятора ответа PilG (Wolfgang et al., 2003; Whitchurch et al., 2004; Michel et al., 2011; Luo et al., 2015; Persat et al., 2015).

УЧАСТИЕ ЖГУТИКОВ В ВОСПРИЯТИИ МЕХАНИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Жгутики бактерий – более крупные, чем пили, двигательные органеллы, также принимают участие в восприятии механических воздействий. Бактериальные жгутики давно являются популярным объектом исследований молекулярных биологов, тем не менее, интерес к их изучению только усиливается. До сих пор продолжают обнаруживаться новые факты о строении и разнообразии функций этих органелл. Например, у флагеллина и нативных жгутиков разных видов

бактерий недавно была выявлена протеолитическая активность (Eckhard et al., 2017).

Бактериальные жгутики состоят из трех основных частей: базальное тело, крюк и филамент, которые синтезируются в таком же порядке. Выделяют три основные группы флагеллярных генов, последовательно экспрессируемых с промоторов разного типа: (1) гены активаторов транскрипции флагеллярных генов, (2) гены компонентов базального тела (белковых MS-, C-, P-, L-колец, системы секреции III типа, стержня) и крюка и (3) гены белка, кэпирующего филамент, и гены флагеллинов. У наиболее хорошо изученных гаммапротеобактерий *E. coli* и *Salmonella enterica* с перитрихальным жгутикованием около 50 регуляторных и структурных генов нужны для сборки и работы жгутиков. Экспрессия флагеллярных генов и процесс сборки жгутиков находятся под многоуровневым регуляторным контролем, реагирующим на разнообразные сигналы и имеющим свою специфику у разных классов, родов и видов бактерий (Brutinel, Yahr, 2008; Chevance, Hughes, 2008; Smith, Hoover, 2009; Patrick, Kearns, 2012; Tsang, Hoover, 2014; Altegoer, Bange, 2015; Osterman et al., 2015).

Базальное тело, выполняющее функции якоря жгутика в оболочке клетки, мотора и экспортной машины, включает несколько кольцевых белковых комплексов, стержень и систему секреции III типа. Эта система секреции экспортирует нужные белки через центральный канал жгутика в процессе его сборки (Minamino, 2014). Экспрессия флагеллярных генов скоординирована с активностью системы секреции III типа. В результате секреторируемые субстраты появляются только в нужный момент сборки жгутика, а транскрипция более ранних флагеллярных генов подавляется (Brutinel, Yahr, 2008). Экспрессия поздних жгутиковых генов подавляется до завершения сборки базального тела, что способствует сохранению энергетических ресурсов (Brutinel, Yahr, 2008).

Вращение бактериальных жгутиков обеспечивается работой мотора, располагающегося у основания жгутика в цитоплазматической мембране и, как все моторы, состоящего из ротора и статора (статор образуют Mot-белки). Мотор приводится в движение, в зависимости от организма и типа жгутика, потоком ионов водорода или ионов натрия через плазматическую мембрану; гидролиз АТФ для вращения жгутиков бактерий не требуется. Вращающаяся часть мотора состоит из набора колец, пронизывающих оболочку клетки и включающих несколько сотен молекул более 10 разных белков. Мотор может вращаться в разном направлении, обеспечивая или поступательное движение клетки, или ее кувырок и переориентацию в пространстве. О том, что комплекс статоров жгутика может воспринимать механические воздей-

ствия на жгутик и отвечать на них, свидетельствует увеличение количества статорных единиц в ответ на повышение нагрузки на жгутик (Lele et al., 2013).

Существующие гипотезы, каким образом жгутики опосредуют реакцию бактерий на изменение плотности среды, предполагают, что какие-то сигналы ингибируют работу мотора жгутика.

Так, мутации в генах *fliL*, *fliF* и *fliG* патогенной бактерии *Pr. mirabilis*, кодирующих компоненты базального тела жгутика, приводят к дифференциации ее клеток к роящемуся фенотипу в неподходящих для роения жидких средах и к образованию супердлинных клеток на плотной среде; кроме того, повышается вирулентность бактерий. Ген *fliL* входит в состав оперона *fliLMNOPQR*, включающего также белки переключателя ротора жгутика и белки аппарата экспорта. На основании подробной характеристики *fliL* мутантов *Pr. mirabilis* был сделан вывод о необходимости FliL для перехода бактерий к роению и для экспрессии генов вирулентности. Предполагается, что небольшой (17–18 кДа) белок FliL с неясной функцией ассоциирован с базальным телом. Сформулировано предположение о том, что *Pr. mirabilis* определяет свою локализацию в окружающей среде или в организме хозяина в результате оценки статуса моторов жгутиков, который (статус) контролирует экспрессию генов роения и вирулентности (Belas, Suvanasthi, 2005).

Последующий анализ транскрипта *fliL* мутанта *Pr. mirabilis* показал, что почти все флагеллярные гены (2) и (3) классов и гены хемотаксиса у него репрессированы. Дополнительные данные позволили авторам предположить, что в восприятии механических воздействий участвует С-конец FliL, а регулятор роящихся клеток UmoA является частью сигнального реле, ведущего к флагеллярному мастер-оперону протей (Cusick et al., 2012).

Позже были получены данные о возможной вовлеченности FliL в контроль потока протонов, когда мотор находится в условиях высокого крутящего момента. Участие FliL в этом контроле, по мнению авторов, может осуществляться через взаимодействие FliL с каким-то из белков мотора, возможно, MotB. Авторы высказали предположение о том, что бактерия может чувствовать изменение в протондвижущей силе, мембранном потенциале или градиенте pH, если вращение жгутиков ингибируется при контакте с поверхностью. Этот “поверхностный” сигнал затем запускает переход бактерий к роению через сигнальный путь, включающий белки UmoA, UmoD и Rsc и приводящий к увеличению экспрессии флагеллярного мастер-оперона (Lee, Belas, 2015). У протей и ряда других бактерий это мастер-оперон *flhDC*, отсутствующий у альфапротеобактерий. Другие исследования показали, что описанная выше мо-

дель участия белка FliL в обеспечении бактериального механоответа применима далеко не ко всем бактериям (Chawla et al., 2017).

При изучении мутантов грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* по *motB* гену жгутикового статора также выявлена возможная механосенсорная роль жгутиков. Ингибирование подвижности жгутика связыванием с поликлональными антителами, как и делеция гена *motB*, запускали процесс формирования биопленки. Механоответ *B. subtilis* зависит от сенсорно-регуляторной системы DegS/DegU. Цитоплазматическая сенсорная гистидинкиназа DegS фосфорилирует регулятор ответа DegU в ответ на внешний сигнал. Фосфорилированный регулятор ответа DegU активирует гены компонентов матрикса биопленок. По-видимому, DegS воспринимает сигнал, генерируемый при подавлении вращения жгутиков посредством пока непонятого механизма (Cairns et al., 2013).

Предложена также модель участия филамента жгутика *Salmonella typhimurium* совместно с регулятором морфогенеза жгутиков FlgM в восприятии внешних сигналов, в частности, пониженной влажности (и ингибирования роста филамента при этом) (Wang et al., 2005). FlgM транскрибируется с промоторов класса (2) и, преимущественно, класса (3). В первом случае FlgM в основном остается в клетке, во втором – секретируется из нее. Авторы предполагают, что основное назначение экскреции FlgM, экспрессируемого с промоторов класса (3), – тестирование, благоприятны ли внешние условия для опосредуемой жгутиками подвижности. Это особенно важно в случае поверхностей, уровень увлажнения которых критичен для движения. Авторы спекулируют, что условия поверхности, способствующие облегченной секреции FlgM, могут сигнализировать клеткам, что можно увеличивать количество жгутиковых филаментов за счет транскрипции поздних флагеллярных генов с промоторов (3) класса. В их модели, родившейся в результате изучения дефектных по роению *che*-мутантов сальмонелл (хотя роение не зависит от собственно хемотаксиса), сенсором свойств поверхности является филамент жгутика (Wang et al., 2005).

Vibrio cholerae также может использовать жгутик в качестве механосенсора: при контакте с твердой средой остановка мотора и замирание потока ионов через мотор приводили к увеличению мембранного потенциала и инициации формирования биопленки (Van Dellen et al., 2008).

У *Vibrio parahaemolyticus*, морской патогенной бактерии со смешанным жгутикованием, замедление или блокирование вращения полярного жгутика запускает сборку латеральных жгутиков, необходимых для роения по поверхностям, а также экспрессию генов колонизации хозяина и ви-

рулентности. Делеция гена жгутикового статора *motB* или флагеллина *flaC* также приводит к конститутивной транскрипции генов роения, возможно, в результате ложного “впечатления” мутантных бактерий о контакте с поверхностью (McCarter et al., 1988; Kawagishi et al., 1996).

Как некоторые другие виды бактерий, бактерии видов *A. brasilense* и *A. baldaniorum* могут продуцировать два вида жгутиков: одиночный полярный (Fla) конститутивно и многочисленные латеральные (Laf) — только при повышенной плотности среды (например, в присутствии в среде от 0.4% агара и выше; Petrova et al., 2020). В жидкостях азоспириллы быстро плавают за счет работы Fla, на вязких и полужидких средах роятся. Как и у штамма *A. brasilense* Sp7, Fla штамма *A. baldaniorum* Sp245 (ранее *A. brasilense*; Dos Santos Ferreira et al., 2020) покрыт полисахаридным чехлом, а флагеллин Fla гликозилирован (Moens et al., 1995; Бурыгин и соавт., 2007).

Для ряда бактерий со смешанным жгутиковым выскazyвались предположения о контроле Laf-системы со стороны Fla-системы (McCarter et al., 1988; Kawagishi et al., 1996; Moens et al., 1996). В случае штамма *A. brasilense* Sp7 экспрессия структурного гена *laf1* флагеллина латеральных жгутиков индуцировалась в условиях затруднения вращения Fla (на плотных средах или в жидкостях, содержащих антифлагеллиновые поликлональные антитела) (Moens et al., 1996). С другой стороны, были получены инсерционные нероящиеся мутанты *A. baldaniorum* Sp245 и *Rhodospirillum centenum* SW (бактерии из того же семейства *Rhodospirillaceae*, что и азоспириллы), которые по-прежнему продуцировали индуцибельные Laf при повышенной плотности среды, хотя их Fla был парализован или отсутствовал (Jiang et al., 1998; Scheludko et al., 1998). Таким образом, сигнал, используемый азоспириллами для индукции сборки Laf, по-видимому, более сложен, чем просто трудности во вращении Fla. Поскольку названные мутанты азоспирилл и родоспирилл не роились, функциональный Fla, возможно, осуществляющий координацию Laf и правильное формирование пучка жгутиков, по-видимому, также необходим для роения азоспирилл и *R. centenum* по поверхности полужидких сред (Jiang et al., 1998; Scheludko et al., 1998; McClain et al., 2002).

В отличие от нероящихся Fla-минус мутантов *A. baldaniorum* Sp245 и *R. centenum* SW, Fla-минус мутанты гаммапротеобактерий *V. parahaemolyticus* и *Aeromonas hydrophila* не утрачивают способность роиться с помощью Laf (McCarter et al., 1988). Также, при попадании штаммов дикого типа в жидких на плотные среды, клетки бактерий видов *A. baldaniorum*, *A. brasilense*, *Aer. hydrophila* и *Aer. caviae* удлиняются незначительно (Moens

et al., 1995, 1996; Scheludko et al., 1998) по сравнению с удлиняющимися в несколько раз клетками, например, *V. parahaemolyticus* (McCarter, 1999). Таким образом, процессы клеточной дифференциации на поверхностях и характер взаимодействия между Fla и Laf системами у разных бактерий имеют свои отличительные черты.

РОЛЬ В ИЗМЕНЕНИИ ОБРАЗА ЖИЗНИ БАКТЕРИЙ ВТОРИЧНОГО МЕССЕНДЖЕРА ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА (c-di-GMP)

Существенную роль в изменении образа жизни бактерий и их переходе, например, от планктонного к прикрепленному существованию или к роению по поверхностям, играет такой вторичный мессенджер, как циклический дигуанозинмонофосфат (c-di-GMP) (Jenal, 2004; Roemling et al., 2005).

Синтез c-di-GMP из двух молекул GTP осуществляют бактериальные дигуанилатциклазы, содержащие домен GGDEF (Paul et al., 2004), а гидролизуют c-di-GMP фосфодиэстеразы, для которых характерно наличие домена EAL или HD-GYP (Christen et al., 2005; Ryan et al., 2006). Активность этих ферментов изменяется под действием разнообразных внешних и внутренних сигналов, что приводит к изменению концентрации c-di-GMP в клетке и, в итоге, к значительным изменениям фенотипа бактерий, например, к их переходу от одиночного плавания к жизни в многоклеточной биопленке (Jenal, Malone, 2006; Cotter, Stibitz, 2007; Monds et al., 2007; Newell et al., 2009; Hengge, 2009; Valentini, Filloux, 2016; Rodesney et al., 2017). Однако предстоит еще многое узнать о том, каким именно образом механические и иные воздействия вызывают флуктуации в концентрации c-di-GMP и других вторичных мессенджеров в клетках (Petrova, Sauer, 2012; Siryaporn et al., 2014; Luo et al., 2015). Одна из моделей предполагает, что изменения силы адгезии, которая связывает бактерии с поверхностью, или скорости потоков жидкости, омывающие клетки, связанные с поверхностью, приводит к изменению концентрации c-di-GMP в клетках и, в итоге, к переходу бактерий от одиночного плавания к жизни в многоклеточной биопленке (Rodesney et al., 2017). Высокий уровень c-di-GMP снижает синтез и/или активность жгутиков и стимулирует продукцию бактериями различных адгезинов и экзополисахаридов, являющихся компонентами матрикса биопленок (Hengge, 2009). Низкий уровень клеточного c-di-GMP характерен для планктонных свободно плавающих бактерий (Valentini, Filloux, 2016). На модельных штаммах *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Caulobacter crescentus* получены данные, доказывающие зависимость синтеза c-di-GMP от активности жгутикового мотора (Hershey, 2021). Воздействие механических сил на

активность жгутика или мутации по генам его мотора вызывают у бактерий реакции, влияющие на продукцию с-di-GMP (Hershey, 2021).

МЕХАНООТВЕТЫ

Ощущая механические нагрузки, бактерии формируют механоответ, модулируя разнообразные программы развития и поведения. Контакты с поверхностями опосредуют регуляцию вирулентности бактерий (Belas, Suvanasthi, 2005; Raivio, 2005; Vogt, Raivio, 2012; Siryaporn et al., 2014), запуск процесса формирования биопленок (Jenal, Malone, 2006; Cotter, Stibitz, 2007; Monds et al., 2007; Van Dellen et al., 2008; Newell et al., 2009; Hengge, 2009; Cairns et al., 2013; Valentini, Filloux, 2016; Rodesney et al., 2017). Изменение размера клеток, характера их жгутикования и переход от свободного плавания к роению происходит у микробов, попадающих из жидкости на биотические/абиотические вязкие/гелеобразные или плотные поверхности (Jiang et al., 1998; McCarter et al., 1988; Moens et al., 1995; Kawagishi et al., 1996; Moens et al., 1996; Scheludko et al., 1998; McCarter, 1999; McClain et al., 2002; Belas, Suvanasthi, 2005; Bible et al., 2008; Eloe et al., 2008; Wang F. et al., 2008; Chawla et al., 2017; Petrova et al., 2020).

Индивидуальные или групповые отклики бактерий на изменение механических сил и свойств окружения не ограничиваются перечисленными и кратко охарактеризованными в обзоре выше механоответами.

У морской восстанавливающей металлы бактерии *Shewanella oneidensis* пилей IV типа и жгутики опосредуют механосенсинг (Dufrêne, Persat, 2020). Изменение размера и деления клеток *She. oneidensis*, контактирующих с поверхностью, и планктонных отличаются (Dufrêne, Persat, 2020). Рост клеток прикрепленных мутантов *She. oneidensis* без пилей IV типа и жгутиков подобен темпам роста планктонных бактерий (Lee et al., 2016), это позволило отметить важную роль этих органелл в восприятии механических стимулов окружающей среды (Dufrêne, Persat, 2020). Глубоководные микроорганизмы сталкиваются с силами, создаваемыми высоким гидростатическим давлением. При переходе от низкого давления к условиям роста при высоком давлении глубоководные микроорганизмы претерпевают фенотипические изменения, которые не ограничиваются подвижностью, которую обсуждали выше (Bartlett et al., 1989; Eloe et al., 2008; Wang F. et al., 2008). По мере увеличения давления изменяются белковый и липидный составы внешней мембраны, уменьшается ее текучесть и увеличивается жесткость (Bartlett et al., 1989).

Адгезивная субъединица FimH пилей I типа *E. coli* воспринимает силу гидродинамического

сдвига, что приводит к усилению адгезии бактерий к поверхности (Thomas et al., 2002). У стельчатых бактерий *Caulobacter crescentus* контакт с поверхностью стимулирует синтез полисахаридов, позволяющих клеткам необратимо прикрепляться к твердому субстрату (Li et al., 2012). Пили и вращающийся жгутик совместно опосредуют этот ответ *C. crescentus* (Li et al., 2012; Hug et al., 2017; Dufrêne, Persat, 2020). Аналогично это происходит у *Asticcacaulis biprosthecum*, *Agrobacterium tumefaciens* и *P. aeruginosa*, что позволяет одиночным планктонным клеткам быстро адаптироваться к прикрепленному образу жизни и образованию биопленок (Dufrêne, Persat, 2020). *B. subtilis* реагирует на прикрепление к поверхности и торможение вращения жгутиков активацией двухкомпонентной системы передачи сигналов DegS–DegU, способствующих транскрипции генов экзополимера поли- γ -dl-глутаминовой кислоты, являющейся компонентом матрикса биопленки (Cairns et al., 2013). Ряд бактериальных белков имеют амилоидобразующие последовательности аминокислот. Амилоиды обнаружены в биопленках, сформированных бактериями различных систематических групп (Blanco et al., 2012). Амилоидные структуры образуют каркас пленок, опосредуют адгезию к поверхностям или тканям и устойчивость биопленок к различным воздействиям окружающей среды (Larsen et al., 2007; Romero et al., 2010; Blanco et al., 2012). Действие механических сил может способствовать агрегации амилоидных адгезинов у *E. coli* и *B. subtilis* (Dufrêne, Persat, 2020).

В биопленках матрикс, служащий структурным каркасом, характеризуется вязкоупругостью (Flemming, Wingender, 2010; Douarche et al., 2015; Jana et al., 2020). Матрикс демонстрирует противоположные механические свойства (вязкий/упругий) в ответ на воздействие периодических или регулярных сил гидродинамического сдвига и в течение жизненного цикла биопленок (Jana et al., 2020). Бактерии в биопленках генотипически, физиологически и фенотипически гетерогенны (Stewart et al., 2008; Serra et al., 2014; Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2020; Jana et al., 2020; Røder et al., 2020). Рост бактерий может вызывать механический стресс внутри биопленки, деформируя матрикс, что создает механическое напряжение и сказывается на ориентации клеток в сообществе (Douarche et al., 2015). Относительное расположение отдельных бактерий определяет их взаимодействие между собой, в том числе, и в биопленках, в которых они разделены между собой на расстояние меньше микрометра (Nadel et al., 2016; Tropini et al., 2017). Например, пространственная организация влияет на то, как отдельные клетки воспринимают сигнальные молекулы, такие как аутоиндукторы, питательные вещества или противомикробные факторы (Mukherjee et al., 2019). В многовидовых биопленках расположение бак-

терий также влияет на межвидовые социальные взаимодействия, в конечном итоге определяет, конкурируют ли штаммы или сотрудничают (Nadel et al., 2016).

Нагрузка со стороны окружающей среды, такая как гидродинамический сдвиг, с которым бактерии сталкиваются в процессе формирования биопленок, может влиять на свойства зрелых пленок, например, повышать эластичность и прочность белков и полисахаридов матрикса (Herbert-Guillou et al., 2001; Lemos et al., 2015; Araujo et al., 2016). Механические силы, создаваемые потоками жидкости, помимо воздействия на транспорт различных сигналов и питательных веществ могут повредить матрицу пленок, доставлять новые бактерии к биопленкам или способствовать распространению клеток из них, тем самым влияя на видовой состав популяции, а также динамику распространения бактериальных видов (Kaplan, 2004; Sauer, 2004).

В этот обзор мы включили лишь небольшую часть обширной литературы о восприятии бактериями механической нагрузки. Простая модель реакции микроорганизмов на изменение механических свойств среды/окружения состоит из последовательности трех элементарных событий: механоотсиссии, механочувствительности и механоответа (Iskratsch et al., 2014; Persat, 2017). Контакт бактерий с поверхностью и/или гидродинамический сдвиг создают силы, которые механически передаются либо через активные органеллы, такие как подвижные пилы IV типа и жгутики (механически исследуют окружающую среду), либо пассивные компоненты, такие как внешняя мембрана, которая деформируется под механической нагрузкой. Они связаны с сенсорными системами, действующими как механочувствительные компоненты. Эту роль могут выполнять хемосенсорные системы. В конечном итоге последовательность перечисленных событий приводит к механоответам. Определенную роль в изменении образа жизни бактерий и их переходе, например, от планктонного к прикрепленному существованию или к роению по поверхностям, играет вторичный мессенджер c-di-GMP (Jenal, 2004; Roemling et al., 2005). Необходимо отметить, что механоотчеты разнообразны, бактериальные клетки изменяют морфологию, модулируют подвижность, активируют вирулентность или иницируют образование биопленок. Подобные реактивные изменения в бактериальном фенотипе, интересные для фундаментальной науки, также имеют экологическую, медицинскую, сельскохозяйственную, биотехнологическую значимость. Поэтому весьма заманчиво научиться подавлять опасные или стимулировать практически полезные механоотчеты микробов. Так идентификация механического стресса, как сигнала, ведущего к развитию биопленки, указывает на актуальность подхода к

конструированию поверхностей, которые являются не только бактерицидными, но и сопротивляются прикреплению бактерий или не создают механического напряжения (Salwiczek et al., 2014; MacCallum et al., 2015).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность д. б. н. профессору Е.И. Кацы за разработку концепции анализа литературных данных и направления исследований в области механосенсинга и механотрансдукции бактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00006-а (“Генетические аспекты механочувствительности альфапротеобактерий со смешанным жгутикованием *Azospirillum brasilense*”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались животные или участвовали люди.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурьгин Г.Л., Широков А.А., Шелудько А.В., Кацы Е.И., Щеголев С.Ю., Матора Л.Ю. Выявление чехла на поверхности полярного жгутика *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 822–829.
- Burygin G.L., Shirokov A.A., Shelud'ko A.V., Katsy E.I., Shchygolev S.Yu., Matora L.Yu. Detection of a sheath on *Azospirillum brasilense* polar flagellum // Microbiology (Moscow). 2007. V. 76. P. 728–734.
- Остерман И.А., Дикхтяр Ю.Ю., Богданов А.А., Донцова О.А., Сергеев П.В. Регуляция экспрессии генов бактериальной флагеллы // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 1662–1672.
- Osterman I.A., Dikhtyar Y.Y., Bogdanov A.A., Dontsova O.A., Sergiev P.V. Regulation of flagellar gene expression in bacteria // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 1447–1456.
- Шелудько А.В., Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Филиппьева Ю.А., Буров А.М., Петрова Л.П., Пономарева Е.Г., Кацы Е.И. Анализ ультраструктуры клеток в составе биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 59–73.
- Shelud'ko A.V., Mokeev D.I., Evstigneeva S.S., Filip'cheva Yu.A., Burov A.M., Petrova L.P., Ponomareva E.G., Katsy E.I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 50–63.
- Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 696–704.

- Shelud'ko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Y., Katsy E.I.* Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility // *Microbiology (Moscow)*. 2010. V. 79. P. 688–695.
- Altegoer F., Bange G.* Undiscovered regions on the molecular landscape of flagellar assembly // *Curr. Opin. Microbiol.* 2015. V. 28. P. 98–105.
- Araújo P.A., Malheiro J., Machado I., Mergulhão F., Melo L., Simões M.* Influence of flow velocity on the characteristics of *Pseudomonas fluorescens* biofilms // *J. Environ. Eng.* 2016. V. 142. P. 04016031-1–04016031-8.
- Bartlett D., Wright M., Yayanos A.A., Silverman M.* Isolation of a gene regulated by hydrostatic pressure in a deep-sea bacterium // *Nature*. 1989. V. 342. P. 572–574.
- Beaussart A., Baker A.E., Kuchma S.L., El-Kirat-Chatel S., O'Toole G.A., Dufrière Y.F.* Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili // *ACS Nano*. 2014. V. 8. P. 10723–10733.
- Belas R.* Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria // *Trends Microbiol.* 2014. V. 22. P. 517–527.
- Belas R., Suvanasuthi R.* The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 6789–6803.
- Berg H.C.* Bacterial behaviour // *Nature*. 1975. V. 254. P. 389–392.
- Biais N., Higashi D.L., Brujic J., So M., Sheetz M.P.* Force-dependent polymorphism in type IV pili reveals hidden epitopes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 11358–11363.
- Bible A.N., Stephens B.B., Ortega D.R., Xie Z., Alexandre G.* Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. P. 6365–6375.
- Blanka A., Düvel J., Dötsch A., Klinkert B., Abraham W.-R., Kaever V., Ritter C., Narberhaus F., Häussler S.* Constitutive production of c-di-GMP is associated with mutations in a variant of *Pseudomonas aeruginosa* with altered membrane composition // *Sci. Signal*. 2015. V. 8. P. ra36.
- Blanco L.P., Evans M.L., Smith D.R., Badtke M.P., Chapman M.R.* Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids // *Trends Microbiol.* 2012. V. 20. P. 66–73.
- Bogino P.C., Oliva M.M., Sorroche F.G., Giordano W.* The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 15838–15859.
- Booth I.R.* Bacterial mechanosensitive channels: progress towards an understanding of their roles in cell physiology // *Curr. Opin. Microbiol.* 2014. V. 18. P. 16–22.
- Brutinel E.D., Yahr T.L.* Control of gene expression by type III secretory activity // *Curr. Opin. Microbiol.* 2008. V. 11. P. 128–133.
- Burrows L.L.* *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action // *Annu. Rev. Microbiol.* 2012. V. 66. P. 493–520.
- Busch A., Waksman G.* Chaperone-usheer pathways: diversity and pilus assembly mechanism // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2012. V. 367. P. 1112–1122.
- Cairns L.S., Marlow V.L., Bissett E., Ostrowski A., Stanley-Wall N.R.* A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2013. V. 90. P. 6–21.
- Chawla R., Ford K.M., Lele P.P.* Torque, but not FliL, regulates bacterial mechanosensitive flagellar motor-function // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 5565(1–9).
- Chawla R., Gupta R., Lele T.P., Lele P.P.* A skeptic's guide to bacterial mechanosensing // *J. Mol. Biol.* 2020. V. 432. P. 523–533.
- Chen Y., Harapanahalli A.K., Busscher H.J., Norde W., van der Mei H.C.* Nanoscale cell wall deformation impacts long-range bacterial adhesion forces on surfaces // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 637–643.
- Chevance F.F.V., Hughes K.T.* Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 455–465.
- Christen M., Christen B., Folcher M., Schauerte A., Jenal U.* Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 30829–30837.
- Cotter P.A., Stibitz S.* c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // *Curr. Opin. Microbiol.* 2007. V. 10. P. 17–23.
- Croes C.L., Moens S., van Bastelaere E., Vanderleyden J., Michiels K.W.* The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots // *J. Gen. Microbiol.* 1993. V. 139. P. 2261–2269.
- Cusick K., Lee Y.-Y., Youchak B., Belas R.* Perturbation of FliL interferes with *Proteus mirabilis* swarmer cell gene expression and differentiation // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. P. 437–447.
- Douarce C., Allain J.-M., Raspaud E.* *Bacillus subtilis* bacteria generate an internal mechanical force within a biofilm // *Biophys. J.* 2015. V. 109. P. 2195–2202.
- Dos Santos Ferreira N., Hayashi Sant'Anna F., Massena Reis V., Ambrosini A., Gazolla Volpiano C., Rothballer M., Schwab S., Baura V.A., Balsanelli E., Pedrosa F.O., Pereira Passaglia L.M., Maltempi de Souza E., Hartmann A., Cassan F., Zilli J.E.* Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 6203–6212.
- Dufrière Y.F., Persat A.* Mechanomicrobiology: how bacteria sense and respond to forces // *Nature Rev. Microbiol.* 2020. V. 18. P. 227–240.
- Eckhard U., Bandukwala H., Mansfield M.J., Marino G., Cheng J., Wallace I., Holyoak T., Charles T.C., Austin J., Overall C.M., Doxey A.C.* Discovery of a proteolytic flagellin family in diverse bacterial phyla that assembles enzymatically active flagella // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 521 (1–9).
- Ellison C., Brun Y.V.* Mechanosensing: a regulation sensation // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. P. R113–R115.
- Eloe E.A., Lauro F.M., Vogel R.F., Bartlett D.H.* The deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* ss9 utilizes separate flagellar systems for swimming and swarming under high-pressure conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 6298–6305.
- Fajardo-Cavazos P., Nicholson W.L.* Mechanotransduction in prokaryotes: a possible mechanism of spaceflight adaptation // *Life*. 2021. V. 11. P. 33–44.
- Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y.* Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2012. V. 326. P. 99–108.

- Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623–633.
- Guttenplan S.B., Kearns D.B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation // FEMS Microbiol. Rev. 2013. V. 37. P. 849–871.
- Harapanahalli A.K., Younes J.A., Allan E., van der Mei H.C., Busscher H.J. Chemical signals and mechanosensing in bacterial responses to their environment // PLoS Pathog. 2015. V. 11. P. e1005057 (1–6).
- Harshey R.M., Partridge J.D. Shelter in a swarm // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 3683–3694.
- Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2009. V. 7. P. 263–273.
- Herbert-Guillou D., Tribollet B., Festy D. Influence of the hydrodynamics on the biofilm formation by mass transport analysis // Bioelectrochem. 2001. V. 53. P. 119–125.
- Hershey D.M. Integrated control of surface adaptation by the bacterial flagellum // Curr. Opin. Microbiol. 2021. V. 61. P. 1–7.
- Houry A., Briandet R., Aymerich S., Gohar M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation // Microbiology (SGM). 2010. V. 156. P. 1009–1018.
- Hug I., Deshpande S., Sprecher K.S., Pfohl T., Jenal U. Second messenger-mediated tactile response by a bacterial rotary motor // Science. 2017. V. 358. P. 531–534.
- Iskratsch T., Wolfenson H., Sheetz M.P. Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014. V. 15. P. 825–833.
- Jana S., Charlton S.G.V., Eland L.E., Burgess J.G., Wipat A., Curtis T.P., Chen J. Nonlinear rheological characteristics of single species bacterial biofilms // NPJ Biofilms Microbiomes. 2020. V. 6. Art. 19. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0126-1>
- Jenal U. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. P. 185–191.
- Jenal U., Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria // Annu. Rev. Genet. 2006. V. 40. P. 385–407.
- Jiang Z.Y., Rushing B.G., Bai Y., Gest H., Bauer C.E. Isolation of *Rhodospirillum centenum* mutants defective in phototactic colony motility by transposon mutagenesis // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 1248–1255.
- Kaplan J.B., Velliyagounder K., Ragunath C., Rohde H., Mack D., Knobloch J.K., Ramasubbu N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 8213–8220.
- Kawagishi I., Imagawa M., Imae Y., McCarter L., Homma M. The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression // Mol. Microbiol. 1996. V. 20. P. 693–699.
- Kimkes T.E.P., Heinemann M. Reassessing the role of the *Escherichia coli* CpxAR system in sensing surface contact // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0207181.
- Kuchma S.L., Griffin E.F., O'Toole G.A. Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 5388–5403.
- Larsen P., Nielsen J.L., Dueholm M.S., Wetzel R., Otzen D., Nielsen P.H. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 3077–3090.
- Lee C.K., Kim A.J., Santos G.S., Lai P.Y., Lee S.Y., Qiao D.F., Anda J.D., Young T.D., Chen Y., Rowe A.R., Nealson K.H., Weiss P.S., Wong G.C.L. Evolution of cell size homeostasis and growth rate diversity during initial surface colonization of *Shewanella oneidensis* // ACS Nano. 2016. V. 10. P. 9183–9192.
- Lee Y.-Y., Belas R. Loss of FliL alters *Proteus mirabilis* surface sensing and temperature-dependent swarming // J. Bacteriol. 2015. V. 197. P. 159–173.
- Lele P.P., Hosu B.G., Berg H.C. Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 11839–11844.
- Lemos M., Mergulhao F., Melo L., Simoes M. The effect of shear stress on the formation and removal of *Bacillus cereus* biofilms // Food Bioprod. Process. 2015. V. 93. P. 242–248.
- Li G., Brown P.J.B., Tang J.X., Xu J., Quardokus E.M., Fuqua C., Brun Y.V. Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins // Mol. Microbiol. 2012. V. 83. P. 41–51.
- López D., Vlamakis H., Kolter R. Biofilms // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. V. 2. P. a000398 (1–11).
- Luo Y., Zhao K., Baker A.E., Kuchma S.L., Coggan K.A., Wolfgang M.C., Wong G.C., O'Toole G.A. A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors // mBio. 2015. V. 6. P. e02456-14 (1–11).
- MacCallum N., Howell C., Kim P., Sun D., Friedlander R., Ranisau J., Ahanotu O., Lin J.J., Vena A., Hatton B., Wong T.-S., Aizenberg J. Liquid-infused silicone as a biofouling-free medical material // ACS Biomater. Sci. Eng. 2015. V. 1. P. 43–51.
- McCallum M., Tammam S., Khan A., Burrows L.L., Howell P.L. The molecular mechanism of the type IVa pilus motors // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 15091 (1–10).
- McCarter L. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 1. P. 51–57.
- McCarter L., Hilmen M., Silverman M. Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus* // Cell. 1988. V. 54. P. 345–351.
- McClain J., Rollo D.R., Rushing B.G., Bauer C.E. *Rhodospirillum centenum* utilizes separate motor and switch components to control lateral and polar flagellum rotation // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 2429–2438.
- Michel G.P.F., Aguzzi A., Ball G., Soscia C., Bleves S., Voulhoux R. Role of *fimV* in type II secretion system-dependent protein secretion of *Pseudomonas aeruginosa* on solid medium // Microbiology (SGM). 2011. V. 157. № 7. P. 1945–1954.
- Minamino T. Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1843. P. 1642–1648.
- Monds R.D., Newell P.D., Gross R.H., O'Toole G.A. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA // Mol. Microbiol. 2007. V. 63. P. 656–679.
- Moens S., Michiels K., Vanderleyden J. Glycosylation of the flagellin of the polar flagellum of *Azospirillum brasilense*, a Gram-negative nitrogen-fixing bacterium // Microbiology (SGM). 1995. V. 141. P. 2651–2657.

- Moens S., Schloter M., Vanderleyden J. Expression of the structural gene, *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella in *Azospirillum brasilense* Sp7 // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 5017–5019.
- Mukherjee S., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 371–382.
- Nadell C.D., Drescher K., Foster K.R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms // Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14. P. 589–600.
- Newell P.D., Monds R.D., O'Toole G.A. LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 3461–3466.
- Ohashi K., Fujiwara S., Mizuno K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction // J. Biochem. 2017. V. 161. P. 245–254.
- Otto K., Silhavy T.J. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 2287–2292.
- Patrick J.E., Kearns D.B. Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis // Mol. Microbiol. 2012. V. 83. P. 14–23.
- Paul R., Weiser S., Amiot N.C., Chan C., Schirmer T., Giese B., Jenal U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 715–727.
- Persat A., Inclan Y.F., Engel J.N., Stone H.A., Gitai Z. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 7563–7568.
- Persat A. Bacterial mechanotransduction // Curr. Opin. Microbiol. 2017. V. 36. P. 1–6.
- Petrova O.E., Sauer K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 2413–2425.
- Petrova L.P., Yevstigneyeva S.S., Borisov I.V., Shelud'ko A.V., Burygin G.L., Katsy E.I. Plasmid gene AZOBR_p60126 impacts biosynthesis of lipopolysaccharide II and swarming motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 // J. Basic Microbiol. 2020. V. 60. P. 613–623.
- Raivio T.L. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis // Mol. Microbiol. 2005. V. 56. P. 1119–1128.
- Røder H.L., Olsen N.M.C., Whiteley M., Burmølle M. Unravelling interspecies interactions across heterogeneities in complex biofilm communities // Environ. Microbiol. 2020. V. 22. P. 5–16.
- Rodesney C.A., Roman B., Dhamani N., Cooley B.J., Katira P., Touhami A., Gordon V.D. Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 5906–5911.
- Romero D., Aguilar C., Losick R., Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 2230–2234.
- Römling U., Gomelsky M., Galperin M.Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system // Mol. Microbiol. 2005. V. 57. P. 629–639.
- Ruiz N., Silhavy T.J. Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope // Curr. Opin. Microbiol. 2005. V. 8. P. 122–126.
- Ryan R.P., Fouhy Y., Lucey J.F., Crossman L.C., Spiro S., He Y.-W., Zhang L.-H., Heeb S., Cámara M., Williams P., Dow J.M. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 6712–6717.
- Salwiczek M., Qu Y., Gardiner J., Strugnell R.A., Lithgow T., McLean K.M., Thissen H. Emerging rules for effective antimicrobial coatings // Trends Biotechnol. 2014. V. 32. P. 82–90.
- Sauer K., Cullen M.C., Rickard A.H., Zeef L.A.H., Davies D.G., Gilbert P. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 7312–7326.
- Schelud'ko A.V., Katsy E.I., Ostudin N.A., Gringauz O.K., Panasenka V.I. Novel classes of *Azospirillum brasilense* mutants with defects in the assembly and functioning of polar and lateral flagella // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 1998. № 4. P. 33–37.
- Serra D.O., Hengge R. Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms // Environ. Microbiol. 2014. V. 16. P. 1455–1471.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Yu.A., Telesheva E.M., Yevstigneeva S.S., Petrova L.P., Katsy E.I. Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dynamic conditions // World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35. P. 19.
- Shimizu T., Ichimura K., Noda M. The surface sensor NlpE of enterohemorrhagic *Escherichia coli* contributes to regulation of the type III secretion system and flagella by the Cpx response to adhesion // Infect. Immun. 2015. V. 84. P. 537–549.
- Siryaporn A., Kuchma S.L., O'Toole G.A., Gitai Z. Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 16860–16865.
- Smith T.G., Hoover T.R. Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era // Adv. Appl. Microbiol. 2009. V. 67. P. 257–295.
- Stewart P.S., Franklin M.J. Physiological heterogeneity in biofilms // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6. P. 199–210.
- Sukharev S.I., Sigurdson W.J., Kung C., Sachs F. Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL // J. Gen. Physiol. 1999. V. 113. P. 525–540.
- Taylor B.L., Koshland D.E., Jr. Reversal of flagellar rotation in monotrichous and peritrichous bacteria: generation of changes in direction // J. Bacteriol. 1974. V. 119. P. 640–642.
- Thomas W.E., Trintchina E., Forero M., Vogel V., Sokurenko E.V. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force // Cell. 2002. V. 109. P. 913–923.
- Tropini C., Earle K.A., Huang K.C., Sonnenburg J.L. The gut microbiome: connecting spatial organization to function // Cell Host Microbe. 2017. V. 21. P. 433–442.
- Tsang J., Hoover T.R. Themes and variations: regulation of RpoN-dependent flagellar genes across diverse bacterial species // Scientifica. 2014. V. 2014. P. 681754 (1–14).

- Valentini M., Filloux A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 12547–12555.
- Van Dellen K.L., Houot L., Watnick P.I. Genetic analysis of *Vibrio cholerae* monolayer formation reveals a key role for DeltaPsi in the transition to permanent attachment // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 8185–8196.
- Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Fransaer J., Vermant J., Michiels J. Living on a surface: swarming and biofilm formation // Trends Microbiol. 2008. V. 16. P. 496–506.
- Vladimirov N., Sourjik V. Chemotaxis: how bacteria use memory // Biol. Chem. 2009. V. 390. P. 1097–2104.
- Vogt S.L., Raivio T.L. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response // FEMS Microbiol. Lett. 2012. V. 326. P. 2–11.
- Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L.Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // ISME J. 2017. V. 11. P. 1602–1613.
- Wang F., Wang J., Jian H., Zhang B., Li S., Wang F., Zeng X., Gao L., Bartlett D.H., Yu J., Hu S., Xiao X. Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3 // PLoS One. 2008. V. 3. P. e1937.
- Wang Q., Suzuki A., Mariconda S., Porwollik S., Harshey R.M. Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum // EMBO J. 2005. V. 24. P. 2034–2042.
- Whitchurch C.B., Leech A.J., Young M.D., Kennedy D., Sargent J.L., Bertrand J.J., Semmler A.B., Mellick A.S., Martin P.R., Alm R.A., Hobbs M., Beatson S.A., Huang B., Nguyen L., Commolli J.C., Engel J.N., Darzins A., Mattick J.S. Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* // Mol. Microbiol. 2004. V. 52. P. 873–893.
- Wolfgang M.C., Lee V.T., Gilmore M.E., Lory S. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway // Dev. Cell. 2003. V. 4. P. 253–263.

Response of Bacteria to Mechanical Stimuli

S. S. Evstigneeva¹, E. M. Telesheva¹, D. I. Mokeev¹, I. V. Borisov¹,
L. P. Petrova^{1, **}, and A. V. Shelud'ko^{1, *}

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

*e-mail: shel71@yandex.ru

**e-mail: petrova_lp@mail.ru

Received April 1, 2021; revised May 2, 2021; accepted May 9, 2021

Abstract—Bacteria adapt rapidly to changes in ambient conditions, constantly inspecting their surroundings by means of their sensor systems. These systems are often thought to respond only to signals of a chemical nature. Yet, bacteria are often affected by mechanical forces, e.g., during transition from planktonic to sessile state. Mechanical stimuli, however, have seldom been considered as the signals bacteria can sense and respond to. Nonetheless, bacteria perceive mechanical stimuli, generate signals, and develop responses. This review analyzes the information on the way bacteria respond to mechanical stimuli and outlines how bacteria convert incoming signals into appropriate responses.

Keywords: bacteria, mechanosensitivity, mechanotransduction, motility, biofilms, swarming, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА В РАЙОНЕ ПОДЗЕМНОГО ГОРЕНИЯ УГЛЯ В КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ ВЫЯВИЛ ДОМИНИРОВАНИЕ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ФИЛУМОВ *DEINOCOCCUS-THERMUS*, *AQUIFICAE* И *FIRMICUTES*

© 2021 г. В. В. Кадников^{a, *}, А. В. Марданов^a, А. В. Белецкий^a, О. В. Карначук^b, Н. В. Равин^a

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

^bЛаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Поступила в редакцию 12.05.2021 г.

После доработки 13.05.2021 г.

Принята к публикации 14.05.2021 г.

Подземное горение угольных пластов, сопровождающееся образованием газов, приводит к формированию локальных термальных экосистем. Мы исследовали микробное сообщество нагретого до 72°C грунта в районе выхода на поверхность горячих газов, образующихся при подземном горении отходов добычи угля на угольном месторождении Бунгурский-Северный в Кемеровской области России. Анализ состава микробного сообщества по 16S рРНК показал, что в нем доминируют термофильные бактерии филумов *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae* и *Firmicutes*. В результате секвенирования метагенома получено 18 геномов основных членов микробного сообщества, в том числе полные геномы *Hydrogenobacter thermophiles*, *Thermoflexus hugenholtzii*, *Thermus antranikianii* и представителя кандидатного рода UBA11096 филума *Aquificae* (RBS10-58). Анализ генома RBS10-58 указывает, что эта бактерия может автотрофно фиксировать углерод в восстановительном цикле трикарбоновых кислот и получать энергию за счет окисления водорода и соединений серы с использованием в качестве акцептора электронов кислорода или нитрата. Анализ геномов двух доминирующих представителей *Firmicutes*, *Hydrogenibacillus schlegelii* и некультивируемой линии класса *Thermaerobacteria*, показал, что эти бактерии могут расти аэробно, окисляя водород и монооксид углерода. В целом в сообществе преобладали аэробные бактерии, способные расти автотрофно и получать энергию за счет окисления основных компонентов угольных газов, водорода и монооксида углерода. *Thermus antranikianii*, составляющий около половины микробного сообщества, вероятно, использует органические вещества, образуемые автотрофными представителями *Firmicutes* и *Aquificae*.

Ключевые слова: термофилы, угольные газы, микробное сообщество, гидрогенотрофы, *Thermus*, *Aquificae*

DOI: 10.31857/S0026365621050086

Исследования термофильных микроорганизмов расширили наши представления о разнообразии микроорганизмов и их эволюции, механизмах адаптации к экстремальным условиям окружающей среды (Urbiet al., 2015; Counts et al., 2017). Большинство исследований термофильных микроорганизмов было сосредоточено на термальных экосистемах, связанных с вулканической активностью, таких как наземные горячие источники и глубоководные гидротермы, или на техногенных биотопах (высокотемпературные биореакторы и т.п.). Помимо вулканической активности, к образованию локальных термальных экологических ниш могут приводить процессы естественного горения ископаемых углеводородов и угля. Характеристика микробных сообществ таких экосистем рас-

ширяет наши знания о разнообразии термофильных микроорганизмов и осуществляемых ими процессах.

Явления подземного горения угольных пластов распространены в природе и встречаются в Австралии, Германии, США, Китае, России, Индии и других странах (Stracher, Taylor, 2004). Такие подземные пожары могут длиться веками, например, угольный пласт в Дудвайлере (Саар, Германия) горит, начиная с 1668 г. Примером длительного естественного подземного горения угля является Пылающая гора (Burning Mountain) в Австралии, продолжительность горения которой оценивается примерно в 6000 лет (Rattigan, 1967).

Горение угля в условиях недостатка кислорода в присутствии воды приводит к образованию

угольных газов в реакциях: $3C + O_2 + H_2O \rightarrow H_2 + 3CO$ и $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$ (Shafirovich, Varma, 2009). Подземное горение угля является естественным аналогом процесса получения синтез-газа при газификации угля. Помимо CO_2 , угольные газы содержат в основном водород, CO и газообразные углеводороды (Stracher, Taylor, 2004; Engle et al., 2012). Эти газы также могут содержать сероводород, оксиды серы, другие токсичные соединения, такие как бензол, ксилол, алифатические и галогенированные соединения (Engle et al., 2012; Zhang et al., 2013). С потоком газа могут переноситься на поверхность сера и другие элементы, присутствующие в угольных пластах (Pone et al., 2007).

В районах, где горячие угольные газы выходят на поверхность, могут образовываться локальные экстремальные экосистемы, для которых характерны высокие температуры ($>50^\circ C$) и присутствие токсичных веществ (Tammy et al., 2005). Содержащиеся в угольных газах высокоэнергетические соединения, такие как водород и CO , могут использоваться микроорганизмами в качестве субстратов, а кислород – в качестве акцептора электронов, что определяет возможность развития специфических сообществ термофильных микроорганизмов. Однако сравнительно немного известно о составе микробных сообществ таких экосистем и генетическом потенциале входящих в них микроорганизмов.

Явления подземного горения угля встречаются и на угольных месторождениях в России. Кузнецкий угольный бассейн (Кузбасс), расположенный на юге Западной Сибири, является одним из крупнейших районов добычи угля в мире. В настоящее время добыча угля в этом регионе в основном ведется открытым способом, что приводит к образованию больших количеств отходов, включающих вскрышные породы. Породы, содержащие достаточное количество остаточного угля, складировать в виде отвалов непосредственно в местах добычи, где природные и техногенные причины вызывают воспламенение и длительное горение. Широко известным примером экологической катастрофы является горение отвалов угля в непосредственной близости шахтерского города Киселевск в Кузбассе (Kadnikov et al., 2021). В этой работе мы изучили микробное сообщество грунта, ассоциированное с зоной подземного горения угля и выходами горячих угольных газов, на отвалах месторождения Бунгурский-Северный в Новокузнецком районе Кемеровской области.

Целью исследования было изучение состава и генетического потенциала этого микробного сообщества. Мы приводим данные о составе сообщества, полученные с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК, и метагенома грунта в районе выхода

горячих угольных газов на поверхность. В результате метагеномного анализа были получены высококачественные геномы (metagenome-assembled genomes, MAG) большинства членов сообщества, что позволило охарактеризовать метаболический потенциал входящих в него микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб и выделение ДНК. Пробы были отобраны в месте складирования отходов добычи угля на месторождении угля Бунгурский-Северный в районе поселка Апанас Новокузнецкого района, Кемеровской области (53.542314 N, 86.862370 E). Отобраный на глубине 5–10 см от поверхности образец грунта, обозначенный как RBS10, представлял собой влажный осадок на склоне отвала отходов добычи вблизи места выхода на поверхность горячего пара и газов. Отобраный образец представлял собой мелкодисперсную горную породу, содержащую уголь. Препарат метагеномной ДНК выделяли с использованием набора MO BIO Power Soil DNA Kit (MO BIO Laboratories, “Qiagen Inc.”, Valencia, США).

Секвенирование и анализ фрагментов генов 16S рРНК. ПЦР-амплификацию фрагментов гена 16S рибосомной РНК, включающих гипервариабельные области V3–V6, проводили с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGG-GDBGWCWACAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVG-GGTHTCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР-фрагменты баркодировали, используя набор Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США). Очистку ПЦР-фрагментов проводили с использованием Agen-court AMPure beads (“Beckman Coulter”, Brea, CA, США), количество ДНК определяли с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, Carlsbad, CA, США). Затем ампликоны секвенировали на Illumina MiSeq (парные чтения, 2×300 нт). Пересекающиеся чтения объединяли с помощью FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Фильтрацию по качеству и кластеризацию последовательностей в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне 97% идентичности последовательностей проводили с помощью программы Usearch (Edgar, 2010). Химерные последовательности и синглтоны удаляли при кластеризации алгоритмом Usearch. Для расчета относительной численности ОТЕ все чтения (включая синглтоны и низкокачественные) с помощью Usearch были картированы на последовательности ОТЕ с порогом идентичности 97%.

Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили в результате поиска по базе данных последовательностей рРНК SILVA v.132 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016).

Секвенирование метагеномной ДНК, сборка контигов и их кластеризация для получения MAG.

Метагеномную ДНК секвенировали с использованием Illumina HiSeq2500 в соответствии с инструкциями производителя (“Illumina Inc.”, США). В результате секвенирования библиотеки ДНК TruSeq (парные чтения, 2×150 нт) было получено 232885794 пар чтений. Удаление адапторов и исключение низкокачественных последовательностей ($Q < 30$) выполнялись с использованием Cutadapt v.1.8.3 (Martin, 2011) и Sickle v.1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>) соответственно. Обработанные парные чтения были объединены с помощью FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011).

Метагеномную ДНК дополнительно секвенировали на приборе MinION (“Oxford Nanopore”, Великобритания) с использованием набора 1D Genomic DNA by ligation kit (SQK-LSK108). В результате секвенирования этой библиотеки на MinION в проточной ячейке R9.4 (FLO-MIN106) было получено 8280228 прочтений общей длиной 16.12 млрд нт.

Все полученные чтения Illumina (всего около 25 млрд нт) и Nanopore были *de novo* собраны в контиги с помощью metaSPAdes hybrid assembler v.3.13.0 (Nurk et al., 2017). Контиги длиной более 1500 п.н. были объединены в кластеры, представляющие MAG, с использованием MetaBAT v.2.12.1 (Kang et al., 2015). Для улучшения сборки MAG, чтения MinION были картированы на входящие в MAG контиги с помощью BWA v.0.7.15 (Li, Durbin, 2010). Затем программа Npscarf v.1.0 (Cao et al., 2017) была использована для формирования цепочек контигов (скаффолдов) и заполнения пробелов между контигами с использованием консенсусных последовательностей Illumina из графа сборки metaSPAdes.

Кроме того, чтения MinION собирали в контиги *de novo* с использованием Flye v. 2.7 (Kolmogorov et al., 2019). Последовательности контигов были скорректированы с помощью Pilon v.1.2.2 (Walker et al., 2014) в результате двух итераций картирования чтений Illumina на собранные последовательности контигов с использованием Bowtie 2 (Langmead, Salzberg, 2012). Полученные контиги были кластеризованы в MAG с помощью MetaBAT v.2.12.1 (Kang et al., 2015).

Аннотация и анализ геномов (MAG). Полноту MAG и их возможное загрязнение (т.е. возможное наличие в них контигов, представляющих другие геномы вследствие неправильной кластеризации) оценивали с помощью CheckM v.1.0.5 (Parks et al., 2015). Собранные MAG были таксономически классифицированы с использованием набора инструментов Genome Taxonomy Database Toolkit (GTDB-Tk) v.0.3.2 (Chaumeil et al., 2020) и Genome Taxonomy Database (GTDB) (Parks et al., 2018).

Поиск генов и аннотацию MAG выполняли с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annota-

tion Pipeline (Tatusova et al., 2016) или RAST server 2.0 (Brettin et al., 2015) с последующей корректировкой аннотации путем сравнения предсказанных последовательностей белков с базами данных National Center for Biotechnology Information (NCBI). N-концевые сигнальные пептиды были предсказаны с помощью Signal P v.5.0, а присутствие трансмембранных доменов – с помощью TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Определение уровня сходства между геномами и филогенетический анализ на основе полногеномных данных. Средние уровни идентичности нуклеотидных (average nucleotide identity, ANI) и аминокислотных (average amino acid identity, AAI) последовательностей между выбранными геномами были рассчитаны с использованием скриптов из Enveomics Collection (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016).

GTDB-Tk v.0.3.2 был использован для поиска однокопийных маркерных генов в MAG и для построения множественного выравнивания конкатенированных последовательностей однокопийных маркерных генов из данного MAG и всех видов из GTDB. Часть множественного выравнивания, созданного в GTDB-Tk, была использована для построения филогенетического дерева с помощью PhyML v.3.3 (Guindon et al., 2010) с использованием параметров по умолчанию. Уровень поддержки внутренних ветвей оценивался с помощью байесовского теста в PhyML.

Депонирование нуклеотидных последовательностей. Первичные данные, полученные в результате секвенирования фрагментов гена 16S рРНК и секвенирования метагенома, были депонированы в NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номерами SRX10881305, SRX10881306 и SRX10881307. Аннотированные последовательности MAG депонированы в базе данных GenBank и доступны через BioProject PRJNA728906.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав микробного сообщества по результатам анализа ПЦР фрагментов генов 16S рРНК. Образец грунта был отобран из горящего отвала добычи угля с многочисленными выходами продуктов горения на поверхность. Температура грунта в месте отбора составляла 72°C.

Для характеристики состава микробного сообщества были использованы 57213 последовательностей фрагментов гена 16S рРНК. В результате кластеризации этих последовательностей было идентифицировано 29 ОТЕ на уровне 97% идентичности. Все выявленные ОТЕ представляли бактерии, архей обнаружено не было. Результаты таксономической классификации ОТЕ представлены на рис. 1.

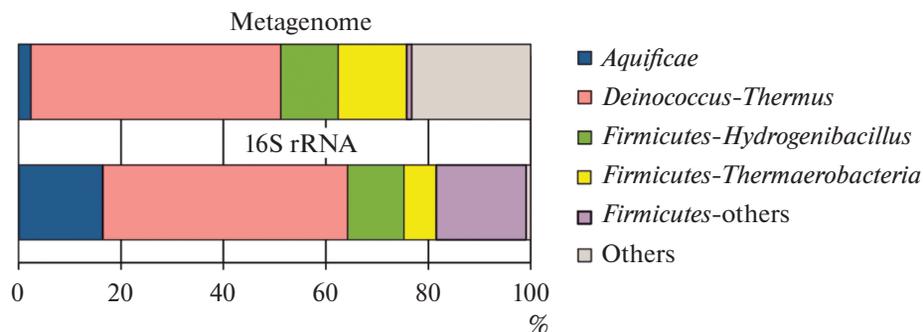


Рис. 1. Состав микробного сообщества по результатам анализа генов 16S рРНК и метагеномного секвенирования. Категория others (прочие) в случае метагенома включает последовательности, не вошедшие в MAG, отнесенные к указанным группам.

В сообществе доминировали представители трех филумов: *Deinococcus-Thermus* (47.7% всех последовательностей генов 16S рРНК), *Firmicutes* (34.9%) и *Aquificae* (16.5%). В минорных количествах были обнаружены представители филумов *Bacteroidetes* (0.48%), *Proteobacteria* (0.27%), *Chloroflexi* (0.02%) и *Actinobacteria* (0.01%).

Филум *Deinococcus-Thermus* был представлен двумя ОТЕ, одна из которых доминировала в сообществе, составляя 47.4% всех последовательностей 16S рРНК. Эта ОТЕ относится к роду *Thermus* со сходством последовательности 98.7% с термофильной гетеротрофной бактерией *Thermus antranikianii*, выделенной из горячих источников в Исландии (Chung et al., 2000).

12 ОТЕ представляли филум *Firmicutes*. Наиболее многочисленная из них (14.1%) представляла род *Brevibacillus* и имела идентичность 98.73% по 16S рРНК с *Brevibacillus borstelensis*, умеренно термофильной гетеротрофной спорообразующей бактерией, встречающейся в почвах и гидротермальных местообитаниях (Shida et al., 1995; Khalil et al., 2018). Около 11% последовательностей представляли одну ОТЕ, отнесенную к роду *Hydrogenibacillus* (порядок *Thermicanales*, семейство *Thermicanaceae* в соответствии с таксономической системой Genome Taxonomy Database). Культивируемый представитель этого рода, *Hydrogenibacillus schlegelii*, – факультативно хемолитотрофная аэробная термофильная бактерия, которая способна окислять водород и, предположительно, СО (Schenk, Aragno, 1979; Kämpfer et al., 2013). Около 6.3% сообщества представляла ОТЕ, филогенетически удаленная от культивируемых представителей филума *Firmicutes* (<87% идентичности по 16S рРНК).

Филум *Aquificae* был представлен одной ОТЕ, филогенетически близкой к роду *Hydrogenobacter* семейства *Aquificaceae*. Представители *Hydrogenobacter* – типичные обитатели высокотемпературных горячих источников, хемолитоавтотрофные термофилы, способные аэробно окислять водо-

род (Reysenbach et al., 2000; Takacs-Verbach et al., 2013).

Секвенирование метагенома и сборка MAG. Для получения геномов представителей микробного сообщества мы просеквенировали метагеном образца RBS10, используя комбинацию технологий Illumina и Oxford Nanopore. Собранные контиги были кластеризованы в 18 MAG, имеющих полноту свыше 80% и загрязнение (избыточность) менее 10% по оценке CheckM на основе анализа присутствия набора консервативных однокопийных маркерных генов (табл. 1). В сумме эти MAG представляли около 80% всего метагенома сообщества. Таксономическая принадлежность полученных MAG была определена на основе филогенетического анализа по конкатенированным последовательностями консервативных маркерных генов по Genome Taxonomy Database (Parks et al., 2018).

Таксономическая классификация MAG выявила те же самые основные бактериальные филумы, которые были обнаружены с помощью 16S рРНК. Относительные доли некоторых линий в пуле последовательностей генов 16S рРНК и в полном метагеноме отличались (рис. 1), что, вероятно, обусловлено разным числом копий гена 16S рРНК в геномах и разными размерами самих геномов. Около половины всего метагенома представлял один MAG, RBS10-92, отнесенный к филуму *Deinococcus-Thermus*. Около 26% метагенома составляли 10 MAG, представлявшие филум *Firmicutes*, три MAG были отнесены к *Aquificae* (2.4% метагенома), три – к *Chloroflexi* (3.3% метагенома), два – к *Proteobacteria* (0.5% метагенома) и 0.02% метагенома представлял MAG кандидатного филума WOR-3 (табл. 1).

С использованием длинных чтений, полученных с помощью нанопорового секвенирования, были собраны полные кольцевые последовательности четырех геномов, – *Hydrogenobacter thermophiles* (MAG RBS10-74), представителя кандидатного рода UBA11096 филума *Aquificae* (MAG RBS10-58),

Таблица 1. Основные характеристики MAG

MAG ID	Полнота/загрязнение, %	Размер генома, нт	Число контигов	GC, %	Доля в метагеноме, %	Таксономическая принадлежность*
2	97.63/1.36	1699170	143	41.6	0.08	p__Aquificota; g__Hydrogenobacter
74	99.59/0.51	1794458	1**	44	0.17	p__Aquificota; s__Hydrogenobacter thermophilus
58	99.59/0.41	1722082	1**	43.1	2.13	p__Aquificota; g__UBA11096
4	97.27/0.91	3316678	1**	67.6	3.17	p__Chloroflexota; s__Thermoflexus hugenholtzii
7	85.55/1.87	2784472	202	65.1	0.03	p__Chloroflexota; g__Thermomicrobium
30	96.23/0	3717411	433	65.6	0.11	p__Chloroflexota; f__UBA6265
92	100/0	2424424	1**	64.9	48.83	p__Deinococcota; s__Thermus antranikianii
77	93.16/1.82	2294372	228	45	0.16	p__Firmicutes; f__Amphibacillaceae
39	98.09/0.68	2502348	201	37.5	0.12	p__Firmicutes_A; s__Caldanaerobacter subterraneus
35	94.06/0.2	2368455	42	63.5	11.01	p__Firmicutes_E; c__Thermaerobacteria
62	92.57/13.9	4585313	204	68.9	2.34	p__Firmicutes_E; g__Thermaerobacter
82	92.25/2.97	3307331	619	58.5	0.09	p__Firmicutes_G; o__DTU080
36	96.15/2.95	4121736	396	53.4	0.25	p__Firmicutes_I; s__Bacillus_BB thermozeamaize
40	84.97/4.92	2109662	127	64	0.37	p__Firmicutes_I; s__Brockia lithotrophica
8	91.28/1.72	2288228	67	61.8	0.48	p__Firmicutes_I; g__Hydrogenibacillus
49	92.44/8.08	2964420	72	66.1	10.75	p__Firmicutes_I; s__Hydrogenibacillus schlegelii
91	99.19/2.07	4672685	147	66.4	0.18	p__Proteobacteria; g__Paracoccus
48	99.38/1.91	3146152	24	70.2	0.29	p__Proteobacteria; g__Lysobacter
29	92.37/1.69	1580388	114	27.6	0.02	p__WOR-3_A; o__LBFQ01

* Таксономическая принадлежность по Genome Taxonomy Database, версия R89. Указаны филум и таксон низшего ранга, до которого возможна классификация.

** Полный кольцевой геном.

Thermoflexus hugenholtzii филума *Chloroflexi* (MAG RBS10-4) и *Thermus antranikianii* (MAG RBS10-92).

Чтобы получить представление о метаболических возможностях основных представителей микробного сообщества мы подробно проанализировали несколько MAG.

Геномы представителей *Firmicutes*. К наиболее многочисленным представителям микробного сообщества относились две бактерии филума *Firmicutes*, представленные MAG RBS10-35 и MAG

RBS10-49. Геном RBS10-35 представлял 11.0% всего метагенома и был идентифицирован только до уровня класса *Thermaerobacteria* в геномной таксономической системе. По-видимому, этот геном соответствует ОТЕ, составлявшей 6.3% последовательностей 16S рРНК и отнесенной к неклассифицируемым фирмикутам. Поиск ближайших родственников RBS10-35 в GenBank выявил только одну последовательность 16S рРНК (FN687452) с идентичностью 91%, обнаруженную в термальном аэробном биореакторе для переработки отрабо-

танного активного ила (Hayes et al., 2011). Анализ генома RBS10-35 показал, что эта бактерия имеет полную аэробную дыхательную цепь и СО дегидрогеназу, что указывает на возможность окисления СО.

Вторым по относительной численности среди фирмикут (10.7% метагенома) был организм, представленный геномом RBS10-49. Этот генотип был идентифицирован как *Hydrogenibacillus schlegelii* на основании 97.68% AAI с геномом штамма *H. schlegelii* MA48 (Maker et al., 2017). Анализ генома RBS10-49 выявил наличие генов аэробной дыхательной цепи, мембранно-связанной поглощающей [NiFe] гидрогеназы группы 1d и респираторной СО дегидрогеназы, что указывает на способность этой бактерии получать энергию за счет окисления компонентов угольных газов – водорода и СО. В геноме также кодируется полный цикл Кальвина, функционирование которого может обеспечивать автотрофную фиксацию углерода.

Следует отметить, что среди собранных MAG отсутствовал геном, относящийся к роду *Brevibacillus*, хотя на его представителей приходилось около 15% всех последовательностей генов 16S рРНК. По-видимому, *Brevibacillus* были представлены несколькими близкими филотипами, что затрудняло сборку протяженных контигов и, соответственно, получение MAG.

Полный геном *Thermus antranikianii* RBS10-92. В результате секвенирования метагенома был собран полный геном бактерии RBS10-92. Это геном имеет 97.79% AAI с *Thermus antranikianii* DSM 12462 (GCF_000423905), что позволяет отнести его к этому виду. Геном *T. antranikianii* RBS10-92 был просеквенирован с 5030-кратным средним покрытием, имеет длину 2424424 п.н. и является первым известным полным геномом *T. antranikianii*. Относительная численность RBS10-92 в метагеноме составляет 48.8%, что хорошо согласуется с 47.64% долей соответствующей ОТЕ в чтениях 16S рРНК. В результате аннотации генома RBS10-92 было идентифицировано 2636 потенциальных белок-кодирующих генов, функции только половины из которых были предсказаны. В геноме были идентифицированы две копии оперона рРНК и 50 генов транспортных РНК (тРНК).

Анализ генома *T. antranikianii* RBS10-92 показал, что эта бактерия, вероятно, является аэробным гетеротрофом, способным гидролизовать различные углеводы. Этот микроорганизм также имеет возможности для роста в анаэробных условиях, используя нитрат в качестве акцептора электронов. Эти предсказания согласуются с микробиологическими характеристиками изолятов *T. antranikianii* (Chung et al., 2000).

Полный геном *Hydrogenobacter thermophilus* RBS10-74. Собраны три генома представителей филума *Aquificae* с полнотой более 97% и загряз-

нением менее 2%. Для двух из этих организмов были получены полные кольцевые геномные последовательности. RBS10-74, на который приходится 0.17% всего метагенома, был классифицирован как *Hydrogenobacter thermophilus* на основании 95.7% ANI с *H. thermophilus* ТК-6 (GCA_000010785), изолированным из горячего источника в Японии (Arai et al., 2010).

Анализ генома *H. thermophiles* RBS10-74 предсказал, что, как и культивируемые штаммы *H. thermophiles*, он является облигатным автотрофным организмом, способным окислять водород и фиксировать СО₂ через восстановительный цикл трикарбоновых кислот. При росте в анаэробных условиях эта бактерия может использовать нитрат в качестве акцептора электронов. RBS10-74 также может окислять элементную серу или тиосульфат.

Полный геном MAG RBS10-58 – представителя кандидатного рода UBA11096. Второй полный геном представителя филума *Aquificae* был отнесен к роду UBA11096 семейства *Aquificaceae* в соответствии с геномной таксономической системой. До настоящего времени этот род не имеет культивируемых представителей и описан на основе нескольких собранных из метагеномов драфт-геномов, анализ которых ранее не проводился.

Геном RBS10-58 был просеквенирован с 309-кратным средним покрытием и собран в кольцевую хромосому длиной 1722082 п.н. Относительная для этого генотипа в метагеноме составляет 2.13%. В результате аннотации генома RBS10-58 было идентифицировано 1848 потенциальных белок-кодирующих генов, функции половины из которых были предсказаны, а также один оперон 16S–23S–5S рРНК и 42 гена тРНК.

Для определения филогенетического положения бактерии RBS10-58 было построено филогенетическое дерево на основе конкатенированных аминокислотных последовательностей консервативных маркерных генов представителей всех родов семейства *Aquificaceae*, определяемых в геномной таксономической системе. Полученные результаты показывают, что RBS10-58 вместе с несколькими другими MAG представляет отдельную линию уровня рода, наряду с родами *Aquifex*, *Hydrogenivirga*, *Hydrogenobacter*, *Thermocrinis* и *Thermocrinis minervae*, представлявшим отдельный род *Thermocrinis_A* в геномной таксономии (рис. 2).

Анализ генома RBS10-58 выявил полный набор генов восстановительного цикла трикарбоновых кислот, который используется у *Aquificae* для автотрофной фиксации СО₂ (Hügler et al., 2007), а также генов пути глюконеогенеза. Пентозофосфатный путь у RBS10-58 отсутствует. В геноме обнаружен полный набор генов пути окислительного фосфорилирования, в том числе NADH дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, цитохром *bc1* комплекса и нескольких цитохром *c* оксидаз. Наличие

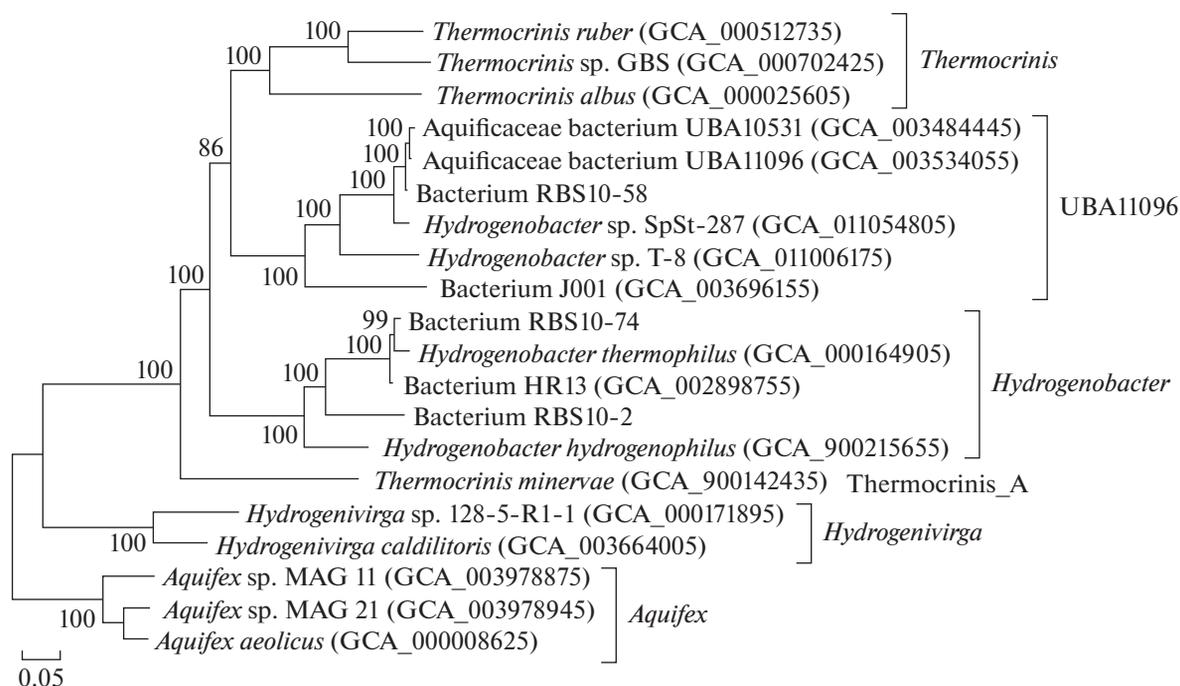


Рис. 2. Филогенетическое положение RBS10-58 в семействе *Aquificaceae*. Филогенетическое дерево построено по методу maximum likelihood, основанной на основе конкатенированных последовательностей консервативных маркерных генов. Уровни поддержки ветвей определены с помощью Байесовского теста в PhyML. Таксономия показана на основе системы GTDB (g – род).

поглощающих мембранно-связанных [NiFe] гидrogenаз групп 2a и 1d указывает на возможность использования молекулярного водорода в качестве донора электронов при дыхании, что характерно для представителей филума *Aquificae*. Другим субстратом может служить формиат, о чем свидетельствует наличие мембранно-связанной формиатдегидрогеназы.

В анаэробных условиях акцептором электронов может служить нитрат, на что указывает присутствие мембранно-связанной нитратредуктазы, которая восстанавливает нитрат до нитрита. Далее нитрит может восстанавливаться цитохром *cd1* нитритредуктазой с образованием оксида азота(II). Последующие стадии денитрификации могут осуществляться редуктазой окиси азота (nitric oxide reductase) и редуктазой закиси азота (nitrous oxide reductase) с образованием молекулярного азота.

В качестве донора электронов бактерия RBS10-58 может использовать и соединения серы. Окисление сероводорода может осуществляться сульфид:хинон оксидоредуктазой (sulfide:quinone oxidoreductase) и флавоцитохром *c*:сульфид дегидрогеназой (flavocytochrome *c*:sulfide dehydrogenase). В геноме также кодируется Sox-Hdr-Soe вариант пути окисления соединений серы до сульфата (Watanabe et al., 2019), включающий кластер *sox*-генов *soxYZAXB*, гены сульфитдегидрогеназы *soeABC* и

кластер генов, кодирующих субъединицы гетеросульфидредуктазы *hdrCBAhyphdrCB*.

Таким образом, бактерия RBS10-58 является хемолитоавтотрофом, способным получать энергию за счет окисления молекулярного водорода и соединений серы в процессе аэробного дыхания, а в анаэробных условиях осуществлять все стадии денитрификации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что один из первых описанных термофилов, *Thermoplasma acidophilum*, был выделен из проб отходов горящего угля группой Томаса Брока в конце 60-х годов прошлого столетия (Darling et al., 1970), состав микробного сообщества этих экосистем остается малоизученным. Исследования состава микробных сообществ почв в районах подземных угольных пожаров были выполнены в Пенсильвании, США (Tobin-Janzen et al., 2005; Lee et al., 2017). Анализ микробных сообществ по 16S рРНК выявил присутствие архей филума *Crenarchaeota*, а также бактерий филумов *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia* и *Gemmatimonadetes*. В последующих метагеномных исследованиях было показано, что микроорганизмы с меньшими размерами клеток и геномов преобладают на участках почвы с более высокой температурой (Sorensen et al., 2019).

Микробные сообщества нагретой почвы в районе выходов на поверхность горячих угольных газов в Синьцзяне, Китай, были исследованы с использованием T-RFLP анализа и клональных библиотек генов 16S рРНК (Zhang et al., 2013). Среди доминирующих групп микроорганизмов обнаружены представители филумов *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* и *Actinobacteria*. Самой многочисленной группой были *Firmicutes*, в основном представители родов *Bacillus* и *Paenibacillus*.

В обоих этих случаях объектами исследования были нагретые за счет выхода горячих газов “обычные”, богатые органикой почвы, что обусловило преобладание в сообществах типичных почвенных групп микроорганизмов. В настоящей же работе объектом исследования были не почвы, а отвалы карьера по добыче угля, представляющие собой углесодержащие горные породы. Предполагается, что в такой экосистеме будут формироваться специфические сообщества термофилов, развитие которых поддерживается за счет угольных газов. Наиболее близким аналогом исследованного нами объекта было микробное сообщество нагретых горных пород в районе подземного горения угля на территории Горного Алтая (Kadnikov et al., 2018). Оно было простым по составу и включало всего три доминирующих филотипа, все они представляли филум *Firmicutes*. Это аэробный гетеротроф *Ca. Carbobacillus altaicus*, анаэробный хемолитоавтотроф *Brockia lithotrophica* и аэробная бактерия *Hydrogenibacillus schlegelii*, способная как использовать органические соединения, так и расти автотрофно. Все эти микроорганизмы могут получать энергию за счет окисления молекулярного водорода (а некоторые также и СО; Kadnikov et al., 2018). Также в этом сообществе были обнаружены некультивируемые линии фирмикут, относящиеся к *Thermaerobacteria*.

Еще одним близким аналогом являются горящие отвалы угольного разреза у города Киселевск Кемеровской области. В микробном сообществе поверхностного слоя нагретого до 58°C грунта доминировали представители *Ktedonobacteria* (филум *Chloroflexi*), способные окислять водород и СО, а термофильные гидрогенотрофные фирмикуты составляли небольшую часть сообщества (Kadnikov et al., 2021). Возможно, отличия от исследованного в этой работе объекта обусловлены различной температурой и влажностью.

В исследованном нами сообществе RBS10 фирмикуты составляли около трети и были представлены термофильными группами. *H. schlegelii* и некультивируемые представители *Thermaerobacteria* входили в число доминирующих групп, в небольших количествах была обнаружена и *Brockia lithotrophica*. Однако, помимо фирмикотов, доминирующими группами в сообществе

RBS10 были представители рода *Thermus* и семейства *Aquificaceae*, характерные для гидротермальных экосистем (Counts et al., 2017; Bonch-Osmolovskaya, 2020). Ранее об их присутствии в почвах в районах подземного горения угля не сообщалось. Будучи способными к автотрофной фиксации углерода и получению энергии за счет окисления водорода и соединений веры, *Aquificaceae*, как и фирмикуты, представляют автотрофную часть сообщества, поддерживаемую угольными газами. Составляющий около половины микробного сообщества *T. antranikianii*, в свою очередь, использует в качестве субстратов органические вещества, образуемые автотрофными фирмикутами и *Aquificaceae*.

Исследованная нами термальная экосистема, ассоциированная с горящими угольными отвалами, и другие подобные объекты в Кемеровской области и на Алтае, возникли не более нескольких десятков лет назад и являются “молодыми” по сравнению с геотермальными объектами. Ранее было высказано предположение, что термофильные *Firmicutes*, споры которых могут распространяться на большие расстояния (Bonjour et al., 1988; Aullo et al., 2013), могут быть первыми “колонизаторами” таких новых термальных экологических ниш (Kadnikov et al., 2018). Обнаружение нами представителей *Thermus* и *Aquificaceae* свидетельствует о том, что распространение неспорообразующих термофилов, источником которых могут быть встречающиеся на юге Сибири горячие источники и другие геотермальные объекты, также может быть достаточно быстрым.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично поддержана Российским научным фондом (грант № 19-74-00142).

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

Отбор проб и выделение ДНК проведены В.В. Кадниковым. Секвенирование генов 16S рРНК и метагеномной ДНК проведены В.В. Кадниковым и А.В. Мардановым. Биоинформационный анализ результатов секвенирования выполнен А.В. Белецким. Анализ данных и подготовка статьи выполнены В.В. Кадниковым, О.В. Карначук и Н.В. Равиным. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arai H., Kanbe H., Ishii M., Igarashi Y. Complete genome sequence of the thermophilic, obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 // J. Bacteriol. 2010. V. 192. P. 2651–2652.
- Aüllo T., Ranchou-Peyruse A., Ollivier B., Magot M. *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments // Front. Microbiol. 2013. V. 4. P. 362.
- Bonch-Osmolovskaya E. *Aquificales* // eLS. 2020. V. 1. P. 433–441.
- Bonjour F., Graber A., Aragno M. Isolation of *Bacillus schlegelii*, a thermophilic, hydrogen oxidizing, aerobic autotroph, from geothermal and nongeothermal environments // Microb. Ecol. 1988. V. 16. P. 331–337.
- Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason J.A. III, Stevens R., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // Sci. Rep. 2015. V. 5. Art. 8365.
<https://doi.org/10.1038/srep08365>
- Cao M.D., Nguyen S.H., Ganesamoorthy D., Elliott A.G., Cooper M.A., Coin L.J. Scaffolding and completing genome assemblies in real-time with nanopore sequencing // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 1–10.
- Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
- Chung A.P., Rainey F.A., Valente M., Nobre M.F., da Costa M.S. *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 209–217.
- Counts J.A., Zeldes B.M., Lee L.L., Straub C.T., Adams M.W.W., Kelly R.M. Physiological, metabolic and biotechnological features of extremely thermophilic microorganisms // Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 2017. V. 9. e1377.
- Darling G., Brock T.D., Samsonoff W., Conti S.F. A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile // Science. 1970. V. 170. P. 1416–1418.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Engle M.A., Radke L.F., Heffern E.L., O'Keefe J.M., Hower J.C., Smeltzer C.D., Hower J.M., Olea R.A., Eatwell R.J., Blake D.R., Emsbo-Mattingly S.D., Stout S.A., Queen G., Aggen K.L., Kolker A., Prakash A., Henke K.R., Stracher G.B., Schroeder P.A., Román-Colón Y., Schure A. Gas emissions, minerals, and tars associated with three coal fires, Powder River Basin, USA // Sci. Total Environ. 2012. V. 420. P. 146–159.
- 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.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // Syst. Biol. 2010. V. 59. P. 307–321.
- Hayes D., Izzard L., Seviour R. Microbial ecology of autothermal thermophilic aerobic digester (ATAD) systems for treating waste activated sludge // Syst. Appl. Microbiol. 2011. V. 34. P. 127–138.
- Hügler M., Huber H., Molyneux S.J., Vetriani C., Sievert S.M. Autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle in different lineages within the phylum *Aquificae*: evidence for two ways of citrate cleavage // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 81–92.
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Grigoriev M.A., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Thermophilic *Chloroflexi* dominate in the microbial community associated with coal-fire gas vents in the Kuznetsk Coal Basin, Russia // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 948.
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Ivasenko D.A., Antsiferov D.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Lignite coal burning seam in the remote Altai Mountains harbors a hydrogen-driven thermophilic microbial community // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 1–12.
- Kämpfer P., Glaeser S.P., Busse H.J. Transfer of *Bacillus schlegelii* to a novel genus and proposal of *Hydrogenibacillus schlegelii* gen. nov., comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 2013. V. 63. P. 1723–1727.
- Kang D.D., Froula J., Egan R., Wang Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities // PeerJ. 2015. V. 3. e1165.
- Khalil A.B., Sivakumar N., Arslan M., Saleem H., Qarawi S. Insights into *Brevibacillus borstelensis* AK1 through whole genome sequencing: a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Saudi Arabia // Biomed. Res. Int. 2018. Art. 5862437.
- Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P.A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 540–546.
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat. Methods. 2012. V. 9. P. 357–359.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lee S.H., Sorensen J.W., Grady K.L., Tobin T.C., Shade A. Divergent extremes but convergent recovery of bacterial and archaeal soil communities to an ongoing subterranean coal mine fire // ISME J. 2017. V. 11. P. 1447–1459.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 589–595.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Maker A., Hemp J., Pace L.A., Ward L.M., Fischer W.W. Draft genome sequence of *Hydrogenibacillus schlegelii* MA48, a deep-branching member of the *Bacilli* class of *Firmicutes* // Genome Announc. 2017. V. 5. e00380-16.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads // EMBnet. J. 2011. V. 17. P. 10–12.
- Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler // Genome Res. 2017. V. 27. P. 824–834.
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 996–1004.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // Genome Res. 2015. V. 25. P. 1043–1055.
- Pone J.D.N., Hein K.A., Stracher G.B., Annegarn H.J., Finkleman R.B., Blake D.R., McCormack J.K., Schroeder P. The spontaneous combustion of coal and its by-products in the Witbank and Sasolburg coalfields of South Africa // Int. J. Coal Geol. 2007. V. 72. P. 124–140.

- Rattigan J.H. Phenomena about Burning Mountain, Wingen, NSW // Aust. J. Sci. 1967. V. 30. P. 183–184.
- Reysenbach A.L., Ehringer M., Hershberger K. Microbial diversity at 83°C in Calcite Springs, Yellowstone National Park: another environment where the *Aquificales* and “Korarchaeota” coexist // *Extremophiles*. 2000. V. 4. P. 61–67.
- Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // *PeerJ Preprints*. 2016. e1900v1.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ*. 2016. V. 4. e2584.
- Schenk A., Aragno M. *Bacillus schlegelii*, a new species of thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium oxidizing molecular hydrogen // *Microbiology (SGM)*. 1979. V. 115. P. 333–341.
- Shafirovich E., Varma A. Underground coal gasification: A brief review of current status // *Ind. Eng. Res.* 2009. V. 48. P. 7865–7875.
- Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Udaka S., Nakamura L.K., Komagata K. Proposal of *Bacillus reuszeri* sp. nov., *Bacillus formosus* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus borstelensis* sp. nov., nom. rev. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995. V. 45. P. 93–100.
- Sorensen J.W., Dunivin T.K., Tobin T.C., Shade A. Ecological selection for small microbial genomes along a temperate-to-thermal soil gradient // *Nat. Microbiol.* 2019. V. 4. P. 55–61.
- Stracher G.B., Taylor T.P. Coal fires burning out of control around the world: Thermodynamic recipe for environmental catastrophe // *Int. J. Coal Geol.* 2004. V. 59. P. 7–17.
- Takacs-Verbach C., Inskeep W.P., Jay Z.J., Herrgard M.J., Rusch D.B., Tringe S.G., Kozubal M.A., Hamamura N., March R.E., Fouke B.W., Reysenbach A.L., McDermott T.R., Jennings R.deM., Hengartner N.W., Xie G. Metagenome sequence analysis of filamentous microbial communities obtained from geochemically distinct geothermal channels reveals specialization of three *Aquificales* lineages // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. P. 84.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- Tobin-Janzen T., Shade A., Marshall L., Torres K., Beblo C., Janzen C., Lenig J., Martinez A., Ressler D. Nitrogen changes and domain bacteria ribotype diversity in soils overlying the Centralia, Pennsylvania underground coal mine fire // *Soil Sci.* 2005. V. 170. P. 191–201.
- Urbietta M.S., Donati E.R., Chan K.G., Shahar S., Sin L.L., Goh K.M. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 633–647.
- Walker B.J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., Cuomo C.A., Zeng Q., Wortman J., Young S.K., Earl A.M. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement // *PLoS One*. 2014. V. 9. e112963.
- Watanabe T., Kojima H., Umezawa K., Hori C., Takasuka T.E., Kato Y., Fukui M. Genomes of neutrophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotrophs representing 9 proteobacterial species from 8 genera // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 316.
- Zhang T., Xu J., Zeng J., Lou K. Diversity of prokaryotes associated with soils around coal-fire gas vents in MaNasi county of Xinjiang, China // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P. 23–36.

Metagenomic Analysis of the Microbial Community in the Underground Coal Fire Area (Kemerovo Region, Russia) Revealed Predominance of Thermophilic Members of the Phyla *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae*, and *Firmicutes*

V. V. Kadnikov¹*, A. V. Mardanov¹, A. V. Beletsky¹, O. V. Karnachuk², and N. V. Ravin¹

¹*Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071 Russia*

²*Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Received May 12, 2021; revised May 13, 2021; accepted May 14, 2021

Abstract—Underground burning of coal seams, accompanied release of gases, leads to the development of local thermal ecosystems. We investigated the microbial community of the ground heated to 72°C in the release area of hot gases resulting from underground combustion of coal mining waste at the Bungurskiy-Severnoy coal deposit in the Kemerovo region of Russia. Analysis of the composition of the microbial community by 16S rRNA gene profiling revealed predominance of thermophilic bacteria of the phyla *Deinococcus-Thermus*, *Aquificae*, and *Firmicutes*. As a result of metagenomic analysis, 18 genomes of the main members of the microbial community were obtained, including the complete genomes of *Hydrogenobacter thermophiles*, a member of the candidate genus UBA11096 of the phylum *Aquificae* (RBS10-58), *Thermoflexus hugenholtzii*, and *Thermus antranikianii*. Analysis of the RBS10-58 genome indicates that this bacterium can autotrophically fix carbon in the reductive tricarboxylic acids cycle and obtain energy via the oxidation of hydrogen and sulfur compounds with oxygen or nitrate as electron acceptors. Genome analysis of the two dominant *Firmicutes* species, *Hydrogenibacillus schlegelii* and an uncultured member of the class *Thermaerobacteria*, showed that these bacteria could grow aerobically by oxidizing hydrogen and carbon monoxide. Overall, the community was dominated by aerobic bacteria capable of growing autotrophically and receiving energy via the oxidation of the main components of coal gases, hydrogen and carbon monoxide. *Thermus antranikianii*, which makes up about half of the microbial community, probably uses organic matter produced by the autotrophic members of *Firmicutes* and *Aquificae*.

Keywords: thermophiles, coal gases, microbial community, hydrogenotrophs, *Thermus*, *Aquificae*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫЕ МЕТАНОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ ИЗ ОСАДКОВ
РЕКИ ЧЕРНАЯ, КРЫМ, И ОЦЕНКА ИХ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

© 2021 г. И. Ю. Ошкин^а, О. В. Данилова^а, Р. З. Сулейманов^а, Е. Н. Тихонова^а, Т. В. Малахова^б,
А. И. Мурашова^б, Н. В. Пименов^а, С. Н. Дедыш^{а, *}

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

^бФедеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”,
Севастополь, 299011 Россия

*e-mail: dedysh@mail.ru

Поступила в редакцию 13.04.2021 г.

После доработки 23.04.2021 г.

Принята к публикации 28.04.2021 г.

Технология производства микробного белка из природного газа опирается на использование термотолерантных метанотрофных бактерий, характеризующихся высокой скоростью роста на метане. Спектр ранее задействованных в производстве штаммов-продуцентов ограничен представителями рода *Methylococcus*, что накладывает ограничения на развитие этой технологии и делает актуальным поиск новых культур быстрорастущих метанотрофов. Настоящая работа посвящена решению этой задачи с использованием образцов донного осадка реки Черная, Крым. Молекулярный анализ состава микробного сообщества осадка выявил доминирование представителей *Gamma*proteobacteria (33–42% полученных фрагментов генов 16S рРНК), а также *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidota* и *Acidobacteria* в качестве численно значимых компонентов сообщества. В полученной из осадка первичной накопительной культуре метанотрофных бактерий около 60% фрагментов генов 16S рРНК принадлежали представителям рода *Methylomonas*. Применение различных стратегий выделения чистых культур метанотрофов позволило получить три изолята целевых бактерий родов *Methylomonas*, *Methylomagnum* и *Methylocystis*, температурные оптимумы роста которых составили 25, 35 и 40°C соответственно. Наиболее высокая скорость роста в периодической культуре, 0.21 ч⁻¹, была зарегистрирована для *Methylocystis* sp. Kr9, обнаруживающего 99.22 и 99.13% сходства генов 16S рРНК с типовыми штаммами *Methylocystis echinoides* IMET 10491^T и *Methylocystis parvus* OBBP^T.

Ключевые слова: термотолерантные метанотрофные бактерии, речные осадки, *Methylomonas*, *Methylomagnum*, *Methylocystis*, рост на метане

DOI: 10.31857/S0026365621050141

Аэробные метанотрофные бактерии – это уникальная группа прокариот, структурно и функционально специализированных на использовании метана (CH₄) в качестве источника углерода и энергии (Hanson, Hanson, 1996; Гальченко, 2001; Trotsenko, Murrell, 2008; Khmelennina et al., 2018). В настоящее время известно около трех десятков родов метанотрофных бактерий, которые принадлежат к классам *Gamma*proteobacteria (метанотрофы I типа) и *Alphaproteobacteria* (метанотрофы II типа), а также несколько родов метанотрофов, относящихся к филе *Verrucomicrobia* (Dedysh, Knief, 2018). Метанотрофные бактерии широко распространены в местообитаниях с высокой доступностью метана, таких как донные осадки пресноводных экосистем (Beck et al., 2013; Deutzmann et al., 2014), болота (Dedysh, 2009; Danilova

et al., 2016), рисовые чеки (Ma et al., 2013; Vaksmaa et al., 2017), покрывающие почвы полигонов твердых бытовых отходов (Cébron et al., 2007; Kumaresan et al., 2009) и др. Биологическое окисление метана является важным звеном глобального цикла CH₄, а также и глобального круговорота углерода в природе (Conrad, 2009). Метанотрофы, однако, имеют также и значительный биотехнологический потенциал (Троценко, Хмеленина, 2009; Conrad, Gonzalez, 2014; Kalyuzhnaya et al., 2020). Микробная конверсия метана, являющегося доступным и сравнительно дешевым сырьем, открывает перспективы производства продуктов с добавленной стоимостью (Strong et al., 2015).

Устойчивый интерес к развитию биотехнологий на основе использования метанотрофных бактерий появился в 70-е годы XX в. Было пока-

зано, что метанотрофные бактерии могут быть источником биопротеина, синтезируемого на основе метана (Григорян, Горская, 1970). Масштабное промышленное производство кормового белка (Гаприна) из природного газа с использованием термотолерантного метанотрофа *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 было реализовано в СССР в середине 1980-х годов. По составу и количеству незаменимых аминокислот биомасса метанотрофов сопоставима с рыбной и соевой мукой и, следовательно, имеет определенные преимущества относительно ряда продуктов растительного происхождения (Coty, 1969). Особенно выделяются метанотрофы класса *Gammaproteobacteria*, имеющие наиболее высокое содержание белка и незаменимых аминокислот (Плясов, 1988).

Экономическая целесообразность производства микробного белка из природного газа напрямую зависит от продуктивности метанотрофных микроорганизмов (Ritala et al., 2017). Производственные штаммы должны обладать высокой скоростью роста, что характерно в первую очередь для термотолерантных или умеренно термофильных метанотрофных бактерий. Исходная технология получения бактериального белка из метана была реализована с использованием термотолерантного метанотрофа *Methylococcus capsulatus*. Аналогичные производства, налаженные в других странах, опираются на использование штаммов того же вида, однако подобная узость спектра продуцентов существенно тормозит развитие этой технологии. Число таких штаммов ограничено, так как процедура выделения метанотрофов в чистых культурах сложна методически и может занимать до нескольких лет. Долгое время *Methylococcus capsulatus* Bath оставался самым быстрорастущим метанотрофным микроорганизмом с максимально зарегистрированной удельной скоростью роста 0.37 ч^{-1} (Joergensen, Degn, 1987). За последние годы, однако, опубликованы несколько работ по получению штаммов рода *Methylomonas*, для которых аналогичный показатель составил 0.39 и 0.40 ч^{-1} (Guo et al., 2017; Kim et al., 2018). Это наиболее высокие значения удельной скорости роста, зарегистрированные для метанотрофных бактерий. Таким образом, вопрос о возможностях и пределах роста метанотрофных бактерий остается открытым, и поиск альтернативных продуцентов с улучшенными свойствами является перспективной задачей биотехнологии получения кормового белка на основе метанотрофных микроорганизмов.

Охарактеризованные представители термотолерантных и умеренно термофильных метанотрофных бактерий принадлежат к родам *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylothermus* и *Methylomarinovum* (Троценко и соавт., 2009; Hirayama et al., 2014; Dedysh, Knief, 2018). Метанотрофы рода *Methylothermus*

населяют термальные пресноводные источники; эти бактерии крайне нестабильны в культивировании и быстро теряют жизнеспособность. Метанотрофы рода *Methylomarinovum* населяют морские гидротермы и требуют морскую воду для культивирования. Представители *Methylothermus* и *Methylomarinovum*, таким образом, малоприспособлены для производственных целей. Спектр местобитаний *Methylococcus* и *Methylocaldum* включает воду и осадки пресноводных экосистем, рисовые чеки, полигоны твердых бытовых отходов и компосты (Knief, 2015).

Целью настоящей работы являлось выделение новых штаммов термотолерантных метанотрофных бактерий, отличающихся высокими скоростями роста, из образцов донного осадка реки Черная, Крым.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов и аналитические методы. В работе был использован образец верхнего слоя (0–2 см) донного осадка реки Черная, Крым (44.59° с.ш., 33.61° в.д.). Отбор проб донных осадков и придонной воды проводили акриловой грунтовой трубой с вакуумным затвором. При помощи экстрактора в полевых условиях с керна срезали верхний 2-см слой донных осадков. Пористость и влажность осадка определяли, соответственно, как процентную долю объема и массы поровой воды в осадке. Гидрохимические параметры проб воды определяли стандартными аналитическими методиками. Температуру воды и общую минерализацию измеряли в полевых условиях портативным анализатором качества воды TDS-3 M. Определение содержания углерода органического (C_{org}) в колонках донных отложений выполняли, согласно спектрофотометрической методике, после сульфохромового сжигания органического вещества. Окисление органических соединений проводили в воздушно-сухих пробах донных отложений. Органические вещества донных осадков окисляли при температуре 125°C 0.4 N раствором бихромата калия в концентрированной серной кислоте в соотношении 1 : 1. Измерение оптических плотностей выполняли после осаждения минеральных частиц на спектрофотометре при длине волны 590 нм на приборе Helios Alfa ("Thermo Fisher Scientific", США). Для извлечения метана из проб воды и донных отложений использовали способ фазово-равновесной дегазации (Большаков, Егоров, 1987). Определение концентраций метана в воде и донных отложениях проводили на хроматографе HP 5890 ("Hewlett Packard", США) со стальной набивной колонкой (длина колонки – 1 м, внутренний диаметр – 2 мм, сорбент "Porapak Q" 80/100 меш., "Serva") и пламенно-ионизационным детектором при следующих условиях: газ-носитель – азот, объемная

скорость 30 мл мин⁻¹, температура детектора – 225°C, инжектора – 120°C. Часть отобранного ила использовали в качестве инокулята для получения накопительной культуры метанотрофных бактерий, тогда как другую его часть хранили при –20°C для последующей экстракции тотальной ДНК.

Получение накопительных культур метанотрофных бактерий. Для получения накопительной культуры метанотрофов использовали минеральную среду NMS (Nitrate Mineral Salts), разбавленную в соотношении 2 : 5 и содержащую (г/л): KNO₃ – 0.2; MgSO₄ · 7H₂O – 0.2; CaCl₂ · 2H₂O – 0.04; 1% (об./об.) 200 мМ фосфатного буфера (рН 7.0) и 0.1% (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов (Гальченко, 2001) следующего состава (г/л): ЭДТА – 5; FeSO₄ · 7H₂O – 2; ZnSO₄ · 7H₂O – 0.1; MnCl₂ · 4H₂O – 0.03; CoCl₂ · H₂O – 0.2; CuCl₂ · 5H₂O – 0.1; NiCl₂ · 6H₂O – 0.02; Na₂MoO₄ – 0.03. Один грамм ила вносили во флаконы общим объемом 500 мл со 100 мл жидкой среды. В газовую фазу флаконов вводили метан до 30 об. % и инкубировали на шейкере (120 об./мин) при температуре 35°C в течение 10 дней.

Молекулярное профилирование состава микробного сообщества образца ила и полученной из него накопительной культуры метанотрофов. Для выделения тотальной ДНК из исследуемого речного осадка использовали три навески ила по 0.5 г каждая. Выделение ДНК из полученной накопительной культуры метанотрофных бактерий проводили в двукратной повторности с использованием образцов клеток, осажженных из 5 мл исследуемой культуры. ДНК выделяли с использованием набора FastDNA SPIN kit for soil (“MP Biomedicals”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Полученные образцы ДНК хранили до анализа при –20°C. Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательности вариабельного региона V3–V4 гена 16S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦР с использованием праймеров PRK341F (5'-ССТАСGGGRBGCASCAG-3') и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATСТААТ-3'). Полученные ПЦР фрагменты использовали для приготовления библиотеки для секвенирования с помощью наборов Nextera XT DNA Library Prep Kit (“Illumina”, США) по протоколам производителя. Полученные библиотеки секвенировали на MiSeq (“Illumina”, США) с использованием наборов MiSeq Reagent Kit V3 (в формате парных чтений 2 × 300 нт). Полученный набор фрагментов последовательностей 16S рРНК анализировали с использованием программных модулей пакета QIIME 2 v.2018.8 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). Объединение нуклеотидных последовательностей, контроль качества и выбраковку химерных последователь-

ностей проводили с помощью плагина DADA2 (Callahan et al., 2016). Далее последовательности кластеризовали в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на видовом уровне идентичности (97% сходства) с помощью плагина VSEARCH (Rognes et al., 2016) и базы данных Silva v. 138, содержащей последовательности гена 16S рРНК (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014). Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили методом BLASTN по базе Silva v. 138 (Altschul et al., 1997). Полученный из образцов ила и накопительной культуры пул фрагментов нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК депонирован в ГенБанке под номером PRJNA722466.

Получение и идентификация изолятов метанотрофных бактерий. Получение чистых культур метанотрофных бактерий проводили с использованием минеральной среды NMS 2 : 5 и следующих альтернативных подходов: 1) многократных предельных разведений культуры в жидкой среде; 2) рассева разбавленной суспензии клеток на агаризованный вариант среды для получения колоний; 3) рассева суспензии клеток на жидкую среду с использованием культуральных планшетов. Для приготовления предельных разведений использовали серии флаконов объемом 60 мл, содержащие 5 мл среды. Флаконы герметично закрывали, вводили метан шприцем с фильтром до 30% CH₄ в газовой фазе и инкубировали на качалке (120 об./мин). Культуру, выросшую во флаконе с наибольшим разведением, микроскопировали и подвергали последующему рассеву до получения культуры, состоящей из морфологически одинаковых клеток. В случае рассевов суспензии культур на агаризованную среду, чашки помещали в эксикаторы с 30% метана в газовой фазе и инкубировали в течение 10 сут при 30, 35 и 42°C. Формирующиеся колонии отсеивали во флаконы с жидкой средой, полученные культуры проверяли на чистоту с помощью фазово-контрастной микроскопии и вновь рассевали на агаризованную среду до получения чистой культуры. Процедура получения изолятов с использованием культуральных планшетов была предложена ранее для селекции быстрорастущих штаммов метанотрофов (Hoefman et al., 2012). Аликвоты накопительной культуры рассевали методом предельных разведений на 48-луночные культуральные планшеты (“Eppendorf”). Использовали серии из 15 последовательных предельных разведений; объем среды в каждой из лунок составлял 100 мкл. Планшеты помещали в герметичные пакеты “Genbag anaerobic” (“BioMérieux”, Франция) с заданным составом газовой фазы (20–40% метана и 60–80% воздуха) и инкубировали на шейкере (120 об./мин) при температурах инкубации 35 и 42°C. Замену газовой фазы в пакетах проводили каждые 2 дня. Рост культур определяли микроскопически и с помощью регистрации оптической плотности

при длине волны 600 нм, которую измеряли на спектрофотометре Biophotometer AG 22331 (“Eppendorf”).

Идентификацию полученных изолятов осуществляли путем анализа последовательностей генов 16S рРНК, ПЦР-амплификацию которых проводили с использованием универсальных для бактерий праймеров (Weisburg et al., 1991). Очистку ПЦР-амплифицированных фрагментов осуществляли с использованием набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. Секвенирование амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК проводили на базе ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН. Определенные в работе последовательности генов 16S рРНК изолятов метанотрофных бактерий депонированы в ГенБанке под номерами MW830155–MW830156 и MW884260.

Анализ морфологии и ультратонкого строения клеток изолятов. Фотографии клеток изолятов получали с помощью микроскопа Zeiss AxioPlan 2 и цифровой фотокамеры Zeiss с матрицей 6 Мпкс, с использованием программного пакета AxioVision v. 4.2.

Исследование ультратонкого строения клеток изолятов метанотрофов проводили с помощью электронной микроскопии. Для этого образцы клеток фиксировали раствором 2.5% глутарового альдегида в какодилатном буфере (0.05 М раствор какодилата натрия, рН 7.0–7.5) и выдерживали в течение суток при 4°C; затем трижды промывали тем же буферным раствором в течение 5 мин и фиксировали в растворе OsO₄ (1% OsO₄ + 0.7% раствор рутениевого красного в какодилатном буфере) 1.5 ч при 4°C. После фиксации образцы заключали в 2% агар-агар и последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата в 30% этиловом спирте в течение 4 ч, далее в 70% этаноле в течение 12 ч при 4°C. Материал обезвоживали в 96% этиловом спирте (2 раза по 15 мин), затем в абсолютном ацетоне (3 раза по 10 мин). Образцы пропитывали смолой ЭПОН-812 (Epoxy Embedding Medium Эпон® 812, “Sigma-Aldrich”, США) выдерживая в смеси смола : ацетон в соотношении 1 : 1 (1 ч), затем в смеси смола : ацетон в соотношении 2 : 1 (1 ч). Полученный материал заливали в капсулы со смолой и проводили полимеризацию при температуре 37°C в течение суток, затем при 60°C в течение суток. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (“LKB”, Швеция) и контрастировали в водном растворе 3% уранилацетата (30 мин), затем в водном растворе 4% цитрата свинца (30 мин). Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM 100CXII (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и рабочем увеличении 5000–50000. Фотодокументирование материалов

проводили с помощью цифровой системы вывода оптических изображений Morada G2.

Оценка ростовых характеристик культур метанотрофов. Определение температурного оптимума и ростовых характеристик изолятов проводили при культивировании в жидкой среде NMS 2 : 5 во флаконах с 30 об. % метана в газовой фазе и инкубации на шейкере (150 об./мин) в диапазоне температур от 20 до 50°C, с шагом в 5°C. Рост оценивали путем регулярных измерений оптической плотности культуры на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer AG 22331 (Германия) при длине волны 600 нм. Расчет удельной скорости роста (μ , ч⁻¹) проводили в экспоненциальной фазе роста культур по формуле: $\mu = (\ln(OD_2) - \ln(OD_1)) / (t_2 - t_1)$, где OD₁ и OD₂ – значения оптической плотности культуры в начале и конце экспоненциальной фазы роста, t_1 и t_2 – соответствующие им временные точки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика образцов донного осадка реки Черная. Осадок был представлен тонкодисперсным илом светло-серого цвета с рыжим наилком, без запаха сероводорода, без вкраплений гравия и без остатков водорослей-гидрофитов. Пористость осадка составляла 85%, содержание органического углерода – 7% от массы пробы, влажность – 75%, соленость – менее 0.3‰. Концентрация растворенного метана была равна 20.5 мкмоль/л. Величина общей минерализации воды составила 2.9 г л⁻¹; в составе растворенных соединений были идентифицированы (мкг/л): NO₂⁻ – 27.6; NO₃⁻ – 869; NH₄⁺ – 57.9; PO₄³⁻ – 48.3. Температура воды и осадка в момент отбора образцов составила 22°C.

Молекулярный анализ состава микробного сообщества в донном осадке. В общей сложности, из образца осадка реки Черная было получено 88655 частичных последовательностей генов 16S рРНК со средней длиной ~300 нт. В результате процедуры контроля качества, объединения парных последовательностей и выбраковки химер было получено 17437 последовательностей, задействованных для анализа. Индекс Good’s coverage, рассчитываемый для оценки глубины секвенирования, составил 0.99 для всех повторностей. Индексы разнообразия Chao1 и Shannon варьировали, соответственно, в диапазонах 102–179 и 6.29–7.06. Число операционных таксономических единиц (ОТЕ), соответствующих видовому уровню идентичности последовательностей (97%), составляло от 100 до 172.

Наиболее многочисленная группа полученных из осадка реки Черная фрагментов гена 16S рРНК принадлежала представителям *Gamma*proteobacteria (32.1% всех прочтений). Другими численно значимыми компонентами микробного сообщества

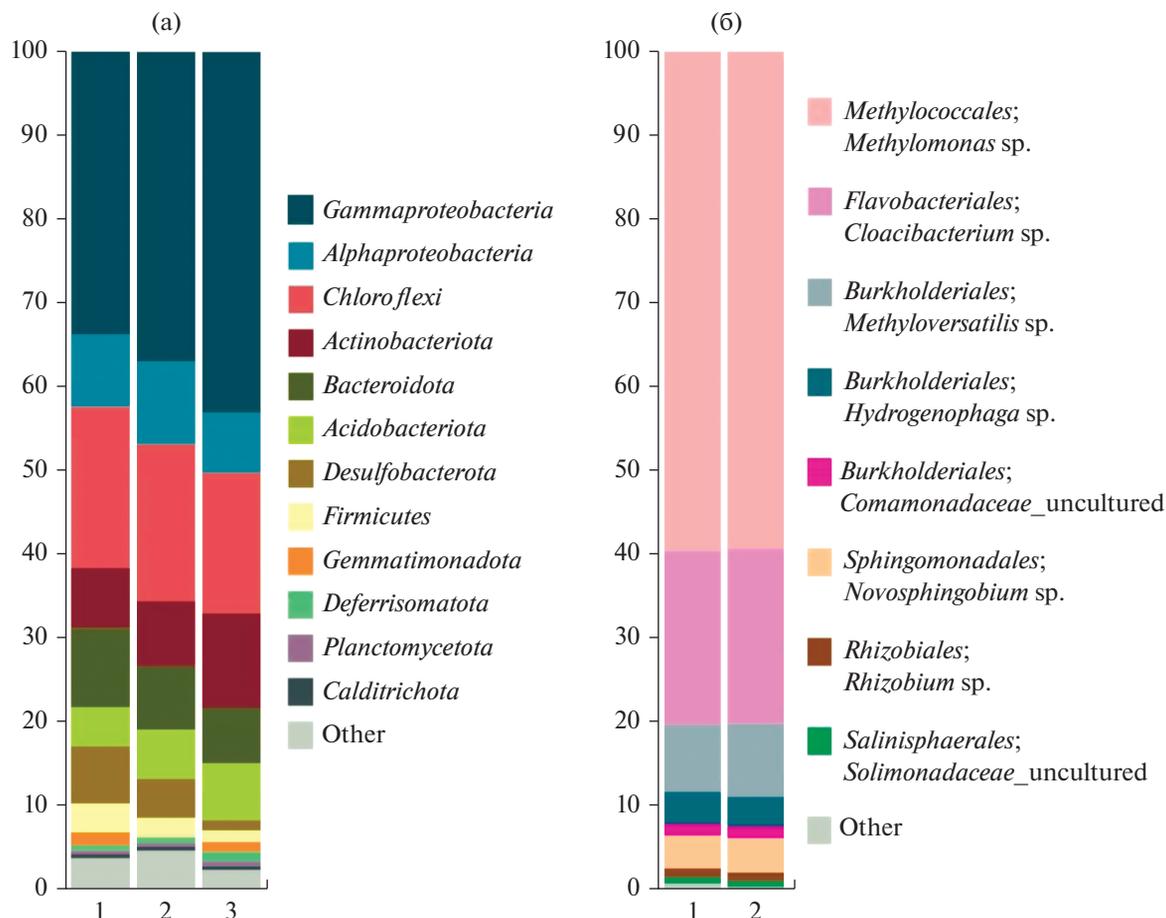


Рис. 1. Состав бактериального сообщества: а – в природном образце ила; б – в накопительной культуре, сформированной после 1 мес. культивирования в условиях повышенных температур и в присутствии метана в качестве источника углерода.

ила являлись *Chloroflexi* (20.2%), *Alphaproteobacteria* (9.1%), *Bacteroidota* (8.2%), *Acidobacteria* (7.2%), *Desulfobacterota* (6.2%), *Actinobacteria* (5.8%) и *Firmicutes* (3.0%) (рис. 1а). На уровне семейств доминирующими компонентами микробного сообщества ила являлись представители *Anaerolineaceae* (15.2–16.7%), *Thermoanaerobaculaceae* (4.1–5.3%), *Haliaceae* (3.4–5.9%) и неопisanного пока семейства порядка *Rhizobiales* (1.5–8.4%). Микроорганизмы, принадлежащие к вышеперечисленным семействам, однако, не могли быть классифицированы до рода и представляли новые, неописанные пока таксоны. Ни одна из идентифицированных в речном иле ОТЕ не могла быть классифицирована как принадлежащая метанотрофным бактериям, что свидетельствовало о низкой численности метанотрофов в исследуемом образце ила. Этап получения накопительных культур, таким образом, был необходимым условием получения изолятов целевых микроорганизмов.

Получение и молекулярный анализ накопительных культур. Во флаконах со средой NMS 2 : 5,

инокулированной образцами осадка, после 10 сут культивирования при 35°C наблюдалось активное развитие метанотрофного микробного сообщества. Его анализ с помощью фазово-контрастной микроскопии выявил доминирование подвижных клеток палочковидной морфологии, характерной для представителей рода *Methylomonas*. В результате молекулярного анализа из этой накопительной культуры было получено 26986 частичных последовательностей генов 16S рНК со средней длиной ~250 нт. Из них после процедуры контроля качества и выбраковки химер было задействовано для анализа 23970 последовательностей, что составило не менее 87% от общего пула прочтений гена 16S рНК. Общее видовое разнообразие было представлено 18 ОТЕ. Около 60% фрагментов всех генов 16S рНК принадлежали представителям рода *Methylomonas* (рис. 1б). Последние были представлены одной ОТЕ видового уровня, обнаруживающей 98% сходства последовательностей гена 16S рНК с *Methylomonas koyamae* Fw12E-Y^T. Другие основные компоненты полученной нако-

Таблица 1. Результаты идентификации изолятов метанотрофных бактерий, полученных из осадков реки Черная

Штамм	Номер последовательности гена 16S рРНК в ГенБанке	Ближайший филогенетически родственный типовой штамм метанотрофов	% сходства генов 16S рРНК
М9	MW884260	<i>Methylomonas koyamae</i> Fw12E-Y ^T	97.2
Кг7	MW830155	<i>Methylomagnum ishizawai</i> RS11D-Pr ^T	99.53
Кг9	MW830156	<i>Methylocystis echinoides</i> IMET 10491 ^T	99.22
		<i>Methylocystis parvus</i> OBVP ^T	99.13

питательной культуры были представлены бактериями родов *Cloacibacterium* (20.8%), *Methyloversatilis* (8.0%), *Novosphingobium* (3.9%) и *Hydrogenophaga* (3.9%).

Выделение изолятов метанотрофных бактерий.

Полученная на раннем этапе культивирования накопительная культура содержала в себе лишь один доминирующий вид метанотрофов. Для получения этих бактерий в чистой культуре был проведен прямой высеv клеточной суспензии на агаризованную среду NMS 2 : 5, что позволило получить изолят М9, клетки которого были представлены короткими подвижными палочками длиной 2–4 мкм (рис. 2а). Анализ ультратонких срезов клеток выявил наличие стопок внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ), характерных для метанотрофов I типа (рис. 2б). В жидкой среде штамм М9 показывал тенденцию к хлопьевидному росту, благодаря наличию ярко выраженной слизистой капсулы, типичной для метанотрофов рода *Methylomonas*. Анализ гена 16S рРНК подтвердил принадлежность штамма М9 к роду *Methylomonas* (табл. 1), а также показал идентичность последовательности гена 16S рРНК штамма М9 таковой у соответствующей ОТЕ, идентифицированной в составе накопительной культуры. Уровень сходства с ближайшим типовым штаммом *M. koyamae* Fw12E-Y^T составил 97.2%, что может означать принадлежность штамма М9 к новому виду рода *Methylomonas*.

Для более полного выявления разнообразия метанотрофов, присутствующих в исходной накопительной культуре в низкой численности, в виде единичных клеток, диапазон условий культивирования был расширен за счет варьирования температур инкубации от 30 до 42°C и рН среды от 5 до 7 с одновременным увеличением временного диапазона между пересевами до десяти дней. Эта стратегия позволила получить ряд смешанных культур с несколькими новыми морфотипами метанотрофных бактерий, отличными от морфотипа штамма М9. Так, культивирование на среде с рН 7.0 при температуре 30°C позволило получить смешанную культуру, в которой, наряду с *Methylomonas*-подобными метанотрофами, присутствовал также метанотроф с крупными клет-

ками овоидной морфологии. Изолят этих метанотрофов, штамм Кг7, был получен с применением метода выделения в планшетах. Анализ последовательности гена 16S рРНК штамма Кг7 показал его принадлежность к виду *Methylomagnum ishizawai* (табл. 1). Штамм Кг7 был представлен одиночными подвижными клетками овальной формы, размером до 5 мкм (рис. 2в), на ультратонких срезах которых выявлялись ВЦМ I типа (рис. 2г).

Изменение условий культивирования первичной накопительной культуры в сторону понижения рН среды до 5.8 с повышением температуры до 40°C привело к появлению в составе сообщества единичных клеток метанотрофов грушевидной формы. Последующее использование метода выделения в планшетах позволило получить изолят этих метанотрофов, штамм Кг9. Клетки штамма Кг9 представляли собой подвижные в экспоненциальной фазе, изогнутые палочки или вибриониды размером 1–4 мкм (рис. 2д). Анализ ультратонких срезов клеток показал наличие ламеллярных ВЦМ II типа, расположенных на периферии клетки, параллельно цитоплазматической мембране (рис. 2е). Анализ гена 16S рРНК показал принадлежность штамма Кг9 к роду *Methylocystis*, со сходством 99.22 и 99.13% сходства генов 16S рРНК с типовыми штаммами *Methylocystis echinoides* IMET 10491^T и *Methylocystis parvus* OBVP^T. Точное установление видовой принадлежности штамма Кг9, таким образом, требует применения сравнительного геномного анализа.

Ростовые характеристики изолятов метанотрофов. Зависимость удельной скорости роста изолятов от температуры инкубации представлена на рис. 3. Все культуры были способны к росту до 48°C, однако имели различные температурные предпочтения. Наиболее активный рост *Methylomonas* sp. М9 имел место в диапазоне 20–30°C, с оптимумом при 25°C ($\mu = 0.20 \text{ ч}^{-1}$). *Methylomagnum ishizawai* Кг7 демонстрировал активный рост в диапазоне температур 30–40°C с оптимумом при 35°C ($\mu = 0.19 \text{ ч}^{-1}$). Наиболее высокий температурный оптимум, 40°C, и наиболее широкий температурный диапазон активного роста, 25–45°C, был зарегистрирован для *Methylocystis* sp. Кг9. Удельная скорость роста штамма Кг9 при 40°C со-

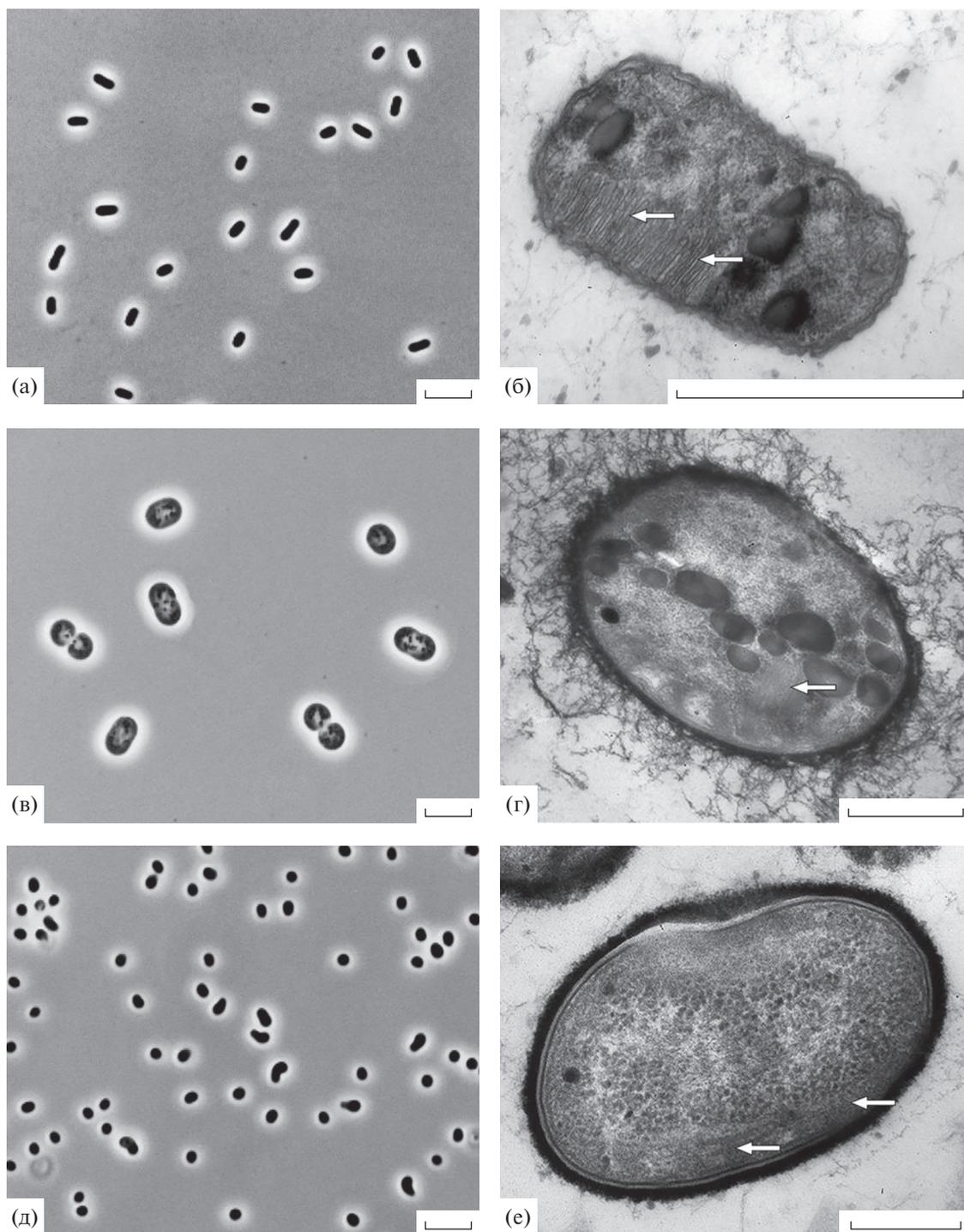


Рис. 2. Морфология (а, в, д) и ультратонкие срезы клеток (б, г, е) изолятов метанотрофных бактерий: *Methylomonas* sp. M9 (а, б), *Methylomagnum* sp. Кг7 (в, г), *Methylocystis* sp. Кг9 (д, е). Стрелками указаны внутрицитоплазматические мембраны. Маркер — 5 мкм (а, в, д) и 1 мкм (б, г, е).

ставила 0.21 ч^{-1} (рис. 3). Таким образом, все полученные в работе штаммы метанотрофов могли быть охарактеризованы как термотолерантные мезофилы. Наиболее активный рост при температурах $40\text{--}45^\circ\text{C}$ демонстрировал *Methylocystis* sp. Кг9.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами был применен молекулярный метод оценки состава микробного сообщества на основе секвенирования гена 16S рРНК в сочетании с классическими подходами культиви-

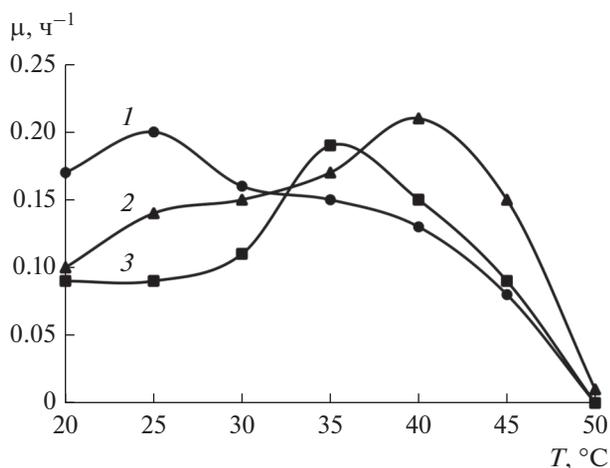


Рис. 3. Зависимость удельной скорости роста изолятов *Methylomonas* sp. M9 (1), *Methylocystis* sp. Kг9 (2) и *Methylomagnum* sp. Kг7 (3) на минеральной среде с метаном от температуры инкубации в диапазоне от 20 до 50°C.

рования микроорганизмов, направленными на поиск новых быстрорастущих изолятов метанотрофных бактерий. Сайт отбора образцов располагался в субтропическом поясе, для которого характерны повышенные среднемесячные температуры. Концентрация растворенного метана в образцах (20 мкмоль/л) была сопоставима с обнаруженными в пресноводных осадках озера Вашингтон в США (2–170 мкмоль/л) (Auman et al., 2000) и Боденского озера в Германии (до 140 мкмоль/л) (Rahalkar et al., 2009). Оценка обилия метанотрофных бактерий в этих местообитаниях дала величины численности $\approx 10^9$ клеток $г^{-1}$ сухой биомассы для верхнего слоя осадка озера Вашингтон и 10^6 – 10^9 клеток $г^{-1}$ влажного осадка в различных локациях Боденского озера (Costello et al., 2002; Deutzmann et al., 2011). Исследование состава микробного сообщества осадка озера Вашингтон с помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК показало, что доля фрагментов метанотрофных бактерий составила около 10% (Beck et al., 2013). В настоящей работе молекулярный анализ не выявил наличия метанотрофов в составе исследуемого микробного сообщества. Более того, для образца в целом было характерно низкое микробное разнообразие. Специфика места отбора образцов заключается в том, что для полузакрытой Севастопольской бухты характерны сейши, которые могут значительно влиять на термохалинные параметры воды кутовой части бухты, захватывая также исследованный район. В результате волновых процессов может меняться направление течения, и, как следствие, гидрохимические показатели воды. В точке отбора образцов соленость может меняться от 0 до 4‰ (неопубликованные данные). В связи с этим результаты одномоментного отбора проб

показывают некоторое состояние в диапазоне возможных состояний гидрологических характеристик воды реки. Вполне вероятно, что изменчивые условия не способствуют формированию устойчивого сообщества, что потенциально может проявляться в его низком разнообразии и, как следствие, в отсутствии достаточного для детекции молекулярными методами количества метанотрофных бактерий. Тем не менее, отрицательный результат по наличию последовательностей гена 16S рРНК метанотрофных бактерий не исключал их присутствия в образцах осадка реки Черная. Ранее было показано, что применение культуральных подходов позволяет выявлять микроорганизмы, детекция которых молекулярными методами затруднена из-за их низкой представленности в сообществе (Houghton, Stewart, 2020). В настоящей работе использование селективных температур инкубации в диапазоне от 30 до 42°C позволило получить ряд чистых культур метанотрофных бактерий с различающимися температурными оптимумами.

Изолят Kг7 обнаруживал 99,5% сходства последовательности гена 16S рРНК с отмеченной у *Methylomagnum ishizawai* RS11D-Pr^T, мезофила, растущего при 20–37°C с оптимумом 31–33°C (Khalifa et al., 2015). Температурный оптимум штамма Kг7 (35°C) был несколько выше описанного ранее для этого вида метанотрофов. Для изолята рода *Methylomonas*, штамма M9, максимальная скорость роста (0,2 ч⁻¹) была зарегистрирована при 25°C, что выше опубликованных величин для ряда других охарактеризованных представителей этого рода (Morinaga et al., 1976; Danilova et al., 2013). По опубликованным данным наиболее высокий показатель скорости роста (0,386 ч⁻¹) среди всех известных на данный момент метанотрофных бактерий был получен как раз для одного из штаммов *Methylomonas* (Guo et al., 2017), однако он был зарегистрирован при росте в ферментере. Скорость роста этого же штамма при периодическом культивировании во флаконах была существенно ниже и составила 0,2 ч⁻¹. Третий изолят, штамм Kг9, отличался стабильным ростом, как в жидкой культуре, так и на агаризованной среде, с оптимумом при 42°C. Для близкородственного штамма *Methylocystis parvus* ОВВР^T была зарегистрирована скорость роста 0,1 ч⁻¹ (Pieja et al., 2011), в то время как штамм Kг9 рос в два раза быстрее (0,2 ч⁻¹). В ряде исследований было показано, что *Methylocystis parvus* является перспективным продуцентом полигидроксibuтирата (Rostkowski et al., 2013; Sundstrom, Criddle, 2015; Rumah et al., 2021). Штаммы этого вида метанотрофов использовали для укрепления бетона биогенным способом за счет окисления формиата (Ganendra et al., 2015), а также для получения продуктов с добавленной стоимостью при совместном культиви-

вировании в аквакультуре с водорослью *Scenedesmus* sp. (van der Na et al., 2012). *Methylocystis parvus* относится к метанотрофам II типа, которые, в отличие от метанотрофов I типа, не склонны к спонтанному лизису клеток, хорошо сохраняются при длительном хранении и могут достигать более высоких значений оптической плотности (Murrell, 2010). В сочетании с высокой скоростью роста эти качества штамма Kг9 могут быть востребованы в промышленном производстве микробного белка.

Таким образом, в результате данной работы было получено 3 новых изолята термотолерантных метанотрофных бактерий, один из которых – *Methylocystis* sp. Kг9 – демонстрировал наиболее высокую удельную скорость роста в периодической культуре и наиболее широкий температурный диапазон роста. Подбор оптимальных параметров и условий культивирования в модельных ферментерах представляет следующий шаг на пути установления ростового потенциала этих бактерий и определения их применимости для производства белка из природного газа.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались животные или участвовали люди.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования предложена С.Н. Дедыш и Н.В. Пименовым. Отбор образцов и регистрация их физико-химических параметров выполнены Т.В. Малаховой и А.И. Мурашовой. Молекулярные анализы микробного разнообразия, а также выделение и идентификация изолятов метанотрофов проведены И.Ю. Ошкиным и О.В. Даниловой. Оценка ростовых характеристик изолятов выполнена Р.З. Сулеймановым, электронная микроскопия – Е.Н. Тихоновой. Текст статьи написан И.Ю. Ошкиным, Н.В. Пименовым и С.Н. Дедыш. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Большаков А.М., Егоров А.В. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометриче-

ских исследованиях // Океанология. 1987. Т. 27. № 5. С. 861–862.

Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500 с.

Григорян А.Н., Горская Л. Использование природного газа для микробиологического синтеза. М.: ОНТИ Микробиопром, 1970. 90 с.

Плясов Ю.М. Комплексная оценка питательной ценности кормового микробного белка // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 3. С. 402–408.

Троценко Ю.А., Медведкова К.А., Хмеленина В.Н., Ешинимаяев Б.Ц. Термофильные и термотолерантные аэробные метанотрофы // Микробиология. 2009. Т. 78. № 4. С. 435–450.

Trotsenko Y.A., Medvedkova K.A., Khmelenina V.N., Eshinimayev B.Ts. Thermophilic and thermotolerant aerobic methanotrophs // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 387–401.

Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы. М.: ОНТИ ПНЦ РАН, 2009. 204 с.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.

Auman A.J., Stolyar S., Costello A.M., Lidstrom M.E. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 5259–5266.

Beck D.A.C., Kalyuzhnaya M.G., Malfatti S., Tringe S.G., del Rio T.G., Ivanova N., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the *Methylococcaceae* and the *Methylophilaceae* // PeerJ. 2013. V. 1:e23.

Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.

Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 581–583.

Cébron A., Bodrossy L., Chen Y., Singer A.C., Thompson I.P., Prosser J.I., Murrell J.C. Identity of active methanotrophs in landfill cover soil as revealed by DNA-stable isotope probing // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 62. P. 12–23.

Conrad R. The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved // Environ. Microbiol. Rep. 2009. V. 1. P. 285–292.

Conrado R.J., Gonzalez R. Envisioning the bioconversion of methane to liquid fuels // Science. 2014. V. 343. P. 621–623.

Costello A.M., Auman A.J., Macalady J.L., Scow K.M., Lidstrom M.E. Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment // Environ. Microbiol. 2002. V. 4. P. 443–450.

Coty V. A critical review of the utilization of methane // Biotech. Bioeng. Symp. 1969. V. 1. P. 105–117.

Danilova O.V., Kulichevskaya I.S., Rozova O.N., Detkova E.N., Bodelier P.L.E., Trotsenko Y.A., Dedysh S.N. *Methylomonas*

- paludis* sp. nov., the first acidtolerant member of the genus *Methylomonas*, from an acidic wetland // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. № 6. P. 2282–2289.
- Danilova O.V., Belova S.E., Gagarinova I.V., Dedysh S.N. Microbial community composition and methanotroph diversity of a subarctic wetland in Russia // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 583–591.
- Dedysh S.N. Exploring methanotroph diversity in acidic northern wetlands: Molecular and cultivation-based studies // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 655–669.
- Dedysh S.N., Knief C. Diversity and phylogeny of described aerobic methanotrophs // Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability / Ed. Kalyuzhnaya M., Xing X. Springer, Cham, 2018. P. 17–42.
- Deutzmann J.S., Hoppert M., Schink B. Characterization and phylogeny of a novel methanotroph, *Methyloglobulus morosus* gen. nov., spec. nov // Syst. Appl. Microbiol. 2014. V. 37. P. 165–169.
- Deutzmann J.S., Wörner S., Schink B. Activity and diversity of methanotrophic bacteria at methane seeps in eastern Lake Constance sediments // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 2573–2581.
- Ganendra G., Wang J., Ramos J.A., Derluyn H., Rahier H., Cnudde V., Ho A., Boon N. Biogenic concrete protection driven by the formate oxidation by *Methylocystis parvus* OBBP. // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 786.
- Guo W., Li D., He R., Wu M., Chen W., Gao F., Zhang Z., Yao Y., Yu L., Chen S. Synthesizing value-added products from methane by a new *Methylomonas* // J. Appl. Microbiol. 2017. V. 123. P. 1214–1227.
- van der Ha D., Nachtergaele L., Kerckhof F.M., Rameiyanti D., Bossier P., Verstraete W., Boon N. Conversion of biogas to bioproducts by algae and methane oxidizing bacteria // Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. P. 13425–13431.
- Hanson R., Hanson T. Methanotrophic bacteria // Microbiol. Rev. 1996. V. 60. P. 439–471.
- Hirayama H., Abe M., Miyazaki M., Nunoura T., Furushima Y., Yamamoto H., Takai K. *Methylomarinovum caldicentralii* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic methanotroph isolated from a shallow submarine hydrothermal system, and proposal of the family *Methylothermaceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 989–999.
- Hoefman S., van der Ha D., De Vos P., Boon N., Heylen K. Miniaturized extinction culturing is the preferred strategy for rapid isolation of fast-growing methane-oxidizing bacteria // Microb. Biotechnol. 2012. V. 5. P. 368–378.
- Houghton K.M., Stewart L.C. Temperature-gradient incubation isolates multiple competitive species from a single environmental sample // Access Microbiol. 2020. V. 2. P. 1–9.
- Joergensen L., Degn H. Growth rate and methane affinity of a turbidostatic and oxystatic continuous culture of *Methylococcus capsulatus* (Bath) // Biotechnol. Lett. 1987. V. 9. P. 71–76.
- Kalyuzhnaya M.G., Kumaresan D., Heimann K., Caetano N.S., Visvanathan C., Parthiba Karthikeyan O. Editorial: Methane: A bioresource for fuel and biomolecules // Front. Environ. Sci. 2020. V. 8. P. 8–10.
- Khalifa A., Gyu Lee C., Ogiso T., Ueno C., Dianou D., Demachi T., Katayama A., Asakawa S. *Methylomagnum ishizawai* gen. nov., sp. nov., a mesophilic type I methanotroph isolated from rice rhizosphere // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 3527–3534.
- Khmelenina V.N., Murrell J.C., Smith T.J., Trotsenko Y.A. Physiology and biochemistry of the aerobic methanotrophs // Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. F. Rojo. Springer, Cham, 2018. P. 1–25.
- Kim J., Kim D.H.D., Yoon S. Rapid isolation of fast-growing methanotrophs from environmental samples using continuous cultivation with gradually increased dilution rates // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 5707–5715.
- Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1346.
- Kumaresan D., Abell G.C.J., Bodrossy L., Stralis-Pavese N., Murrell J.C. Spatial and temporal diversity of methanotrophs in a landfill cover soil are differentially related to soil abiotic factors // Environ. Microbiol. Rep. 2009. V. 1. P. 398–407.
- Ma K., Conrad R., Lu Y. Dry/wet cycles change the activity and population dynamics of methanotrophs in rice field soil // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 4932–4939.
- Morinaga Y., Yamanaka S., Otsuka S.I., Hirose Y. Characteristics of a newly isolated methane oxidizing bacterium, *Methylomonas flagellata* nov. sp. // Agric. Biol. Chem. 1976. V. 40. P. 1539–1545.
- Murrell J.C. The aerobic methane oxidizing bacteria (Methanotrophs) BT // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. Timmis K.N. Springer, Heidelberg, 2010. P. 1953–1966.
- Pieja A.J., Sundstrom E.R., Criddle C.S. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 6012–6019.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. P. 590–596.
- Rahalkar M., Deutzmann J., Schink B., Bussmann I. Abundance and activity of methanotrophic bacteria in littoral and profundal sediments of lake Constance (Germany) // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 119–126.
- Ritala A., Häkkinen S.T., Toivari M., Wiebe M.G. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016 // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 2009.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics // PeerJ. 2016. V. 4. e2584.
- Rostkowski K.H., Pfluger A.R., Criddle C.S. Stoichiometry and kinetics of the PHB-producing type II methanotrophs *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylocystis parvus* OBBP // Bioresour. Technol. 2013. V. 132. P. 71–77.
- Rumah B.L., Stead C.E., Claxton Stevens B.H., Minton N.P., Grosse-Honebrink A., Zhang Y. Isolation and characterisation of *Methylocystis* spp. for poly-3-hydroxybutyrate production using waste methane feedstocks // AMB Express. 2021. V. 11. Art. 6.
- Strong P.J., Kalyuzhnaya M., Silverman J., Clarke W.P. A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for

generating multiple products from a single fermentation // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 215. P. 314–323.

Strong P.J., Xie S., Clarke W.P. Methane as a resource: Can the methanotrophs add value? // *Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 49. P. 4001–4018.

Sundstrom E.R., Criddle C.S. Optimization of methanotrophic growth and production of poly(3-hydroxybutyrate) in a high-throughput microbioreactor system // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 4767–4773.

Trotsenko Y.A., Murrell J.C. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy // *Adv. Appl. Microbiol.* 2008. V. 63. P. 183–229.

Vaksmas A., van Aalen T.A., Ettwig K.F., Lupotto E., Valè G., Jetten M.S.M., Lüke C. Stratification of diversity and activity of methanogenic and methanotrophic microorganisms in a nitrogen-fertilized Italian paddy soil // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1–15.

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.

Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W., Glöckner F.O. The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 643–648.

Thermotolerant Methanotrophic Bacteria from Sediments of the River Chernaya, Crimea, and Assessment of Their Growth Characteristics

I. Yu. Oshkin¹, O. V. Danilova¹, R. Z. Suleimanov¹, E. N. Tikhonova¹, T. V. Malakhova²,
I. A. Murashova², N. V. Pimenov¹, and S. N. Dedysh^{1,*}

¹*Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology,”
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Federal Research Center “Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences”, Sevastopol,
299011 Russia*

*e-mail: dedysh@mail.ru

Received April 13, 2021; revised April 23, 2021; accepted April 28, 2021

Abstract—The technology of single-cell protein production from natural gas is based on using thermotolerant methanotrophic bacteria with high growth rates on methane. So far, the spectrum of strains used for industrial purposes was restricted to members of the genus *Methylococcus*. This poses limitations to further development of this technology and fuels the search for new cultures of fast-growing methanotrophs. The later task was addressed in the present work by analyzing the sediment samples of the Chernaya River, Crimea. Molecular analysis of the microbial community composition in the sediment revealed *Gammaproteobacteria* as the predominant group (33–42% of all retrieved 16S rRNA gene fragments), as well as *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidota*, and *Acidobacteria* as other numerically significant community members. The methanotrophic enrichment culture obtained from the sediment contained bacteria of the genus *Methylomonas* as the major component, with the relative abundance of up to 60% of all 16S rRNA gene fragments. The use of various strategies for methanotroph isolation resulted in obtaining three isolates of target bacteria of the genera *Methylomonas*, *Methylomagnum* and *Methylocystis*. The optimal growth temperatures of these isolates were 25, 35, and 40°C, respectively. The highest specific growth rate in batch culture, 0.21 h⁻¹, was determined for *Methylocystis* sp. Kr9, which displayed 99.22 and 99.13% 16S rRNA gene sequence similarity to the type strains of two *Methylocystis* species, *Methylocystis echinoides* IMET 10491^T and *Methylocystis parvus* OBBP^T, respectively.

Keywords: thermotolerant methanotrophic bacteria, river sediments, *Methylomonas*, *Methylomagnum*, *Methylocystis*, growth on methane

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

GEMMATA PALUSTRIS SP. NOV., НОВЫЙ ПЛАНКТОМИЦЕТ, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ НИЗИННОГО БОЛОТА СЕВЕРА РОССИИ

© 2021 г. А. А. Иванова^а, *, И. С. Куличевская^а

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

*e-mail: ivanovastasja@gmail.com

Поступила в редакцию 22.04.2021 г.

После доработки 13.05.2021 г.

Принята к публикации 13.05.2021 г.

Планктомицеты являются типичными обитателями северных болотных экосистем. В настоящей работе сообщается о выделении нового планктомицета рода *Gemmata*, штамм G18^T из низинного болота северо-запада России. Этот изолят был представлен одиночными или собранными в небольшие группы сферическими клетками, обладающими подвижностью в экспоненциальной фазе роста. Штамм G18^T являлся хемоорганотрофным, психротолерантным мезофилом с оптимумом роста при pH 7.0 и температуре 15–20°C. В качестве источников углерода и энергии новый планктомицет предпочитал полисахариды пектин, ксилан, лихенан, ксантановую камедь и фитагель. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма G18^T обнаруживала 95.7–98.9% сходства по сравнению с отмеченной у пресноводных планктомицетов *Gemmata obscuriglobus* DSM 5831^T и “*Gemmata massiliana*” ПЛ30. Геном штамма G18^T, размером 9.23×10^6 п.о., включал 7631 белок-кодирующих генов и 3 копии оперона рРНК (генов 5S, 16S и 23S рРНК). Содержание G + C в ДНК составляло 65 мол. %. Согласно калькулятору ANI, сходство генома G18^T с ранее описанными представителями рода *Gemmata* составляло 86.0% с “*G. massiliana*” ПЛ30 и 79.7% с *G. obscuriglobus* DSM 5831^T. Ряд различий в фенотипических и генотипических свойствах позволил классифицировать штамм G18^T в качестве нового вида рода *Gemmata* – *Gemmata palustris* sp. nov. с типовым штаммом G18^T (=KCTC 82682 = VKM В-3541^T).

Ключевые слова: филогенетическая группа *Planctomycetes*, семейство *Gemmataceae*, род *Gemmata*, низинные болота

DOI: 10.31857/S0026365621050074

Семейство *Gemmataceae* объединяет почкующиеся аэробные хемоорганотрофные планктомицеты с клетками сферической или овальной формы, которые встречаются одиночно или собраны в розетки и дендрiformные структуры (Kulichevskaya et al., 2017). На текущий момент семейство насчитывает 7 родов: *Gemmata* (Franzmann, Skerman, 1984), *Zavarzinella* (Kulichevskaya et al., 2009), *Tuwongella* (Seeger et al., 2017), *Telmatocola* (Kulichevskaya et al., 2012), *Limnoglobus* (Kulichevskaya et al., 2020b), *Fimbriiglobus* (Kulichevskaya et al., 2017), *Frigoriglobus* (Kulichevskaya et al., 2020a) и *Thermogemmata* (Elcheninov et al., 2021). Одной из отличительных черт представителей данного семейства являются большие размеры геномов, в среднем 9×10^6 п.о., а у болотного планктомицета *Fimbriiglobus ruber* SP5^T – 12.3×10^6 п.о. (Ravin et al., 2018). Анализ геномных данных выявил высокое содержание в геномах планктомицетов гликозил-гидролаз, что может свидетельствовать о наличии

способности данных микроорганизмов к деградации различных полисахаридов (Kulichevskaya et al., 2020b). Согласно экспериментальным данным слабая целлюлозолитическая активность была показана для планктомицета *Telmatocola sphagniphila* SP2^T (Kulichevskaya et al., 2012) и *Frigoriglobus tundricola* PL17^T (Kulichevskaya et al., 2020a). Хитинолитические свойства были выявлены у болотного планктомицета *Fimbriiglobus ruber* SP5^T. Интересно, что рост микроорганизма был возможен, когда хитин использовался в качестве единственного источника азота, а не углерода (Ravin et al., 2018). Дополнительным свидетельством способности *Gemmata*-подобных планктомицетов к гидролизу хитина является увеличение доли этой группы бактерий в образцах торфа верхнего болота, обогащенных хитином, выявленного методом метатранскриптомного анализа (Ivanova et al., 2018).

Планктомицеты семейства *Gemmataceae* встречаются повсеместно. Несколько представителей новых родов данного семейства были выделены из пресноводных водоемов (Franzmann, Skerman, 1984; Seeger et al., 2017; Kulichevskaya et al., 2020b). В недавней работе был охарактеризован первый термофильный планктомицет рода *Thermogemmata*, изолированный из горячего источника Камчатки (Elcheninov et al., 2021). С введением в практику методов молекулярного анализа *Gemmata*-подобные планктомицеты были обнаружены в верховых сфагновых болотах (Куличевская и соавт., 2006; Ivanova, Dedysh, 2012; Dedysh, Ivanova, 2019). Попытки выделения новых микроорганизмов из данных экосистем привели к описанию четырех новых родов семейства *Gemmataceae* (Kulichevskaya et al., 2009, 2012, 2017, 2020a). Согласно исследованию, направленному на сравнение микробного разнообразия верховых и низинных болот, в последних *Gemmata*-подобные планктомицеты также составляли существенную долю бактериального сообщества (Ivanova et al., 2020).

Настоящая работа посвящена описанию первого планктомицета, выделенного из низинного болота северо-западной части России. Согласно сравнительному анализу генов 16S рРНК, ближайшими родственниками нового изолята были пресноводная *G. obscuriglobus* DSM 5831^T и "*G. massiliana*" ПЛ30, выделенная из воды больничной сети водоснабжения с оптимумом роста 30°C.

Таким образом, целью настоящего исследования явилось изучение совокупности экофизиологических и геномных характеристик нового штамма G18^T и определение его таксономического статуса.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Процедура выделения и условия культивирования. Штамм G18^T был выделен из образца торфа (рН 7.6), отобранного из низинного болота Радионское (Вологодская обл., 59°47'08" N, 37°52'08" E) на глубине 5–10 см. Изолят был получен путем высева пробы водной суспензии торфа на среду DSM 629 следующего состава (г/л дистиллированной воды): пептон – 5, дрожжевой экстракт – 0.5, циклогексимид – 0.05, раствор солей Хатнера – 20 мл; раствор витаминов (Staley et al., 1992) – 1 мл; рН 7.0. В качестве желирующего агента использовали 1% раствор полисахарида микробного происхождения фитагеля (PhytaGel, "Fluka"). Бактериальный газон, образовавшийся на твердой среде через 2 нед., микроскопировали и регулярно рассеивали методом истончающего штриха до получения изолированных колоний.

Идентификация микроорганизма. Выделение тотальной ДНК из клеток планктомицета производили с использованием набора FastDNA SPIN kit for soil ("Biol 101", США) в соответствии с ре-

комендацией производителя. Полученную ДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР-амплификации генов 16S рРНК со стандартными бактериальными праймерами 9F/1492R (Lane, 1991). Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System ("Promega", США). Секвенирование проводили на базе ЦКП "Биоинженерия" ФИЦ Биотехнологии РАН. Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit. Построение филогенетических дендрограмм производили с использованием программного пакета MEGAХ (Kumar et al., 2018) методом максимального правдоподобия. Статистическую достоверность дендрограмм рассчитывали с помощью "bootstrap"-анализа путем построения 100 альтернативных деревьев. Определенная в работе последовательность гена 16S рРНК планктомицета депонирована в GenBank под номером MW542577.

Геномное секвенирование и аннотирование. Выделение ДНК для геномного секвенирования осуществлялось по стандартному протоколу СТАВ – фенол/хлороформ. Часть геномной ДНК секвенировали на ячейке R9.4 прибора MinION ("Oxford Nanopore", Великобритания), используя Ligation Sequencing kit 1D, согласно рекомендациям производителя. Другая часть геномной ДНК была отсеквенирована на платформе Illumina MiSeq. Подготовка библиотеки и процедура секвенирования осуществлялась на базе фирмы "ReaGen" (Москва, Россия). Гибридная сборка прочтений Illumina и Nanopore была выполнена с использованием программы Unicycler (Wick et al., 2017) и BWA-MEM (Li, Durbin, 2009) с последующим сравнением качества в программах Quast (Gurevich et al., 2013) и Busco. Последовательность генома штамма G18^T депонирована в GenBank под номером JAGKQQ000000000.

Аннотацию генома проводили с помощью программного пакета PROKKA (Seemann, 2014) и BLASTKoala (Kanehisa et al., 2016). Поиск вторичных метаболитов осуществляли в программе AntiSmash (Medema et al., 2011). Построение геномного дерева производили в программе GTDB-Tk, путем множественного выравнивания 120 маркерных генов. В анализ так же были взяты геномы других охарактеризованных представителей семейства *Gemmataceae*.

Оценка ростовых характеристик культуры планктомицета. Определение ростовых характеристик изолята проводили при культивировании в жидкой среде, указанной выше, во флаконах на качалке (120 об./мин) в диапазоне температур от 4 до 35°C, значений рН от 4.0 до 8.0 и концентрации NaCl в среде 0–3.0%. Окислительное и ферментативное использование углеводов определяли с помощью набора API 20NE kit ("bioMérieux"). Энзи-

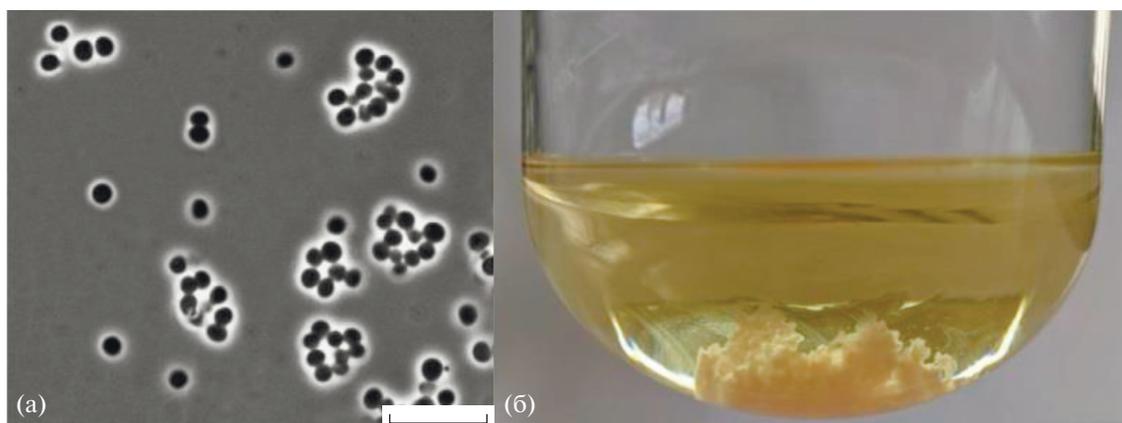


Рис. 1. а – Морфология клеток штамма G18^T; фазовый контраст, маркер – 10 мкм; б – рост культуры в жидкой среде с формированием слизевого агрегата.

матическую активность проверяли с использованием набора API ZYM (“bioMérieux”). В качестве ростовых субстратов тестировали сахара (глюкоза, сахароза, ксилоза, лактоза, манноза, раффиноза) и полимерные соединения (фитагель, крахмал, пектин, ксилан, ксантановая камедь, лихенан, хитин и микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ)). Тестируемые субстраты вносили в концентрации 0.5 г/л. При этом в исходную среду № 629 не вносили пептон, а в качестве источника азота добавляли NH₄NO₃ в концентрации 0.1 г/л. Рост оценивали путем регулярных измерений оптической плотности культуры на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer AG 22331 (Германия) при длине волны 600 нм. Перед измерением культуру активно встряхивали с целью ее гомогенизирования. Чувствительность штамма G18^T к антибиотикам проверяли на твердой среде путем наложения на газоны культуры тест-дисков с различными антибиотиками и последующим измерением зон подавления роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение, морфология и идентификация нового микроорганизма. Исследуемый штамм G18^T был выделен из пробы водной суспензии торфа низинного болота на твердой среде № 629 с фитагелем. При культивировании на твердой среде изолят формировал небольшие отдельные колонии розового цвета. Микроскопический анализ показал, что колонии образованы шаровидными клетками размером 1.2–2.8 мкм (рис. 1а). В жидкой среде № 629 планктомицет рос в виде бледно-розового слизевого агрегата (рис. 1б). Микроорганизм размножался почкованием. Клетки обладали подвижностью только в экспоненциальной фазе роста. В культуре встречались как одиночные клетки, так и их скопления в виде бесформенных агрегатов.

Идентификация и сравнительный анализ последовательности гена 16S рРНК штамма G18^T выявил 98.9% сходства с геном невалидированного планктомицета рода *Gemmata* – “*Gemmata massili-ana*” ПЛ30, выделенного из воды сети водоснабжения в госпитале во Франции (Aghnatiou et al., 2015) и 95.7% сходства с пресноводным планктомицетом *G. obscuriglobus* DSM 5831^T (Franzmann, Skerman, 1984) (рис. 2). Сходство 97.1% по генам 16S рРНК также было выявлено между штаммом G18^T и представителем другого рода геммат – *Frigoriglobus tundricola* PL17^T (Kulichevskaya et al., 2020a). Однако последующий филогеномный анализ позволил отнести новый изолят G18^T к планктомицетам рода *Gemmata*.

Физиологические характеристики. Штамм G18^T рос в интервале рН среды от 6.0 до 8.0 (оптимум рН 7.0) и солёности среды от 0 до 0.8% NaCl. Температурный диапазон роста планктомицета составил 4–28°C, с оптимумом при 15–20°C. Штамм не рос анаэробно в глубине столбика среды с фитагелем, что показывает, что он является строгим аэробом. Штамм обладал оксидазной активностью, каталазная и уреазная активности не были обнаружены.

Анализ ферментативных свойств штамма G18^T, проведенный с использованием стандартного набора API ZYM (“bioMérieux”), показал наличие активности ряда ферментов, включая щелочную фосфатазу, эстеразу (С4), липазу (С8), лейцин-, валлин-цистин-ариламидазу, трипсин, α-химотрипсин, кислую фосфатазу и нафтол-AS-VI-фосфогидролазу. Отрицательный результат был показан для липазы (С14), α- и β-галактозидазы, β-глюкуронидазы, α- и β-глюкозидазы, N-ацетил-β-глюкозаминидазы, α-маннозидазы и α-фукозидазы. По результатам тестов системы API 20NE новый планктомицет не способен к брожению, а также к восстановлению нитратов до нитритов и молекулярного азота.

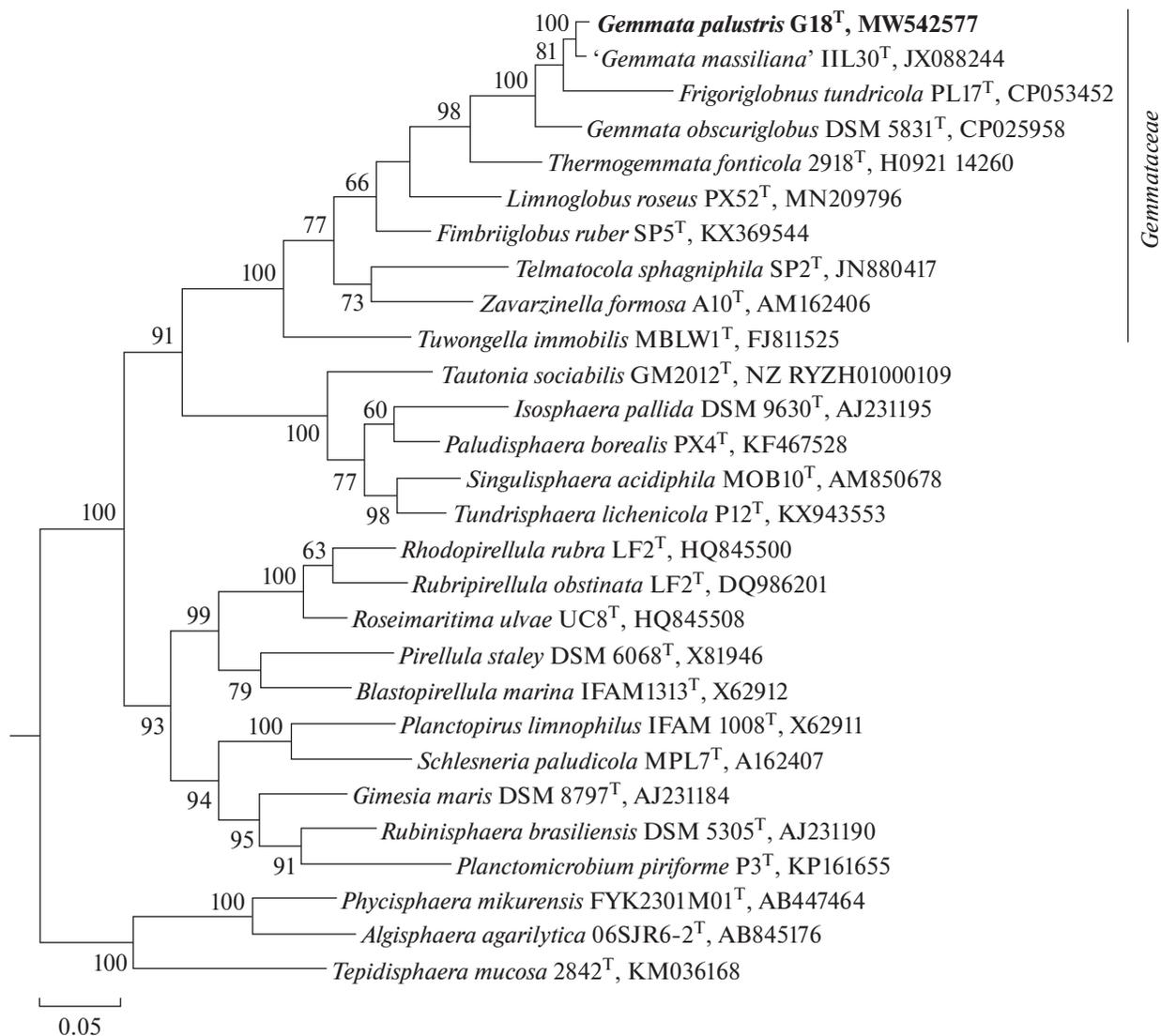


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная методом максимального подобия на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штамма G18^T и других представителей филума *Planctomycetes*. В качестве внешней группы использованы нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК пяти апаммох-планктомицетов (AF375994, AF375995, AY254883, AY254882, AY257181). Показаны значения бутстрэп-анализа >60.

Проверка спектра используемых субстратов показала, что предпочтительными источниками углерода и энергии являются полисахариды пектин, ксилан, фитагель, ксантантановая камедь, лихенан, а также пептон и дрожжевой экстракт. На сахарах лактозе, маннозе, сахарозе, ксилозе и раффинозе рост планктомицета был значительно слабее. Крахмал, хитин и МКЦ ингибировали рост изолята (табл. 1).

Проверка устойчивости штамма G18^T к спектру антибиотиков выявила резистентные свойства к хлорамфениколу, олеандомицину, имипенему, цефотаксиму, амоксиклаву, фосфомицину и ванкомицину. Разница с другими представителя-

ми рода *Gemmata* была обнаружена по отношению к линкомицину, неомицину, стрептомицину, ампициллину и рифампицину. Штамм G18^T оказался чувствительным к вышеперечисленным антибиотикам, в то время как *G. obscuriglobus* DSM 5831^T проявляла резистентные свойства к данным веществам (табл. 1) (Ivanova et al., 2021).

Геномные характеристики. По итогам секвенирования на платформе Nanopore было получено 145171 прочтений с общей длиной 1.4×10^9 п.о. Дополнительный раунд секвенирования на платформе Illumina MiSeq сгенерировал в общей сложности 3061576 парных прочтений со средней длиной считывания 150 п.о. Программой Unicycler

Таблица 1. Отличительные признаки штамма G18^T и других видов рода *Gemmata*

Признак	Штамм G18 ^T	<i>G. obscuriglobus</i> DSM 5831 ^T	' <i>G. massiliana</i> ' ПЛ30
Размер клеток, мкм	1.2–2.8	1.4–3.0	1.1–2.1
Гомогенный рост	–	+	ND
pH, диапазон (оптимум)	6.0–8.0 (7.0)	7.8–8.8 (ND)	6.0–8.0 (8.0)
T, °C, диапазон (оптимум)	4–28 (15–20)	16–35 (ND)	25–37 (30)
Соленость, NaCl%	0–0.8	0–0.6	0–1.25
Оксидаза	+	–	–
Каталаза	–	+	–
Устойчивость к антибиотикам:			
линкомицин	S	R	ND
неомицин	S	R	ND
стрептомицин	S	R	ND
ампициллин	S	R	ND
рифампицин	S	R	S
Источники углерода:			
сахароза	+/-	+	ND
ксилоза	+/-	+	ND
лактоза	+/-	+	ND
манноза	+/-	+	ND
раффиноза	+/-	–	ND
пектин	++	+	ND
крахмал	–	+	ND
Размер генома, ×10 ⁶ п.о.	9.23	9.06	9.25
G + Ц, мол. %	65	67.4	64.1
Количество CDS	7631	7266	7985
Кластеры вторичных метаболитов, шт.	11	9	12
Источник выделения	Торф низинного болота, Россия	Пресный водоем, Австралия	Вода из больницы сети водоснабжения Франция

Примечание. S – чувствительный, R – устойчивый к данному антибиотику. +/- слабый рост.

удалось собрать последовательности с обеих платформ в 3 контига длинами 8313494, 905837 и 8905 п.о. Другой подход, осуществленный с помощью ассемблера BWA-MEM, привел к сборке единственного кольцевого контига длиной 9268081 п.о. Однако сборка генома первым методом согласно программам Quast и Busco оказалась более качественной и была взята для дальнейшего анализа. Содержание G + C в геноме штамма G18^T составило 65 мол. % (табл. 1). Геномным аннотатором

Prokka было предсказано 7631 потенциальных белок-кодирующих последовательностей, 3 копии оперона рРНК и 97 генов тРНК.

ДНК–ДНК гибридизация выявила следующие сходства штамма G18^T с двумя представителями рода *Gemmata*: 31.2 ± 2.5% с ближайшим гомологом “*G. massiliana*” ПЛ30 и с 21.8 ± 2.2% *G. obscuriglobus* DSM 5831^T. Согласно калькулятору ANI (average nucleotide identity) сходство генома G18^T с пред-

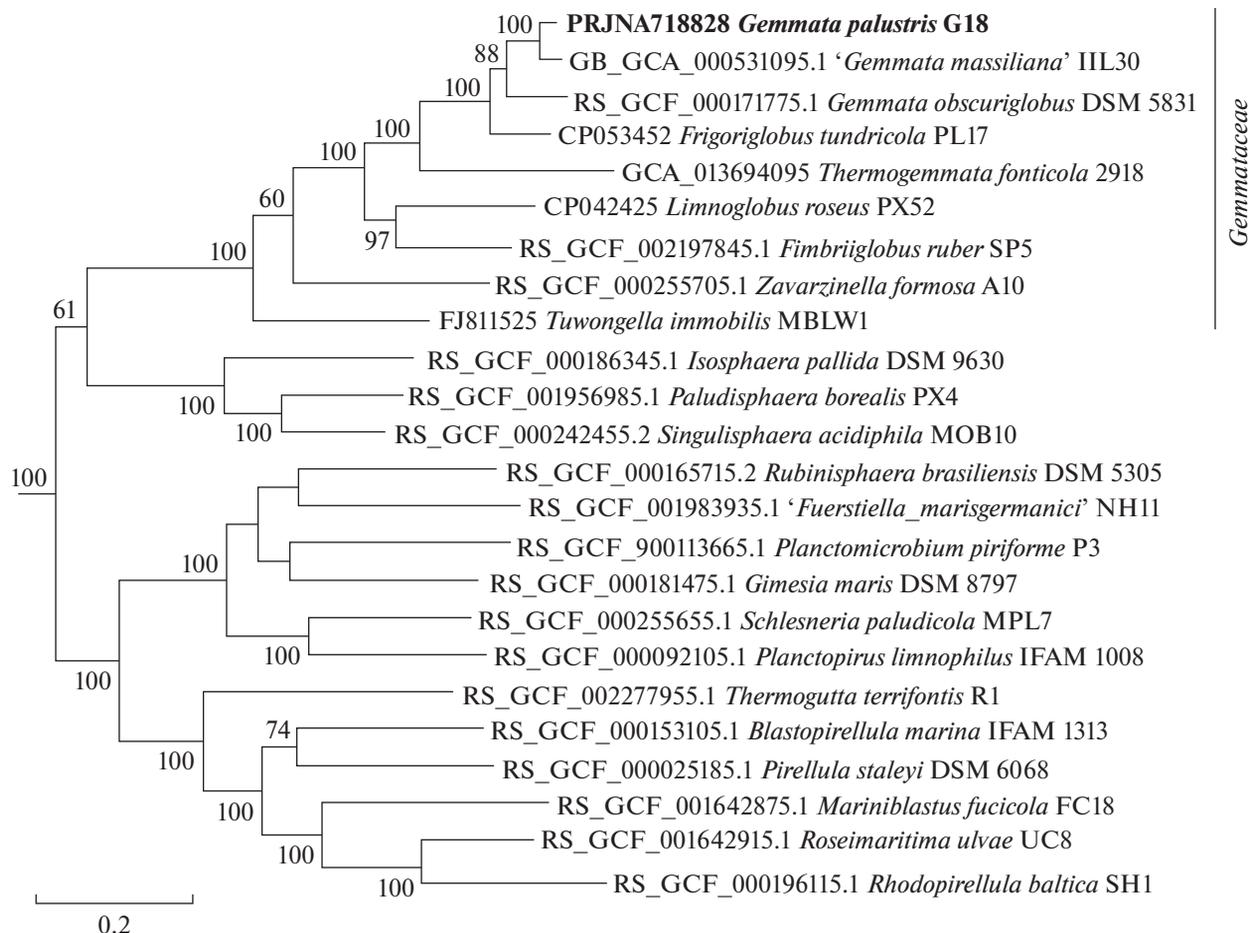


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма, основанная на анализе 120 конкатенированных последовательностей консервативных маркерных генов штамма G18^T и других представителей филума *Planctomycetes*. В качестве внешней группы использованы геномы апамтох-планктомицетов, доступные в базе данных GTDB. Показаны значения бутстрэп-анализа >60.

ставителями рода *Gemmata* составляло: 86.0% (“*G. massiliana*” IIL30) и 79.7% (*G. obscuriglobus* DSM 5831^T). Согласно таксономическим стандартам такие показатели геномного анализа достаточны для отнесения изолята к новому виду (Chun et al., 2018). Проведенный филогенетический анализ показал, что штамм G18^T кластеризуется с другими представителями рода *Gemmata* в семействе *Gemmataceae* (рис. 3).

Гены, кодирующие основные метаболические пути хемоорганотрофных бактерий, такие как гликолиз, ЦТК, пентозо-фосфатный путь и окислительное фосфорилирование, присутствуют у штамма G18^T. Также у планктомицета имеется геномный потенциал для синтеза всех аминокислот. Большинство генов, ответственных за хемотаксис, включая *cheB*, *cheR* и *cheW* обнаружены в геноме G18^T. У других представителей рода *Gemmata* данные гены также присутствуют. Как и у всех

планктомицетов, у новой гемматы G18^T не обнаружен ген *FtsZ*, ответственный за бинарное деление бактериальных клеток (Wiegand et al., 2018). Согласно недавнему исследованию для представителей семейства *Gemmataceae* характерны следующие гены, отвечающие за синтез пептидогликана: *mraW*, *lysM* и *murB* (Mahajan et al., 2020). У штамма G18^T они также были обнаружены.

Анализ вторичных метаболитов *in situ*. Планктомицеты обладают высоким потенциалом к синтезу вторичных метаболитов (Jeske et al., 2013). Недавно группой немецких ученых впервые было идентифицировано вещество стирелиацин, синтезируемое планктомицетом семейства *Pirellulaceae*, ответственное за формирование микроорганизмом биопленок (Kallscheuer et al., 2020).

В геноме штамма G18^T также был произведен поиск генных кластеров, необходимых для синтеза вторичных метаболитов. Вместе с исследуемым

планктомицетом были проанализированы геномы ближайших родственных организмов — “*G. massiliana*” ПЛ30 и *G. obscuriglobus* DSM 5831^T. По итогам анализа в геноме изолята G18^T было выявлено 11 кластеров, потенциально кодирующих синтез вторичных метаболитов (табл. 1, рис. 4). Из них два кластера отвечают за синтез нерибосомных пептид-синтетаз (NRPS), которые, наравне с поликетидсинтазами (PKS), являются ключевыми ферментами синтеза биологически активных веществ (Donadio et al., 2007). Ближайшие гомологи двух NRPS, кодируемые в геноме штамма G18^T, были обнаружены у планктомицета “*G. massiliana*” ПЛ30 (21 и 57% сходства). Один генный кластер отвечал за синтез резорцинол-подобного вещества. Классический резорцинол используют в производстве красителей, обеззараживающих средств и противоопухолевой терапии. Производные данного вещества в основном синтезируются растениями (Miyanaga, Horinouchi, 2009). Ближайший родственник к данному генному кластеру (52% сходства) был найден у “*G. massiliana*” ПЛ30. Также обнаружен единственный кластер генов, кодирующих синтез поликетидсинтаз (PKS) третьего типа. Ближайший гомологичный белок был у планктомицета семейства *Gemmataceae* — *Frigoriglobus tundricola* PL17^T (27% сходства) (Kulichevskaya et al., 2020a). Четыре кластера отвечали за производство терпенов — широкой группы органических веществ с антибиотическими, противоопухолевыми и гормональными свойствами (Yamada et al., 2012; Jeske et al., 2013). Гомологами в случае терпеновых кластеров являлись белки разных представителей семейства *Gemmataceae* со сходством от 64 до 89% (рис. 4). Три последних кластера (hgIE-KS и RiPP-like), также присутствующих в геноме G18^T, относились к разным типам поликетидсинтаз, согласно классификации программы AntiSmash. Ближайшие родственники к ним были обнаружены у “*G. massiliana*” ПЛ30 и *Gemmata* sp. SH-PL17 со сходством от 71 до 81% (рис. 4).

В геноме *G. obscuriglobus* DSM 5831^T было найдено 9 метаболических кластеров, в то время как у “*G. massiliana*” ПЛ30 обнаружили 12 кластеров (табл. 1). Ближайшие гомологи шести из 12-и кластеров, обнаруженных у “*G. massiliana*” ПЛ30, были выявлены в геноме штамма G18^T.

Проведенный сравнительный анализ морфологических, физиолого-биохимических и генетических характеристик нового изолята G18^T с известными представителями рода *Gemmata* позволил выявить ряд существенных различий, приведенных в табл. 1. Филогенетически новый штамм наиболее близок к выделенному из активированного ила невалидированному планктомицету “*Gemmata massiliana*” ПЛ30, но, в отличие от последнего, имеет оптимум роста при 15–20°C и предпочита-

ет более низкие значения pH. С *G. obscuriglobus* DSM 5831^T различия были обнаружены в спектре устойчивости к ряду антибиотиков, ростовых субстратов, оксидазной и каталазной активностям. Значения ДНК–ДНК гибридизации и ANI соответствуют стандартам таксономической классификации (Chun et al., 2018) для отнесения штамма G18^T к новому виду рода *Gemmata*.

Диагноз нового вида — *Gemmata palustris* sp. nov.

Gemmata palustris sp. nov. (pa. lus' tris. L. n. palus болото; M.L. adj. palustris обитающий в болотах). Шаровидные клетки диаметром 1.2–2.8 мкм, одиночные или объединенные в бесформенные скопления. Колонии розово-пигментированные. Дочерние клетки подвижные, материнские нет. В жидкой культуре рост наблюдался в виде слизевого агрегата. Облигатные аэробы. Психротолерантные мезофилы и нейтрофилы с оптимумом роста при 15–20°C и pH 7.0. Предпочтительные ростовые субстраты — полисахариды, в том числе пектин, ксилан, фитагель и ксантантановая камедь. Слабый рост на сахарозе, глюкозе, ксилозе, лактозе, раффинозе и маннозе. Оксидазо-положительный, каталаза- и уреазо-отрицательный. Обнаружены активности ряда ферментов: щелочной фосфатазы, эстеразы (C4), липазы (C8), лейцин-, валин-, цистин-ариламидазы, трипсина, α-химотрипсина, кислой фосфатазы и нафтол-AS-VI-фосфогидролазы. Отрицательный результат был показан для липазы (C14), α- и β-галактозидазы, β-глюкуронидазы, α- и β-глюкозидазы, N-ацетил-β-глюкозаминидазы, α-маннозидазы и α-фукозидазы. Размер генома штамма G18^T составляет 9.23 × 10⁶ п.о., содержание G + C в ДНК составляло 65 мол. %. Типовой штамм G18^T нового таксона депонирован в двух международных коллекциях микроорганизмов — КСТС и VKM: под номерами КСТС 82682 и VKM В-3541Т. Местообитания — низинные болота.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РФФ 19-74-00130.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались животные или участвовали люди.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

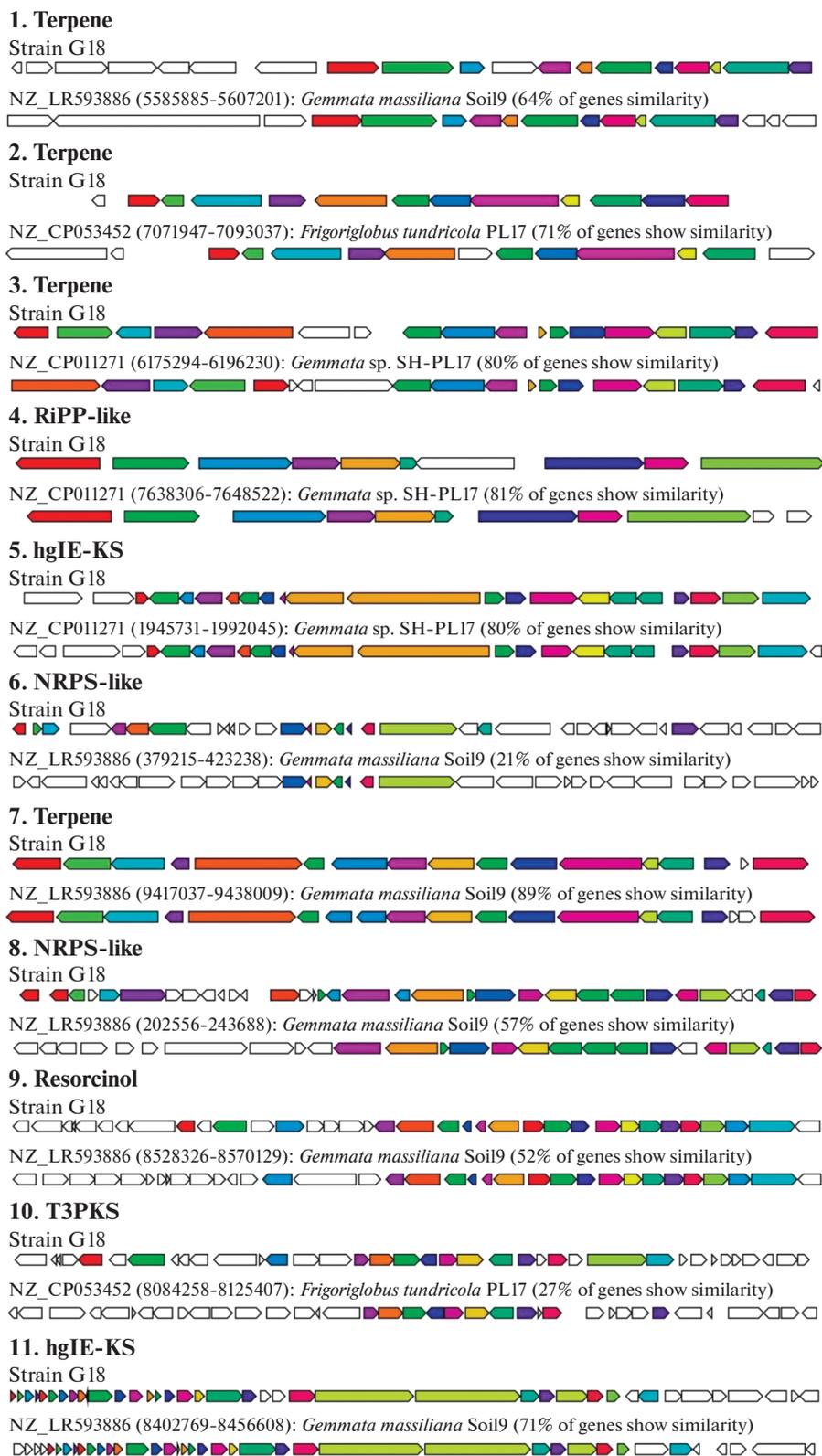


Рис. 4. Состав генных кластеров, отвечающих за синтез вторичных метаболитов, обнаруженных в геноме штамма G18^T. Для каждого кластера приведены соответствующие ближайшие гены-гомологи других микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Куличевская И.С., Панкратов Т.А., Дедыш С.Н. Анализ бактериального сообщества, развивающегося при разложении сфагнома // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 702–710.
- Kulichevskaya I.S., Belova S.E., Kevbrin V.V., Dedysh S.N., Zavarzin G.A. Analysis of the bacterial community developing in the course of sphagnum moss decomposition // Microbiology (Moscow). 2007. V. 76. P. 621–629.
- Aghnatiou R., Cayrou C., Garibal M., Robert C., Azza S., Raoult D., Drancourt M. Draft genome of *Gemmata massiliensis* sp. nov., a water-borne *Planctomycetes* species exhibiting two variants // Stand Genomic Sci. 2015. V. 10. Art. 120.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.-W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.
- Dedysh S.N., Ivanova A.A. *Planctomycetes* in boreal and subarctic wetlands: diversity patterns and potential ecological functions // FEMS Microbiol. Ecol. 2019. V. 95. fyy227.
- Donadio S., Monciardini P., Sosio M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics // Nat. Prod. Rep. 2007. V. 24. P. 1073–1109.
- Elcheninov A.G., Podosokorskaya O.A., Kovaleva O.L., Novikov A.A., Toshchakov S.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Thermogemmata fonticola* gen. nov., sp. nov., the first thermophilic planctomycete of the order *Gemmatales* from a Kamchatka hot spring // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126157.
- Franzmann P.D., Skerman V.B. *Gemmata obscuriglobus*, a new genus and species of the budding bacteria // Antonie Van Leeuwenhoek. 1984. V. 50. P. 261–268.
- Fuerst J.A., Gwilliam H.G., Lindsay M., Lichanska A., Belcher C., Vickers J.E., Hugenholtz P. Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 254–262.
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // Bioinformatics. 2013. V. 29. P. 1072–1075.
- Ivanova A.A., Beletsky A.V., Rakitin A.L., Kadnikov V.V., Philippov D.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Dedysh S.N. Closely located but totally distinct. highly contrasting prokaryotic diversity patterns in raised bogs and eutrophic fens // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 484.
- Ivanova A.A., Wegner C.-E., Kim Y., Liesack W., Dedysh S.N. Metatranscriptomics reveals the hydrolytic potential of peat-inhabiting *Planctomycetes* // Antonie Van Leeuwenhoek. 2018. V. 111. P. 801–809.
- Ivanova A.A., Miroshnikov K.K., Oshkin I.Y. Exploring antibiotic susceptibility, resistome and mobilome structure of planctomycetes from *Gemmataceae* family // Sustainability. 2021. V. 13. Art. 5031.
- Ivanova A.O., Dedysh S.N. Abundance, diversity, and depth distribution of *Planctomycetes* in acidic northern wetlands // Front. Microbiol. 2012. V. 3. Art. 5.
- Jeske O., Jogler M., Petersen J., Sikorski J., Jogler C. From genome mining to phenotypic microarrays. *Planctomycetes* as source for novel bioactive molecules // Antonie Van Leeuwenhoek. 2013. V. 104. P. 551–567.
- Kallscheuer N., Jeske O., Sandargo B., Boedeker C., Wiegand S., Bartling P., Jogler M., Rohde M., Petersen J., Medema M.H., Surup F., Jogler C. The planctomycete *Stieleria maiorica* Mal15^T employs stieleriicines to alter the species composition in marine biofilms // Commun. Biol. 2020. V. 3. Art. 303.
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA. KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 726–731.
- Kulichevskaya I.S., Baulina O.I., Bodelier P.L.E., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Dedysh S.N. *Zavarzinella formosa* gen. nov., sp. nov., a novel stalked, *Gemmata*-like planctomycete from a Siberian peat bog // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 357–364.
- Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Baulina O.I., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Dedysh S.N. *Fimbrioglobus ruber* gen. nov., sp. nov., a *Gemmata*-like planctomycete from *Sphagnum* peat bog and the proposal of *Gemmataceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 218–224.
- Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Naumoff D.G., Beletsky A.V., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Mardanov A.V., Ravin N.V., Dedysh S.N. *Frigoriglobus tundricola* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant cellulolytic planctomycete of the family *Gemmataceae* from a littoral tundra wetland // Syst. Appl. Microbiol. 2020. V. 43. Art. 126129.
- Kulichevskaya I.S., Naumoff D.G., Miroshnikov K.K., Ivanova A.A., Philippov D.A., Hakobyan A., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Liesack W., Dedysh S.N. *Limnoglobus roseus* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater planctomycete with a giant genome from the family *Gemmataceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 1240–1249.
- Kulichevskaya I.S., Serkebaeva Y.M., Kim Y., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Liesack W., Dedysh S.N. *Telmatocola sphagniphila* gen. nov., sp. nov., a novel dendriform planctomycete from northern wetlands // Front. Microbiol. 2012. V. 3. Art. 146.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X. Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Ed. Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1754–1760.
- Mahajan M., Seeger C., Yee B., Andersson S.G.E. Evolutionary remodeling of the cell envelope in *Bacteria* of the *Planctomycetes* phylum // Genome Biol. Evol. V. 12. P. 1528–1548.
- Medema M.H., Blin K., Cimermanic P., De Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A., Weber T., Takano E., Breitling R. AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. P. W339–W346.
- Miyana A., Horinouchi S. Enzymatic synthesis of bis-5-alkylresorcinols by resorcinol-producing type III polyketide synthases // J. Antibiot. (Tokyo). 2009. V. 62. P. 371–376.
- Ravin N.V., Rakitin A.L., Ivanova A.A., Beletsky A.V., Kulichevskaya I.S., Mardanov A.V., Dedysh S.N. Genome anal-

ysis of *Fimbriiglobus ruber* SP5T, a planctomycete with confirmed chitinolytic capability // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02645-17>

Seeger C., Butler M.K., Yee B., Mahajan M., Fuerst J.A., Andersson S.G.E. *Tuwongella immobilis* gen. nov., sp. nov., a novel non-motile bacterium within the phylum *Planctomycetes* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 4923–4929.

Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs // *Bioinformatics.* 2015. V. 31. P. 3210–3212.

Staley J.T., Fuerst J.A., Giovannoni S., Schlesner H. The order *Planctomycetales* and the genera *Planctomyces*, *Pirellula*,

Gemmata, and *Isosphaera* // *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* / Ed. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. N.Y.: Springer, 1992. P. 3710–3731.

Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Comput. Biol.* 2017. V. 13. e1005595.

Wiegand S., Jogler M., Jogler C. On the maverick *Planctomycetes* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. V. 42. P. 739–760.

Yamada Y., Cane D.E., Ikeda H. Diversity and analysis of bacterial terpene synthases // *Methods in Enzymology*, 1st ed. / Ed. Hopwood D.A. Academic Press, 2012. P. 123–162.

Gemmata palustris sp. nov., a Novel Planctomycete from a Fen in Northwestern Russia

A. A. Ivanova^{1,*}, I. S. Kulichevskaya¹

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

*e-mail: ivanovastasja@gmail.com

Received April 22, 2021; revised May 13, 2021; accepted May 13, 2021

Abstract—Planctomycetes are common inhabitants of northern wetlands. In the present work, a novel representative of the genus *Gemmata*, strain G18^T, was isolated from a fen of northwestern Russia. The cells were spherical, occurring singly or in small groups, motile in the exponential growth phase. Strain G18^T was a chemoorganotrophic, psychrotolerant microorganism, with growth optima at pH 7.0 and 15–20°C. The preferred growth substrates were polysaccharides pectin, xylan, lichenan, xanthan gum, and phytigel. Among the taxonomically characterized representatives of this order, highest levels of 16S rRNA gene sequence similarity (95.7–98.9%) were observed with the freshwater planctomycete *Gemmata obscuriglobus* DSM 5831^T and “*Gemmata massiliana*” IIL30. The genome of strain G18^T consisted of a 9.23-Mb chromosome, containing 7631 protein-coding genes and 3 copies of the rRNA operon (the 5S, 16S, and 23S rRNA genes). The G + C content of the chromosomal DNA was 65 mol %. According to ANI, the values of similarity between strain G18^T and other *Gemmata* strains were 86.0% (“*G. massiliana*” IIL10) and 79.7% (*G. obscuriglobus* DSM 5831). Based on the results of comparative phenotypic, physiological, and phylogenomic analyses, we propose to classify strain G18^T (=KCTC 82682 = VKM B-3541^T) as belonging to a novel species of the genus *Gemmata*, *Gemmata palustris* sp. nov.

Keywords: *Planctomycetes*, family *Gemmataceae*, genus *Gemmata*, fens

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ В ПОДЗЕМНЫХ ГОРИЗОНТАХ МЕСТОРОЖДЕНИЯ УРАНА¹

© 2021 г. Т. Л. Бабич^а, Е. М. Семенова^а, Д. Ш. Соколова^а, Т. П. Турова^а, С. Х. Биджиева^а, Н. Г. Лойко^а, Г. И. Авдонин^б, Н. И. Луценко^с, Т. Н. Назина^{а, *}

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

^бВсероссийский научно-исследовательский институт минерального сырья им. Н.М. Федоровского, Москва, 119017 Россия

^сАО “Далур”, Курганская обл., Россия

*e-mail: nazina@inmi.ru

Поступила в редакцию 05.03.2021 г.

После доработки 08.03.2021 г.

Принята к публикации 12.03.2021 г.

В настоящей работе определен состав микроорганизмов в образцах пород, пластовой воды и накопительных культурах из подземных горизонтов месторождения урана (Россия). Исследованные горизонты располагаются в зоне затрудненного водообмена на глубине 513–544 м, характеризуются умеренной соленостью (до 15 г/л) пластовой воды и наличием обугленного растительного органического вещества. Методом высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК было определено биоразнообразие автохтонных подземных прокариот. В образцах пород обнаружено преобладание бактерий филумов *Firmicutes* (24.2%), *Fusobacteriota* (23.0%), *Proteobacteria* (18.7%), *Actinobacteriota* (15.5%) и *Bacteroidota* (9.0%). В пластовой воде доминировали бактерии филума *Proteobacteria* (90.7%), включающие представителей родов *Methylophaga*, *Porphyrobacter*, *Roseovarius*, *Pseudomonas* и *Methylococcus*. Секвенирование внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) позволило выявить в образцах пород низшие грибы родов *Mucor* и *Thamnidium* (филума *Mucoromycota*) и рода *Penicillium* (филума *Ascomycota*), известные устойчивостью к тяжелым металлам и способностью использования сложных органических субстратов. Функциональные характеристики бактериальных сообществ породы и пластовой воды, предсказанные с помощью программы iVikodak и базы данных KEGG, показали большую потенциальную способность бактерий пластовой воды по сравнению с микробиотой породы осуществлять пути метаболизма углеводов, азота и серы, деградации ксенобиотиков, бензоата, полициклических ароматических углеводородов и хлорсодержащих органических соединений. Получены накопительные культуры железоредуцирующих и сульфатредуцирующих бактерий и чистые культуры денитрифицирующих бактерий родов *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Acinetobacter*. Приведенные результаты свидетельствуют о наличии малочисленного, но жизнеспособного микробного сообщества, способного при активизации водообмена участвовать в процессах трансформации углерода, азота, серы и металлов в подземном горизонте.

Ключевые слова: глубинные подземные горизонты, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, бактерии, ITS, грибы, функциональное разнообразие, iVikodak, месторождение урана

DOI: 10.31857/S0026365621040030

Способность микроорганизмов участвовать в процессах преобразования металлов и радионуклидов детально исследована на чистых культурах и микробных сообществах из поверхностных и подземных местообитаний, загрязненных техногенными радионуклидами (Newsome et al., 2014). Взаимодействие микроорганизмов с радионукли-

дами происходит по разным механизмам и включает биосорбцию (адсорбция на клеточной поверхности), биоаккумуляцию (проникновение и накопление внутри клетки), биотрансформацию (изменение степени окисления радионуклида за счет биохимических процессов) и др. Микробные популяции могут изменять геохимические параметры окружающих пород, воздействовать на состав и миграцию металлов и радионуклидов, осуществлять их диссимиляционное восстановление (U^{6+} , Tc^{7+} , V^{5+} и др.), сорбцию и концентрирова-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621040030 для авторизованных пользователей.

ние в биопленках, продуцировать комплексобразующие агенты, изменять величины рН и Eh.

Наиболее исследованы микроорганизмы подземных водоносных горизонтов, используемых для захоронения жидких радиоактивных отходов (РАО) или загрязненных радионуклидами в научных целях (North et al., 2004; Akob et al., 2007; Green et al., 2012). В глубинных хранилищах жидких РАО субстратами для роста микроорганизмов являются поступающие с отходами органическое вещество, нитраты и сульфаты, окисленные формы радионуклидов и других металлов (Fe^{3+}), бикарбонат, присутствующий в подземных водах, а также молекулярный водород, который может образовываться в радиоактивных растворах за счет радиолитического распада воды. Помимо превращений радионуклидов в глубинных хранилищах наблюдается биогенное газообразование (N_2 , CH_4 , H_2S , CO_2), обусловленное жизнедеятельностью денитрифицирующих, броидильных, сульфатредуцирующих и метаногенных прокариот (Nazina et al., 2010).

Многочисленными исследованиями подтверждено участие денитрифицирующих бактерий в удалении нитратов из подземных горизонтов, загрязненных радионуклидами и нитрат-ионами (North et al., 2004; Green et al., 2012; Safonov et al., 2018). Продукты восстановления нитрата способствуют окислению восстановленных металлов и радионуклидов, усиливая их растворимость и миграцию. Восстановление радионуклидов и сульфатредукция в загрязненных ураном и нитратами осадках протекают только после исчерпания нитрата в подземных водах (Senko et al., 2005; Wu et al., 2010).

Микроорганизмы природных подземных залежей радионуклидов исследованы в меньшей степени, чем микробиота техногенных местообитаний, загрязненных радионуклидами (Mondani et al., 2011; Islam et al., 2011; Bhakat et al., 2019). В породах месторождения урана на северо-востоке Индии (Domiasiat, North East India) обнаружены бактерии филумов *Firmicutes* (51%), *Actinobacteria* (11%) и *Bacteroidetes* (10%) и классов *Gamma*proteobacteria (26%) и *Beta*proteobacteria (2%) (Kumar et al., 2013). Бактерии, выделенные из этого месторождения, принадлежали к родам *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и др. Показана адсорбция урана этими штаммами и высокая фосфатазная активность, также способствующая осаждению урана на микробной биомассе. Присутствие бактерий этих таксонов обнаружено также в ряде загрязненных радионуклидами и тяжелыми металлами почв (Radeva, Selenska-Pobell, 2005; Martinez et al., 2006).

Настоящая работа направлена на изучение разнообразия микроорганизмов подземных горизонтов месторождения урана Добровольное (Курган-

ская обл., Россия), которое находится на стадии исследований и пока не эксплуатируется. Месторождение локализовано в аллювиальных отложениях средне-верхнеюрского возраста, залегающих на глубинах 480–600 м от земной поверхности (Долбилин и соавт., 2009). Породы, обогащенные углефицированным растительным детритом, содержат дисульфиды железа. На месторождении Далматово, аналогичном месторождению Добровольное, ведется добыча урана методом скважинного подземного выщелачивания (СПВ) с использованием серной кислоты и нитрита натрия в качестве окислителя. Контроль баланса подаваемых в пласт нитрит-ионов и содержания нитритов в продуктивных урансодержащих растворах показывает уменьшение общего содержания азотистых соединений, которое невозможно объяснить дисперсией состава подземных вод или депонированием в глины. Было высказано предположение о восстановлении нитрита до молекулярного азота денитрифицирующими бактериями подземных горизонтов и его удалении из системы.

В связи с вышесказанным, было необходимо определить состав микробного сообщества и наличие жизнеспособных денитрифицирующих и других популяций в подземных горизонтах месторождения Добровольное. Изучение фоновых значений разнообразия микробного сообщества необходимо для прогноза экологических последствий процесса выщелачивания урана и его воздействия на биогеохимические процессы в подземных горизонтах.

Целью настоящей работы было определение филогенетического разнообразия бактерий и грибов в образцах пород, пластовой воды и накопительных культурах из подземных горизонтов месторождения урана Добровольное (Россия), потенциальной функциональной активности бактерий, а также выделение и идентификация денитрифицирующих бактерий, способных восстанавливать нитрат/нитрит в подземных водах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектом микробиологических исследований были образцы пород и пластовая вода, отобранные в 2020 г. из керна разведочных скважин на месторождении урана Добровольное (Россия). Образцы пород отбирали на разной глубине из керна геологоразведочных скважин Р-123 (513.1 и 523.7 м), Р-78 (544.5 м), Р-76 (541.8 и 519.7 м) и Р-224 (521.4 м), и проба пластовой воды была отобрана из скважины Г-15 (табл. S1, доп. материалы). Скважина 224 пробурена на месте проведения опыта по добыче урана. В 1989–1990 гг. на месторождении был проведен 2-х скважинный опыт по добыче урана методом скважинного подземного выщелачивания с использованием серной кислоты (Долбилин и соавт., 2009).

Получение накопительных и чистых культур.

Для учета и выделения микроорганизмов из образцов пород получали суспензию, для чего усредненную навеску породы массой 10 г вносили в 90 мл стерильной водопроводной воды и тщательно перемешивали на качалке в течение 10 мин. Полученную суспензию выдерживали 5 мин для осаждения твердой фазы и использовали для засева жидких питательных сред методом предельных десятикратных разведений. Результаты оценивали методом наиболее вероятного числа по таблице Мак-Креди. Численность аэробных органотрофных микроорганизмов оценивали микроскопированием посевов серии разведений полученной суспензии в среде следующего состава (г/л водопроводной воды): глюкоза – 1.0; бактотриптон – 5.0; дрожжевой экстракт – 2.5; NaCl – 5; pH 7.0–7.2. Анаэробную технику Хангейта использовали для приготовления сред для анаэробных бактерий. В качестве газовой фазы использовали очищенный от кислорода аргон. Численность бродильных микроорганизмов оценивали микроскопированием посевов и обнаружением образования молекулярного водорода в газовой фазе в посевах серии разведений суспензии зерна в среде (г/л воды): пептон – 4.0; глюкоза – 10.0; Na₂SO₄ – 2.0; MgSO₄ – 1.0; NaCl – 5; соль Мора (FeSO₄·(NH₄)₂SO₄·6H₂O) – 0.5; Na₂S·9H₂O – 0.1; pH 7.2 (Postgate, 1984). Численность сульфатвосстанавливающих бактерий определяли по образованию сероводорода в посевах суспензии в среде (г/л воды): MgCl₂·6H₂O – 3.0; CaCl₂·2H₂O – 0.15; Na₂SO₄ – 4.0; NH₄Cl – 0.25; KH₂PO₄ – 0.2; KCl – 0.5; NaCl – 5; лактат натрия – 4.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaHCO₃ вносили, доводя pH среды до 7.0; Na₂S·9H₂O – 0.2 (Widdel, Vak, 1992). Численность денитрифицирующих бактерий оценивали по появлению молекулярного азота в посевах серии разведений суспензии в среде следующего состава (г/л дистиллированной воды): KCl – 0.1; MgSO₄·7H₂O – 0.2; CaCl₂·2H₂O – 0.2; KH₂PO₄ – 0.75; K₂HPO₄ – 1.5; NH₄Cl – 0.9; NaCl – 5; NaNO₃ – 0.85; ацетат натрия – 2.0. Посевы инкубировали в стационарных условиях при температуре 20–23°C в течение 20 сут.

Чистые культуры аэробных органотрофных и денитрифицирующих бактерий были выделены методом последовательных пересевов с жидких сред на соответствующие плотные среды, содержащие 15 г агар-агара на 1 л. Процедуру выделения из единичных колоний повторяли трижды. Чистоту культур контролировали микроскопическим методом и посредством анализа гена 16S рРНК культуры из жидкой среды. В качестве субстратов для денитрифицирующих бактерий помимо ацетата использовали также пептон (2 г/л), глюкозу (2 г/л) и рибозу (2 мл/л). Среды готовили аэробно и анаэробно. Аэробную среду разливали в пенициллиновые пробирки с воздушной фазой,

анаэробную среду разливали в пробирки Хангейта в атмосфере Ar.

Микроскопические методы. Морфологию клеток бактерий изучали на живых препаратах, используя эпифлуоресцентный микроскоп Axio Imager.D1 (“Carl Zeiss”, Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRC и компьютерным программным обеспечением Axio Vision. Для получения фотографий в сканирующем микроскопе накопительные культуры наращивали в соответствующих жидких средах с тефлоновыми кубиками для получения биопленочного роста, среду декантировали и биомассу на тефлоновых кубиках дважды промывали фосфатным буфером (pH 7.0), поэтапно обезжизивали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (от 30 до 100%). Затем дважды отмывали образцы в 100% ацетоне и высушивали в критической точке с помощью специальной камеры. Высушенные препараты монтировали на специальные столики, а затем напыляли на них тонкий слой металла для создания токопроводящего покрытия. Полученные образцы просматривали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ. Работа была выполнена с использованием оборудования, приобретенного в рамках Программы развития Московского государственного университета до 2020 г.

Аналитические методы. Молекулярный водород, азот и метан в газовой фазе определяли газохроматографическим методом; сероводород определяли колориметрически по методу Пахмайра с N,N-диметил-*p*-фенилендиамином, как описано ранее (Nazina et al., 2010). Образование нитритов в среде определяли по цветной реакции с реактивом Грисса. Прирост биомассы в жидкой среде оценивали по величине оптической плотности при длине волны 600 или 540 нм (ОД₆₀₀ или ОД₅₄₀) на приборе Ultrospec 2100 pro (“Amersham Biosciences”). В качестве контроля использовали незараженную и зараженную среду, инкубируемую при 6°C.

Молекулярно-биологические методы идентификации чистых культур и определения состава микробного сообщества пород и пластовой воды. Чистые культуры бактерий были идентифицированы методом анализа гена 16S рРНК с праймерами 8-27f/1492g (Lane, 1991). Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК выделенных штаммов выполняли с использованием программы BLAST сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Филогенетическое разнообразие прокариот (бактерий и архей) и эукариот (грибов) в исследованных пробах пород и пластовой воды определяли посредством секвенирования ампликонов гена 16S рРНК прокариотических организмов и ITS региона грибов и последующей биоинформатической обработки полученных данных. Амплико-

ны гена 16S рРНК и ITS региона получали путем полимеразной цепной реакции с использованием препаратов тотальной ДНК микробных сообществ анализируемых образцов.

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование генов 16S рРНК прокариот и ITS региона грибов. ДНК из образцов пород и пластовой воды выделяли с использованием коммерческих наборов для выделения ДНК FastDNA Spin Kit (“MP Bio”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные препараты ДНК использовали для амплификации V4 участка гена 16S рРНК прокариот или ITS региона грибов путем полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для получения библиотек генов 16S рРНК прокариот был амплифицирован V4 гипервариабельный регион этого гена и на основе двойного баркодирования были приготовлены библиотеки, как описано ранее (Fadrosh et al., 2014). Смысловые участки праймеров были взяты в соответствии с парой праймеров Pro341F–Pro805R (Takahashi et al., 2014). Библиотеки ITS региона получали по аналогичной схеме с использованием праймерных систем, описанных в статье (Bokulich, Mills, 2013). Для получения ампликонов ITS региона использовали прямой праймер ITS86F 5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3' и обратный праймер ITS4R 5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3'. Получаемые при этом ампликоны за счет наличия на 5'-концах праймеров технических последовательностей были после очистки секвенированы на платформе Illumina MiSeq (США). Технические последовательности включали в себя адаптеры Illumina, сайты посадки секвенирующих праймеров, баркоды и спейсеры гетерогенности. Очистку ампликонов осуществляли путем препаративного агарозного гель-электрофореза с последующим использованием стандартных наборов реактивов для очистки ампликонов из агарозного геля и реакционных смесей со стандартными спин-колонками в соответствии с рекомендациями производителя наборов. Высокопроизводительное секвенирование полученных на предыдущей стадии ампликонов производили с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 (“Illumina”, США) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Обозначения полученных библиотек гена 16S рРНК приведены в табл. S1 (доп. материалы).

Биоинформатический анализ. После проведения секвенирования получали fastq файлы, содержащие информацию о последовательностях фрагментов гена 16S рРНК или ITS региона, а также информацию о достоверности прочтения каждого отдельного нуклеотида. Полученные фрагменты генов 16S рРНК были обрезаны с использованием программ trimmomatic-0.36 по алгоритму SLIDINGWINDOW:4:15 (Bolger et al., 2014). Прямые и

обратные прочтения объединяли программой SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>). Для обнаружения химер и демультиплексирования использовали фильтры QIIME (Caporaso et al., 2010). Полученные последовательности распределяли по операционным таксономическим единицам (ОТЕ) с уровнем сходства более 97%. Полученные ОТЕ идентифицировали с использованием баз данных QIIME, онлайн-ресурса SILVA (Quast et al., 2014; <https://www.arb-silva.de/ngs/>) и Knomics Biota. Написание таксонов прокариот в настоящей публикации соответствует таковому, приведенному в онлайн-ресурсе SILVA. Относительное количество прочтений, входящих в ту или иную ОТЕ, соответствует относительной представленности данного таксона микроорганизмов в исследуемом микробном сообществе. Статистические подсчеты осуществляли с помощью Microsoft Excel. Онлайн-ресурс ClustVis (Metsalu, Vilo, 2015; <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) был использован для создания тепловых карт (heatmaps) членов сообщества на родовом уровне. Индексы разнообразия были рассчитаны с использованием программы EstimateS (<http://purl.oclc.org/estimates>). ОТЕ, идентифицированные с использованием онлайн-ресурса SILVA, использовали для предсказания функциональных характеристик бактериальных сообществ с использованием пакета программ iVikodak (Nagpal et al., 2019). Модуль Global Mapper этой программы на основании базы данных KEGG использовали для получения функциональных профилей, а Local Mapper – для прогнозирования индивидуальных профилей ферментов метаболизма азота, серы, бензоата и метана, представленных у бактерий исследуемых микробных сообществ. Тепловые карты функциональных профилей и ферментов, предсказанных для сообществ, были построены с использованием интернет-ресурса ClustVis (<http://biit.cs.ut.ee/clustvis/>, ноябрь 2020 г.).

Последовательности гена 16S рРНК чистых культур депонированы в базе данных NCBI под номерами MW541935, MW542185, MW542204, MW542594, MW543416, MW543704, MW543921, MW543938, MW544018, MW544028, MW544052, MW542313, MW542572, MW542576. Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК породы, пластовой воды и накопительных культур депонированы в NCBI, BioProject PRJNA706554.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические условия и численность культивируемых микроорганизмов в подземных горизонтах. Образцы пород и пластовой воды были отобраны с глубины 513–544 м месторождения Добровольное. Урановое оруденение относится к инфильтрационно-эпигенетическому, генетически связанному с развитием зон окисления. Оруденение на месторождении связано с сероцветными по-

родами, насыщенными обугленным растительным органическим веществом и располагается на границе выклинивания зон обеленных пород, представляющих зону пластового окисления, восстановленную последующими процессами. Пирит в породах содержится в концентрации от 1 до 16%, причем его наибольшее количество приурочено к обогащенным ураном зонам. Отмечаются урансодержащие поликомпонентные гели в ассоциации с гипсом и пиритом. По данным Долбина и соавт. (2009), химический состав вод верхнеюрского водоносного комплекса в пределах месторождения соответствует зоне затрудненного водообмена. Воды преимущественно соленые, с минерализацией 11.1–13.0 г/л. В составе компонентов преобладают гидрокарбонаты, сульфаты и хлориды натрия. Воды слабощелочные – рН колеблется от 7.2 до 7.5. Содержание сероводорода до 1.5 мг/л. Значения окислительно-восстановительного потенциала от +60 до +120 мВ, что свидетельствует о слабовосстановительной обстановке. Состав пластовой воды из скважины 224 приведен в табл. S2 (доп. материалы). Содержание урана в воде достигает 7.8×10^{-6} г/л.

Поскольку для выщелачивания металлов и радионуклидов обычно используется серная кислота и иногда азотная/азотистая кислоты, то представлялось необходимым определить наличие сульфатредуцирующих, железо-(металл)-редуцирующих и денитрифицирующих бактерий в пласте. Микробиологические исследования образцов пород из рудоносных горизонтов были направлены на обнаружение микроорганизмов, способных участвовать в преобразованиях поливалентных элементов и восстановлении нитратов и сульфата. В результате посевов на селективные питательные среды во всех образцах пород были обнаружены аэробные органотрофные бактерии, однако их численность была низка и не превышала 10^3 клеток в пересчете на 1 г породы (рис. S1, дополнительные материалы). При микроскопировании посевов на средах для аэробных органотрофных и денитрифицирующих бактерий часто встречались биопленки и нити микроскопических грибов (рис. 1а, 1б). Бродильные бактерии, образующие молекулярный водород, были обнаружены лишь в посевах пород из скважины Р-123 (523.7 м). Микроскопическим методом эти бактерии обнаружены в посевах из большинства образцов пород, где их численность не превышала сотен клеток/г; в образце из скважины 224, используемой ранее в эксперименте по добыче урана методом скважинного подземного выщелачивания, численность бродильных бактерий достигала 10^6 кл./мл. Денитрифицирующие/нитратредуцирующие бактерии, восстанавливающие нитрат до стадии нитрита, были обнаружены в посевах всех образцов пород, максимальная численность составляла 10^3 –

10^4 кл./г породы из скв. Р-123 (513.1 и 523.7 м). Численность денитрифицирующих бактерий, восстанавливающих нитрат до молекулярного азота, была в среднем невелика – 10^2 кл./г породы, составляя 10^3 кл./г породы из скв. Р-78 (544.5 м). Бактерии, восстанавливающие Fe(III) до Fe(II) в среде с ацетатом, обнаружены в посевах породы из скв. Р-123 (513.1 и 523.7 м) и Р-76 (519.7 м) (рис. 1в). Популяция сульфатредуцирующих бактерий была малочисленной (рис. 1г), вероятно, из-за слабовосстановленных условий местообитания. Жизнеспособные сульфатредуцирующие бактерии не были обнаружены в посевах образцов из скв. Р-123 (523.7 м) и Р-224 (521.4 м) и достигали численности 10^4 кл./г породы в образце из скв. Р-76 (519.7 м). В пластовой воде из скв. Г-15 культивируемые сульфатредуцирующие бактерии и метаногены не были обнаружены. Первичные накопительные культуры, полученные при посеве пород, были использованы для определения состава микробного сообщества.

Филогенетическое разнообразие бактерий и архей в породе, пластовой воде и накопительных культурах. Для определения разнообразия микробного сообщества подземных горизонтов было проведено выделение ДНК из пробы пластовой воды скважины Г-15 и из шести образцов пород. Однако ДНК была выделена только из пробы пластовой воды Г-15 и из образца Р-224. Из пяти образцов пород ДНК выделить не удалось, вероятно, из-за низкой численности микроорганизмов в породах. Для получения более полного представления о составе подземного сообщества была выделена ДНК из 14 первичных накопительных культур, полученных при посеве пород на питательные среды. ДНК была использована для секвенирования V4 региона гена 16S рРНК. Всего было получено 267131 фрагментов гена (ридов). Полученные последовательности принадлежали в основном прокариотам домена *Bacteria*, гены архей обнаружены при анализе пластовой воды (<0.1% от суммы последовательностей в библиотеке) и накопительных культур ($\leq 0.2\%$). Покрываемость разнообразия филотипов *Bacteria*, рассчитанное с помощью Good's индекса, варьировало от 91 до 99% (табл. S3, доп. материалы). Количественное распределение фрагментов гена 16S рРНК прокариот домена *Bacteria* в библиотеках на уровне высших таксонов – филумов или классов у *Proteobacteria*, приведено на рис. 2.

В составе микробного сообщества образца породы Р-224 присутствовали *Firmicutes* (24.2%), *Fusobacteriota* (23.0%), *Proteobacteria* (18.7%), *Actinobacteriota* (15.5%) и *Bacteroidota* (9.0%). В пластовой воде доминировали бактерии филума *Proteobacteria* (90.7%); в меньшей степени были представлены *Firmicutes* (6.4%) и *Desulfobacterota* (1.4%). Последовательности архей, выявленные в библиотеках из

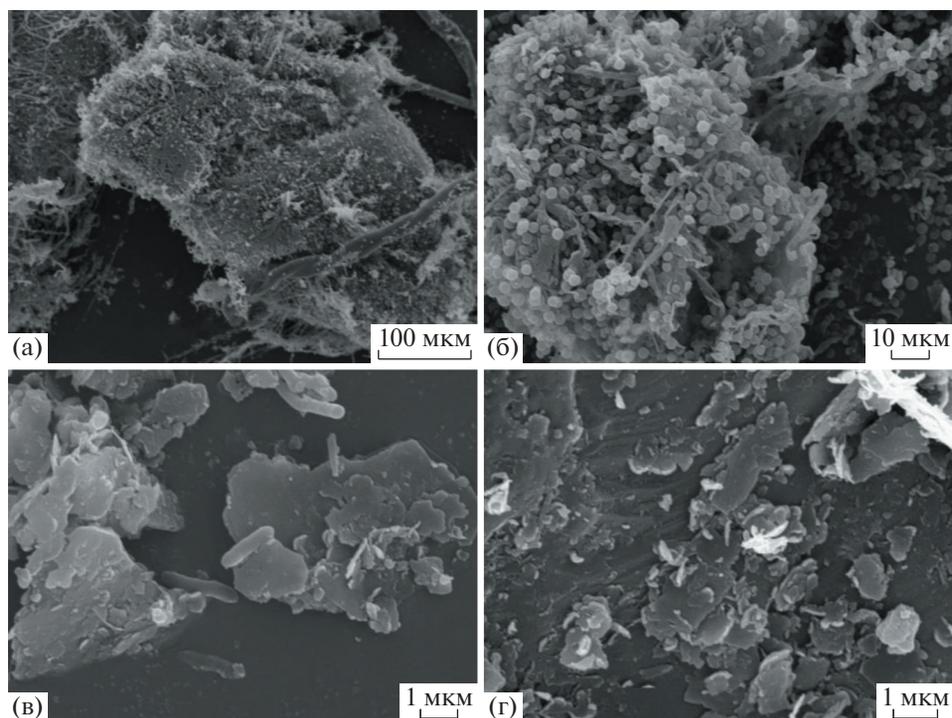


Рис. 1. Морфология клеток и биопленки в накопительных культурах денитрифицирующих DNB-R123a (а, б), железоредуцирующих FeRB-R123a (в) и сульфатредуцирующих SRB-R76b (г) бактерий после 14 сут инкубации на соответствующих средах.

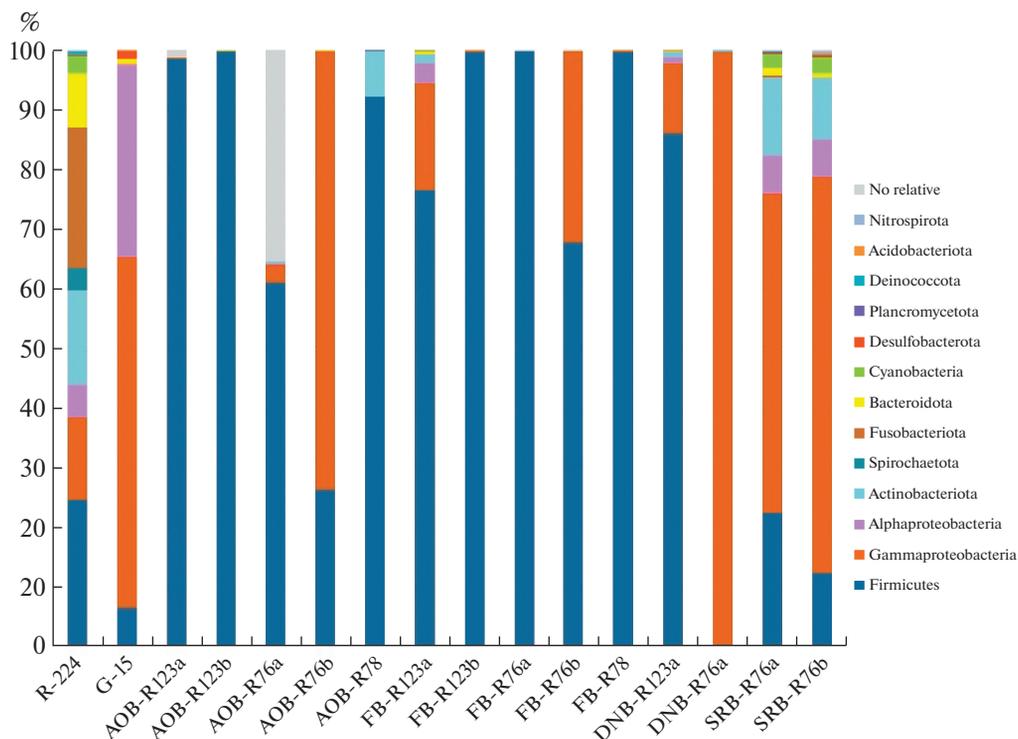


Рис. 2. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria* представленных на уровне филумов/классов в библиотеках из образцов породы из скв. Р-224 (=R-224), пластовой воды из скв. Г-15 (=G-15) и из накопительных культур. Обозначения библиотек на рис. 2 и 3: АОВ – аэробные органотрофные бактерии, DNB – денитрифицирующие бактерии, SRB – сульфатредуцирующие бактерии, FB – бродильные бактерии; номера соответствуют номерам скважин, из которых получали образцы породы или пластовую воду. Перечислены таксоны, составляющие >1% в каждой библиотеке.

накопительных культур SRB-R76a и SRB-R76b, принадлежали некультивируемым *Bathyarchaeia* филума *Crenarchaeota*, археям рода *Cuniculiplasma* и некультивируемым A-plasma сем. *Ferroplasmaceae* (филум *Thermoplasmata*). В пластовой воде G-15 и в накопительных культурах денитрифицирующих бактерий присутствовали археи филумов *Thermoplasmata* (Marine Group II), *Nanoarchaeota* (*Woesearchaeales*, некультивируемые SCGC AAA011-D5), а также *Crenarchaeota* (род *Candidatus Nitrosopumilus* и некультивируемые *Nitrososphaeraceae*), способные участвовать в цикле азота.

Перечень 25 родов, наиболее представленных в исследованных микробных сообществах, приведен на рис. 3. В образце породы отмечено наибольшее разнообразие гетеротрофных бактерий родов *Leptotrichia* (13.9%), *Fusobacterium* (9.1%), *Streptococcus* (7.8%) и *Actinomyces* (7.6%). В пластовой воде преобладали протеобактерии родов *Methylophaga* (41.1%), *Porphyrobacter* (19.9%), *Roseovarius* (7.9%), *Pseudomonas* (6.9%) и *Methylococcus* (6.0%). В культурах аэробных органотрофных бактерий доминировали спорообразующие бактерии родов *Bacillus* и *Paenibacillus* и не образующие спор бактерии рода *Anaerobaculum*, а также протеобактерии родов *Acinetobacter* и *Arthrobacter*. Бактерии родов *Bacillus* и/или *Paenibacillus* доминировали также в культурах бродильных бактерий и в культуре денитрифицирующих бактерий (DNB-R123a). Второе денитрифицирующее сообщество (DNB-R76a) почти полностью состояло из бактерий рода *Acinetobacter* (99.3%). Железо-(металл)-редуцирующие бактерии рода *Shewanella* были обнаружены среди минорных компонентов накопительной культуры бродильных бактерий FB-P123a. В среде для сульфатвосстанавливающих бактерий обнаружены *Gamma*протеобактерии родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Halomonas*, являющиеся обычными компонентами подземных микробных сообществ, связанных с залежами углеводородов; минорные компоненты сообщества SRB-R76b (менее 0.04% последовательностей в библиотеке) включали собственно сульфидогенные *Deltaproteobacteria* родов *Desulfotalea*, *Desulfocapsa*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium* и *Desulfovibrio*.

*Gamma*протеобактерии рода *Methylophaga* (41.1%) были наиболее представленной группой протеобактерий в пластовой воде. Спектр субстратов, используемых метилофагами в качестве единственных источников углерода и энергии, ограничен C₁-соединениями (метанол, метиламин, диметилсульфид), за исключением ряда видов, которые используют также фруктозу (Janvier, Grimont, 1995). Однако недавно была доказана способность бактерий рода *Methylophaga* деградировать высокомолекулярные полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) (Vila et al., 2010). С использованием [¹³C]n-гексадекана с

равномерно мечеными атомами углерода, впервые показано, что ряд представителей этого рода, обладает способностью использовать n-гексадекан (Mishamandani et al., 2014; Gutierrez, Aitken, 2014). Эти сведения расширяют роль метилотрофов рода *Methylophaga* в превращении органического вещества нефтяного генезиса. Бактерии рода *Methylophaga* были неоднократно обнаружены при исследовании микробных сообществ зоны нефтяного загрязнения морской воды в Мексиканском заливе (Kessler et al., 2011; Yang et al., 2014). Вероятно участие этих бактерий в деградации захороненного органического вещества в исследованных глубинных горизонтах. Сульфатредуцирующая популяция пластовой воды была представлена бактериями родов *Desulfobacterium* (1.2%), *Desulfomicrobium*, *Desulfocapsa* и другими.

Филогенетическое разнообразие низших грибов. Секвенирование межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) грибов, выросших в первичных культурах аэробных бактерий, позволило обнаружить низшие плесневые грибы в подземных пробах. В посевах образцов породы из скважин P-76 (519.7 м), P-123 (513.1 м) и P-78 (544.5 м) обнаружены, соответственно, низшие грибы родов *Mucor* (99.4%) и *Thamnidium* (97.6%) филума *Mucoromycota* и рода *Penicillium* (97.5%) филума *Ascomycota* (рис. 4а, 4б). Присутствие этих грибов в подземном местообитании, содержащем радионуклиды, представляется неслучайным. Известно, что грибы рода *Mucor* растут в анаэробных условиях, физиологически устойчивы к повышенному содержанию разных металлов (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, U и Zn) и накапливают их в виде наносфер в спорангиоспорах (Hoque, Fritscher, 2019). Эти свойства позволили рекомендовать грибы рода *Mucor* к применению в биотехнологиях биоремедиации местообитаний от металлов. Неоднократно отмечалась способность грибов рода *Mucor* использовать нефтяные углеводороды – алифатические и ароматические (BTEX = бензол, толуол, этилбензол и ксилол) соединения и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Аскомицеты рода *Penicillium* были обнаружены при метагеномном анализе загрязненных ураном почв (Savannah River Site, США) (Jaswal et al., 2019). Выделенные из почв штаммы рода *Penicillium* демонстрировали устойчивость к урану в концентрации 10 мМ и представляют интерес для биотехнологий биоремедиации экосистем от урана. Обнаруженные нами грибы родов *Mucor*, *Thamnidium* и *Penicillium*, вероятно, приспособлены к специфическим условиям подземного местообитания, характеризующегося повышенной концентрацией урана и присутствием захороненного растительного органического вещества.

Потенциальные функциональные характеристики микробных сообществ образцов пород и пластовой воды из месторождения Добровольное. Результаты

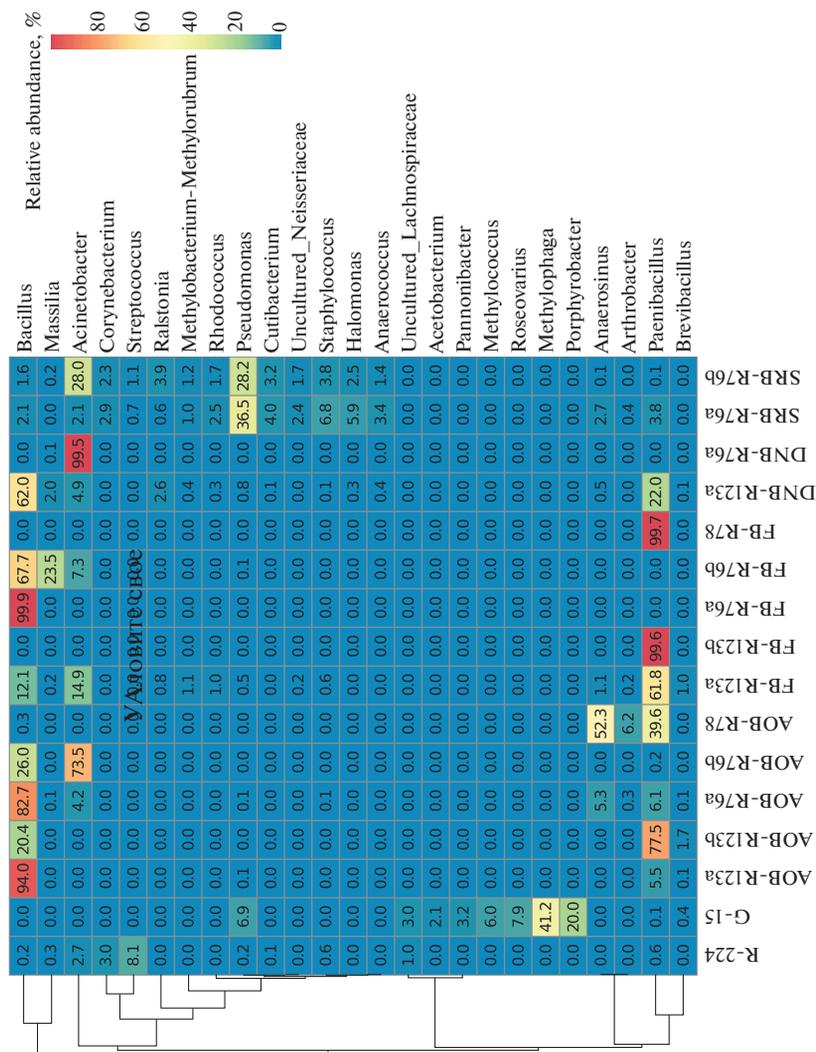


Рис. 3. Тепловая карта (heatmap) распределения 25 доминантных родов в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК бактериальных сообществ из образцов породы из скв. Р-224 (R-224), пластовой воды из скв. Г-15 (G-15) и накопительных культур, полученных из пород месторождения Добровольное. Двойная иерархическая дендрограмма показывает распределение бактерий в этих библиотеках. Переход цвета от красного обозначает относительно большие величины содержания отдельных родов (от менее представленного к более представленному роду в библиотеке). Цифры на диаграмме обозначают % от общего количества последовательностей в библиотеке из каждой пробы.

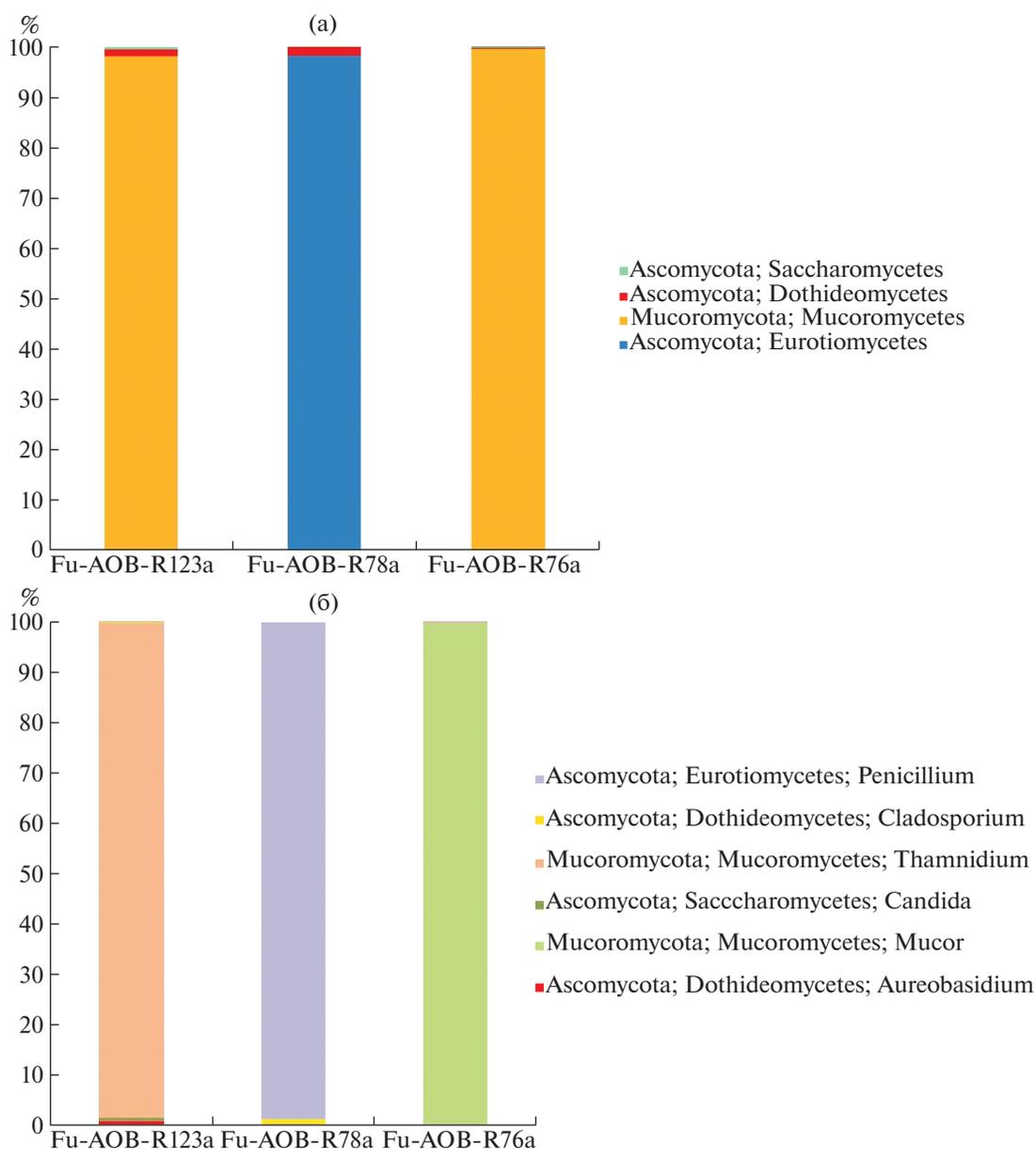


Рис. 4. Филогенетическое разнообразие грибов на уровне высших таксонов (а) и родов (б), обнаруженных в первичных культурах аэробных бактерий из образцов пород из скважин Р-76 (519.7 м), Р-78 и Р-123 (513.1 м).

определения филогенетического разнообразия бактерий в образце породы из скв. Р-224 (R-224) и пластовой воде из скв. Г-15 (G-15) были дополнительно проанализированы с помощью программного обеспечения iVikodak. На основании взаимосвязи между филогенией и функцией платформа iVikodak позволяет прогнозировать потенциальную функциональную активность сообщества с использованием данных 16S рРНК (Nagpal et al., 2019).

С помощью модуля “Global Mapper” программы iVikodak на основании использования базы данных KEGG были предсказаны функциональ-

ные характеристики исследуемых бактериальных сообществ образцов породы R-224 и пластовой воды G-15 (рис. 5). Бактерии, входящие в оба сообщества, осуществляли основные пути метаболизма углеводов и энергетического метаболизма. Однако сообщество пластовой воды G-15 обладало большей потенциальной способностью к осуществлению этих путей, а также путей метаболизма азота и серы, деградации ксенобиотиков, бензоата и связанных с ним путей деградации полициклических ароматических углеводов, аминокислот, толуола и хлорсодержащих органических соединений. Особое внимание было уделено превра-

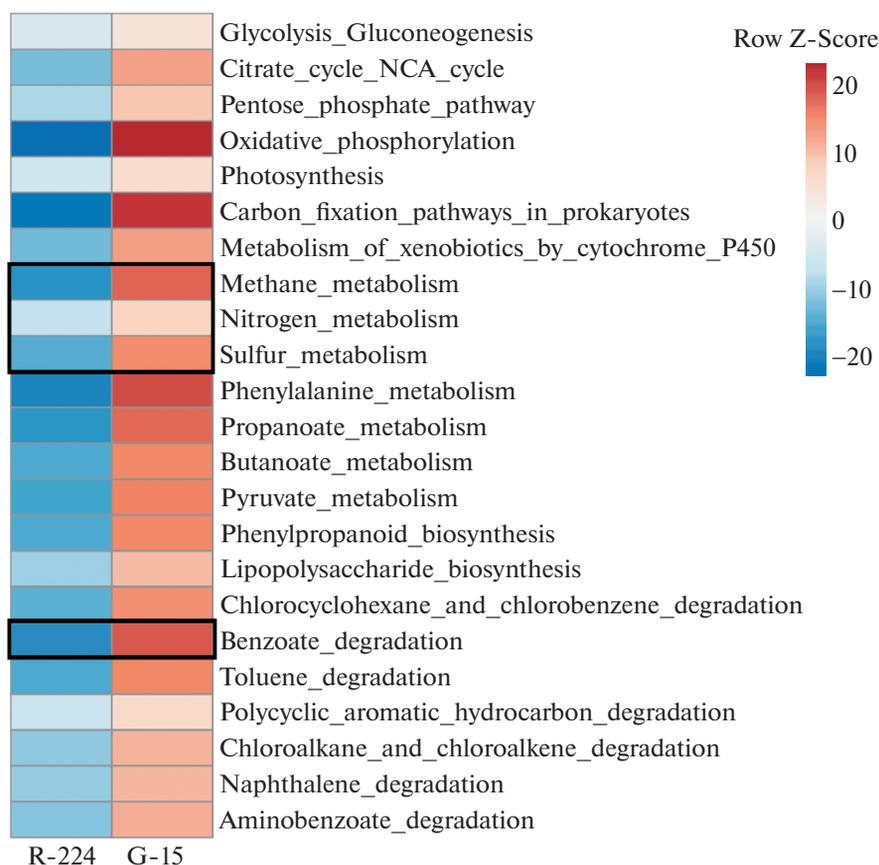


Рис. 5. Тепловая карта, показывающая сравнение функциональных профилей бактериальных сообществ образцов породы R-224 и пластовой воды G-15 (в относительных процентах) в программе iVikodak. Анализируемые ниже метаболические пути отмечены черной рамкой.

щениям соединений серы и азота, поскольку серную и азотистую кислоты используют для выщелачивания урана, а также превращениям бензоата, как центраболита деградации многих ароматических углеводородов, и превращениям метана и однокислотных соединений.

У бактерий, входящих в исследуемые сообщества, было предсказано наличие ферментов комплекса “Метаболизм азота”, участвующих в диссимиляционном восстановлении нитратов до молекулярного азота (собственно денитрификация) и нитратредукции с образованием аммония, а также в ассимиляционном восстановлении нитрата до аммония (рис. S2, доп. материалы). Микроорганизмы обладали наибольшей потенциальной активностью фермента нитратредуктазы (EC 1.7.5.1), который катализирует восстановление нитрата до нитрита в процессах денитрификации и диссимиляционной нитратредукции. Кроме него присутствовали остальные ферменты этих путей, катализирующие восстановление нитрита до молекулярного азота и аммония соответственно. В меньшей степени у микроорганизмов этих сообществ был представлен фермент ферредоксин-

нитратредуктаза (EC 1.7.7.2), катализирующий восстановление нитрата до нитрита в процессе ассимиляционной нитратредукции, и ферредоксин-нитритредуктаза (EC 1.7.7.1), завершающий этот процесс восстановлением нитрита до аммония. Все ферменты пути метаболизма азота были наиболее представлены у микроорганизмов пластовой воды G-15. Наибольший вклад в преобразование азота в сообществе породы R-224 вносили *Gammaproteobacteria* рода *Stenotrophomonas* и *Alphaproteobacteria* рода *Kordiimonas*, а в сообществе пластовой воды G-15 – *Gammaproteobacteria* родов *Methylophaga* и *Pseudomonas*, среди которых известны штаммы, способные к денитрификации (рис. S3, доп. материалы). Тепловые карты относительного содержания ферментов, участвующих в метаболизме азота (а), серы (б), бензоата (в) и метана (г) в бактериальных сообществах породы R-224 и пластовой воды G-15 приведены на рис. S4 (доп. материалы).

Бактерии родов *Methylophaga*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas* и *Ruegeria* входили в число ключевых микроорганизмов в метаболизме метана, азота, серы и бензоата в пробе пластовой воды G-15, хотя

их относительный вклад в эти процессы немного различался. В образце породы в число ключевых микроорганизмов метаболизма метана, азота и серы входили *Kordiimonas*, *Stenotrophomonas* и *Filifactor*; в превращениях бензоата участвовали преимущественно *Kordiimonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* и *Porphyrobacter* (рис. S5–S8, доп. материалы).

У бактерий, входящих в исследуемые сообщества, среди предсказанных ферментов комплекса “Метаболизм серы” выявлен фермент 3'-фосфаденозин 5'-фосфосульфат синтаза (ЕС 2.7.7.4), катализирующий восстановление сульфата до аденилил сульфата (рис. S5a, S5b). Микроорганизмы обладали также ферментами, катализирующими дальнейшее восстановление аденилил сульфата до сульфита, а затем до сульфида через пути ассимиляционной и диссимиляционной сульфатредукции. В сообществе G-15 диссимиляционная сульфатредукция обусловлена присутствием сульфатредуцирующих бактерий родов *Desulfotalea*, *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio* и *Desulfomicrobium* (рис. S6a, S6b).

Среди ферментов комплекса “Метаболизм метана” у микроорганизмов образцов породы и пластовой воды было предсказано наличие ферментов метилотрофии, т.е. использования в качестве источников углерода и энергии C₁-соединений, включающих окисленные или замещенные производные метана, не имеющие C–C связи (около 50 соединений), но неспособные расти на самом метане. У бактерий исследуемых сообществ был представлен фермент метанол:5-гидроксibenзимидазол-ликобамид ко-метилтрансфераза (ЕС 2.1.1.90), ключевой фермент катаболизма метанола, а также ферменты, катаболизирующие одноуглеродные ксенобиотики – триметиламин, диметиламин и метиламин до формальдегида. При этом представленность этих ферментов была значительно выше у микроорганизмов пластовой воды G-15, что, по-видимому, связано с преобладанием в этом сообществе метилотрофных бактерий рода *Methylophaga*.

В обоих сообществах присутствовали бактерии, обладающие двумя ключевыми ферментами пути аэробной деградации бензоата (“Benzoate degradation I”), бензоат-1,2-диоксигеназой (ЕС 1.14.12.10) и дигидроксициклогексадиен дегидрогеназой (ЕС 1.3.1.25), которые катаболизируют бензоат до катехола (рис. S7a, S7b, доп. материалы). У бактериальных сообществ предсказано наличие всех ферментов катаболизма катехола, как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА. Кроме того, у бактерий обеих сообществ присутствовал фермент бензоат-КоА-лигаза (ЕС 6.2.1.25), катализирующий превращение бензоата до бензоил-КоА – интермедиата биодеградации многих ароматических соединений. Однако ферменты осуществляемого через бензоил-

КоА другого пути деградации бензоата (“Benzoate degradation II”), преимущественно используемого анаэробными бактериями, при анализе исследуемых сообществ не были обнаружены. Этот же модуль программы iVcodak позволил оценить вклад бактерий различных таксонов в осуществление пути “Деградация бензоата”. В сообществе G-15 за деградацию бензоата отвечали *Alphaproteobacteria* родов *Porphyrobacter* и *Ruegeria* и *Gammaproteobacteria* родов *Pseudomonas*, *Methylophaga* и *Marinospirillum*, а в сообществе R-224 наибольший вклад в деградацию бензоата вносили бактерии родов *Kordiimonas* (*Alphaproteobacteria*) и *Stenotrophomonas* и *Acinetobacter* (*Gammaproteobacteria*) (рис. S8a, S8b, доп. материалы). Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* являются модельным объектом для изучения биодеградации широкого ряда соединений, в том числе, бензоата, катехола и других ароматических и полициклических соединений (Nogales et al., 2017). Имеются также сведения о присутствии генов деградации бензоата и активности детерминируемых ими ферментов и у представителей других выявленных программой родов.

Выделение чистых культур денитрифицирующих бактерий и их идентификация. Из накопительных культур аэробных органотрофных и денитрифицирующих бактерий были выделены чистые культуры (рис. 6). Поскольку большинство денитрифицирующих бактерий способно расти аэробно, чистые культуры получали путем посева накопительных культур на указанную выше агаризованную среду для аэробных бактерий и последовательных пересевов выросших единичных колоний в анаэробные условия на среду с нитратом. Выделенные штаммы идентифицировали методом анализа гена 16S рРНК. Уровень сходства полученных последовательностей с соответствующими генами из генетических банков составлял 99–100%, что позволяет отнести штаммы к известным видам родов *Bacillus*, *Peribacillus*, *Neobacillus*, *Acinetobacter* и *Variovorax* (табл. 1). Последовательности гена 16S рРНК, близкие генам выделенных штаммов, были выявлены также в составе библиотек образцов породы, пластовой воды и накопительных культур (табл. S4, рис. S9, доп. материалы). Из 14 штаммов, проверенных на способность восстанавливать нитрат до нитрита и/или молекулярного азота, 8 штаммов восстанавливали нитрат с образованием нитрита и N₂, 3 штамма – до стадии нитрита и 3 штамма не восстанавливали нитрат. С помощью реактива Грисса отмечено накопление нитрита штаммами V3, V4, V3P, V5a, V5b, выросшими в среде с сахарозой, тогда как штамм V2RSG не образовывал NO₂⁻ в этой среде.

Штамм *Bacillus megaterium* V1 накапливал NO₂⁻ в средах с молочной сывороткой и глюкозой, а штамм *Bacillus thuringiensis* V3 – в средах с глицери-

Таблица 1. Таксономическая принадлежность чистых культур бактерий, выделенных из образцов пород месторождения Добровольное, и продукты восстановления нитрата

Штамм	Номер последовательности гена 16S рРНК в Генбанке	Ближайший типовой штамм вида, номер последовательности гена 16S рРНК в Генбанке	Сходство генов 16S рРНК, %	Образуют NO ₂ ⁻ или N ₂	Номер скважины, глубина отбора керна
V1	MW541935	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308, CP035094.1	100	NO ₂ ⁻ , N ₂	P-123 (513.1 м)
V3	MW542185	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792, NR_114581	99.9	NO ₂ ⁻ , N ₂	P-78 (544.5 м)
V4	MW542204	<i>Acinetobacter lwoffii</i> NCTC 5866, NZ_KB851227	100	NO ₂ ⁻ , N ₂	P-76 (541.8 м)
V5a	MW542594	<i>Peribacillus simplex</i> NBRC 15720, NR_118967	99	NO ₂ ⁻ , N ₂	P-76 (519.7 м)
V5b	MW543416	<i>Peribacillus simplex</i> NBRC 15720, NR_118967	99.9	NO ₂ ⁻ , N ₂	P-76 (519.7 м)
V1P	MW543704	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579, NR_074540	99.9	NO ₂ ⁻	P-123 (513.1 м)
V2RSG	MW543921	<i>Neobacillus drentensis</i> NBRC 102427, AB681783	99.9		P-123 (523.7 м)
V2RS	MW543938	<i>Neobacillus drentensis</i> NBRC 102427, AB681783	99.9	NO ₂ ⁻	P-123 (523.7 м)
V2PS	MW544018	<i>Neobacillus drentensis</i> NBRC 102427, AB681783	99.9		P-123 (523.7 м)
V3P	MW544028	<i>Variovorax boronicumulans</i> NBRC 103145, AB681954	99.2	NO ₂ ⁻	P-78 (544.5 м)
V3RG	MW544052	<i>Variovorax boronicumulans</i> NBRC 103145, AB681954	99.2		P-78 (544.5 м)
V6T	MW542313	<i>Paenibacillus peoriae</i> KCTC 3763, NR_117743.1	99.3	NO ₂ ⁻ , N ₂	P-123 (513.1 м)
V7T	MW542572	<i>Acinetobacter lwoffii</i> CIP 64.10, JQ638586	99.9	NO ₂ ⁻ , N ₂	P-76 (541.8 м)
V8T	MW542576	<i>Acinetobacter lwoffii</i> CIP 64.10, JQ638586	99.9	NO ₂ ⁻ , N ₂	P-76 (541.8 м)

ном, глюкозой, сахарозой, молочной сывороткой и ацетатом. Наибольшее образование молекулярного азота в газовой фазе отмечено при росте штаммов *Acinetobacter lwoffii* V7T и V8T в среде с ацетатом и *Peribacillus simplex* V5b в среде с сахарозой.

Приведенные материалы свидетельствуют о присутствии в подземных горизонтах в зоне месторождения урана жизнеспособного микробного сообщества, включающего бактерии и низшие грибы. Вследствие затрудненного водообмена и массообмена численность культивируемых микроорганизмов в исследованных образцах пород была низка и достигала 10⁶ кл./г породы в зоне ранее проводившегося эксперимента по выщелачи-

ванию урана. Близкие значения численности культивируемых бактерий (10⁴–10⁵ кл./г) были обнаружены также в пробах из месторождения урана (Banduhurang) в Индии (Islam et al., 2011). Бактерии, выделенные из подземных горизонтов месторождения урана Добровольное, относились к родам *Bacillus*, *Peribacillus*, *Paenibacillus*, *Neobacillus*, *Variovorax* и *Acinetobacter*. Этот состав бактерий, выделенных из месторождения урана (Domiasiat) в Индии (Kumar et al., 2013). Проведенный KEGG анализ позволил выявить потенциальную функциональную активность исследованного подземного бактериального сообщества в превращениях компонентов захороненного органического веще-

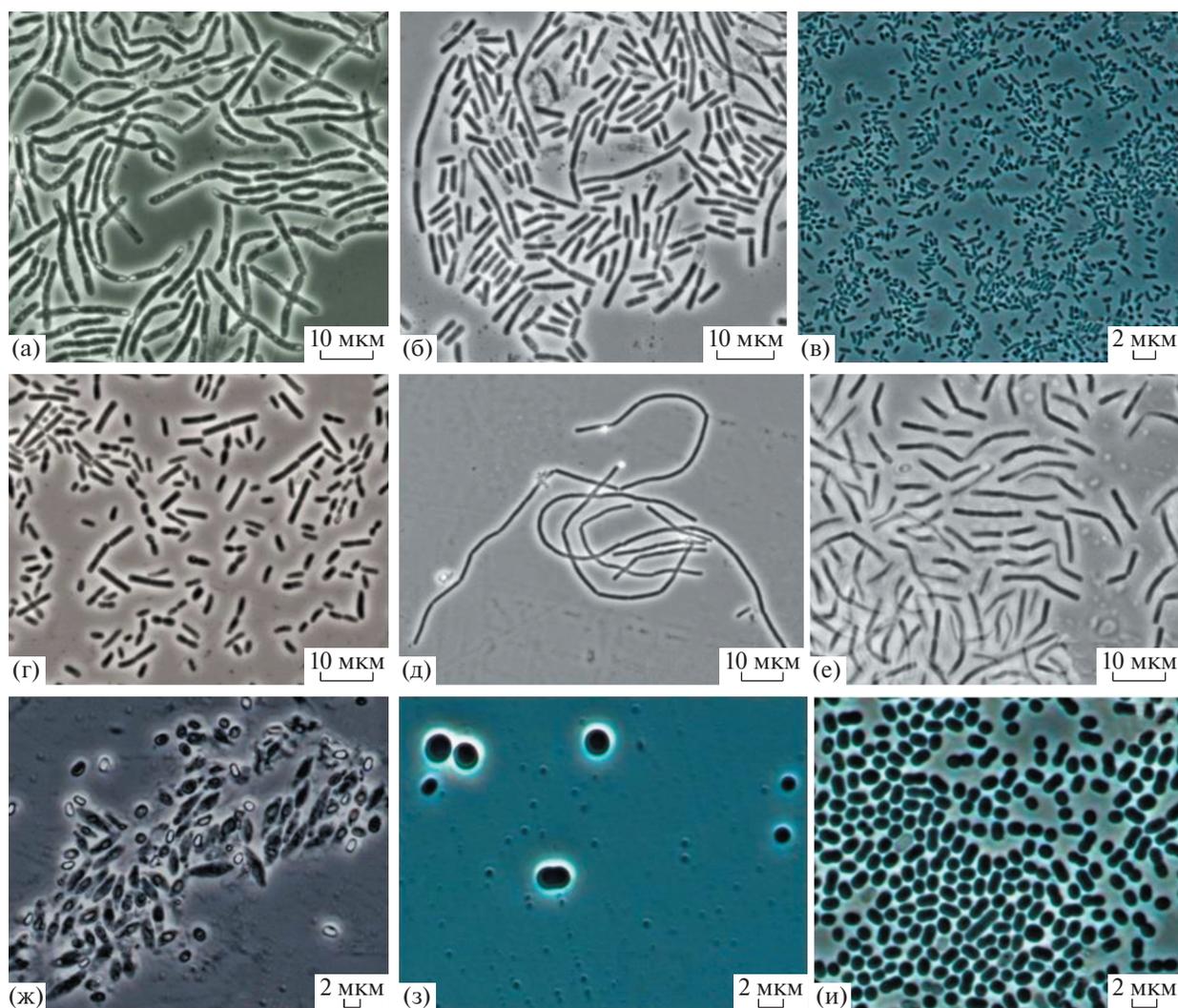


Рис. 6. Морфология клеток выделенных штаммов бактерий *Bacillus megaterium* V1 (а), *Bacillus thuringiensis* V3 (б), *Variovorax boronicumulans* V3P (в), *Acinetobacter lwoffii* V4 (г), *Bacillus simplex* V5a (д), *Peribacillus simplex* V5b (е), *Paenibacillus peoriae* V6T (ж), *Acinetobacter lwoffii* V7T (з), *Acinetobacter lwoffii* V8T (и).

ства, соединений серы и азота. Вероятно, потери азотистых соединений, выявленные на Далматовском месторождении, аналогичном по геологическим характеристикам месторождению Добровольное, могут быть обусловлены жизнедеятельностью денитрифицирующих бактерий, обитающих в подземных горизонтах.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Долбилин С.И., Мезенов И.А., Галашов С.Г., Ладейщиков А.В., Попонина Г.Ю., Самсонов Б.Г. Месторождение Добровольное // Месторождения урана в речных палеодолинах Уральского региона / Сост. Халезов А.Б. Ред. Машковцев Г.А. . М.: ВИМС, 2009. С. 68–77.
- Akob D.M., Mills H.J., Kostka J.E. Metabolically active microbial communities in uranium-contaminated subsurface sediments // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. P. 95–107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00203.x>
- Bhakat K., Chakraborty A., Islam E. Characterization of arsenic oxidation and uranium bioremediation potential of arsenic resistant bacteria isolated from uranium ore // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2019. V. 26. P. 12907–12919. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04827-6>
- Bokulich N.A., Mills D.A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities //

- Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 2519–2526.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03870-12>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena 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 // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. P. 335–336.
- Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J.* An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. V. 2. P. 6.
<https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>
- Green S.J., Prakash O., Jasrotia P., Overholt W.A., Cardenas E., Hubbard D., Tiedje J.M., Watson D.B., Schadt C.W., Brooks S.C., Kostka J.E.* Denitrifying bacteria from the genus *Rhodanobacter* dominate bacterial communities in the highly contaminated subsurface of a Nuclear Legacy Waste Site // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 1039–1047.
<https://doi.org/10.1128/AEM.06435-11>
- Gutierrez T., Aitken M.D.* Role of methylotrophs in the degradation of hydrocarbons during the Deepwater Horizon oil spill // *ISME J.* 2014. V. 8. P. 2543–2545.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.88>
- Hoque E., Fritscher J.* Multimetal bioremediation and biomining by a combination of new aquatic strains of *Mucor hiemalis* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 10318.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46560-7>
- Islam E., Dhal P.K., Kazy S.K., Sar P.* Molecular analysis of bacterial communities in uranium ores and surrounding soils from Banduhurang open cast uranium mine, India: A comparative study // *J. Environ. Sci. Health. Part A: Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2011. V. 46. P. 271–280.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2011.535433>
- Janvier M., Grimont P.A.D.* The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch γ of *Proteobacteria* // *Res. Microbiol.* 1995. V. 146. P. 543–550.
- Jaswal R., Pathak A., Edwards B., III, Lewis R., III, Seaman J.C., Stothard P., Krivushin K., Blom J., Rupp O., Chauhan A.* Metagenomics-guided survey, isolation, and characterization of uranium resistant microbiota from the Savannah River Site, USA // *Genes*. 2019. V. 10. Art. 325.
<https://doi.org/10.3390/genes10050325>
- Kessler J.D., Valentine D.L., Redmond M.C., Du M., Chan E.W., Mendes S.D., Quiroz E.W., Villanueva C.J., Shusta S.S., Werra L.M., Yvon-Lewis S.A., Weber T.C.* A persistent oxygen anomaly reveals the fate of spilled methane in the deep Gulf of Mexico // *Science*. 2011. V. 331. P. 312–315.
<https://doi.org/10.1126/science.1199697>
- Kumar R., Nongkhlaw M., Acharya C., Joshi S.R.* Uranium (U)-tolerant bacterial diversity from U ore deposit of Domiasiat in North-East India and its prospective utilisation in bioremediation // *Microbes Environ.* 2013. V. 28. P. 33–41.
<https://doi.org/10.1264/jsm2.me12074>
- Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* / Ed. Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
- Martinez R.J., Wang Y., Raimondo M.A., Coombs J.M., Barkay T., Sobecky P.A.* Horizontal gene transfer of PIB-type ATPases among bacteria isolated from radionuclide and metal-contaminated subsurface soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 3111–3118.
- Metsalu T., Vilo J.* ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. P. W566–W570.
- Mishamandani S., Gutierrez T., Aitken M.D.* DNA-based stable isotope probing coupled with cultivation methods implicates *Methylophaga* in hydrocarbon degradation // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. Art. 76.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00076>
- Mondani L., Benzerara K., Carrière M., Christen R., Mamin-dy-Pajany Y., Laureline Février L., Marmier N., Achouak W., Nardoux P., Berthomieu C., Chapon V.* Influence of uranium on bacterial communities: a comparison of natural uranium-rich soils with controls // *PLoS One*. 2011. V. 6. Art. e25771.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025771>
- Nagpal S., Haque M.M., Singh R., Mande S.S.* iVikodak – a platform and standard workflow for inferring, analyzing, comparing, and visualizing the functional potential of microbial communities // *Front. Microbiol.* 2019. V. 9. Art. 3336.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03336>
- Nazina T.N., Luk'yanova E.A., Zakharova E.V., Konstantinova L.I., Kalmykov S.N., Poltarau A.B., Zubkov A.A.* Microorganisms in a disposal site for liquid radioactive wastes and their influence on radionuclides // *Geomicrobiol. J.* 2010. V. 27. P. 473–486.
<https://doi.org/10.1080/01490451003719044>
- Newsome L., Morris K., Lloyd J.R.* The biogeochemistry and bioremediation of uranium and other priority radionuclides // *Chem. Geol.* 2014. V. 363. P. 164–184.
<https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.10.034>
- Nogales J., García J.L., Díaz E.* Degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas*: A systems biology view // *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* / Ed. Rojo F. Springer, Cham., 2017. P. 1–49.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_32-1
- North N., Dollhopf S.L., Petrie L., Istok J.D., Balkwill D.L., Kostka J.E.* Change in bacterial community structure during *in situ* biostimulation of subsurface sediment cocontaminated with uranium and nitrate // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 4911–4920.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4911-4920.2004>
- Postgate J.R.* The Sulfate-Reducing Bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1984.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41 (Database issue). Art. D590-596.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Radeva G., Selenska-Pobell S.* Bacterial diversity in water samples from uranium wastes as demonstrated by 16S

- rDNA and RISA retrievals // *Can. J. Microbiol.* 2005. V. 1. P. 910–923.
- Safonov A.V., Babich T.L., Sokolova D.S., Grouzdev D.S., Tourova T.P., Poltarau A.B., Zakharova E.V., Merkel A.Y., Novikov A.P., Nazina T.N. Microbial community and *in situ* bioremediation of groundwater by nitrate removal in the zone of a radioactive waste surface repository // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 1985. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01985>
- Senko J.M., Dewers T.A., Krumholz L.R. Effect of oxidation rate and Fe(II) state on microbial nitrate-dependent Fe(III) mineral formation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 7172–7177.
- 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. Art. e105592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
- Vila J., Nieto J.M., Mertens J., Springael D., Grifoll M. Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2010. V. 73. P. 349–362.
- Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria // *The Prokaryotes* / Ed. Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer, K.-Z. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. Ch. 183. P. 3352–3337.
- Wu W.-M., Carley J., Green S.J., Luo J., Kelly S.D., Van Nostrand J., Lowe K., Mehlhorn T., Carroll S., Boonchayanant B., Löffler F.E., Watson D., Kemner K.M., Zhou J., Kitanidis P.K., Kostka J.E., Jardine P.M., Criddle C.S. Effects of nitrate on the stability of uranium in a bioreduced region of the subsurface // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. P. 5104–5111. <https://doi.org/10.1021/es1000837>
- Yang T., Nigro L.M., Gutierrez T., D'Ambrosio L., Joye S.B., Highsmith R., Teske A.P. Pulsed blooms and persistent oil-degrading bacterial populations in the water column during and after the Deepwater Horizon blowout // *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography.* 2016. V. 129. P. 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2014.01.014>

Phylogenetic Diversity and Potential Activity of Bacteria and Fungi in the Deep Subsurface Horizon of an Uranium Deposit

T. L. Babich¹, E. M. Semenova¹, D. Sh. Sokolova¹, T. P. Tourova¹, S. Kh. Bidzhieva¹, N. G. Loiko¹, G. I. Avdonin², N. I. Lutsenko³, and T. N. Nazina^{1,*}

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

²Fedorovsky All-Russian Scientific Research Institute of Mineral Resources, Moscow, 119017 Russia

³Dalur Co., Kurgan region, 641750 Russia

*e-mail: nazina@inmi.ru

Received March 5, 2021; revised March 8, 2021; accepted March 12, 2021

Abstract—The composition of microbial communities in rock samples, reservoir water, and enrichment cultures from subsurface horizons of an uranium deposit (Russia) was determined. The studied horizons were located in the zone of hindered water exchange at a depth of 513–544 m, characterized by moderate salinity (up to 15 g/L) of reservoir water and the presence of charry plant organic matter. The biodiversity of autochthonous subsurface prokaryotes was determined by high-throughput sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene. Bacterial phyla predominant in the rock samples were *Firmicutes* (24.2%), *Fusobacteriota* (23.0%), *Proteobacteria* (18.7%), *Actinobacteriota* (15.5%) and *Bacteroidota* (9.0%). The predominant bacterial phylum in the reservoir water was *Proteobacteria* (90.7%), including representatives of the genera *Methylophaga*, *Porphyrobacter*, *Roseovarius*, *Pseudomonas*, and *Methylococcus*. Sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) revealed occurrence of lower fungi of the genera *Mucor* and *Thamnidium* (phylum *Mucoromycota*) and of the genus *Penicillium* (phylum *Ascomycota*) in the rock samples; members of these genera are known for their resistance to heavy metals and the ability to use complex organic substrates. The functional characteristics of bacterial communities of the rock and reservoir water samples, predicted by the iVikodak program and the KEGG database, showed that reservoir water bacteria had a higher potential ability to carry out the pathways of carbohydrate, nitrogen, and sulfur metabolism, degradation of xenobiotics, benzoate, polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated organic compounds than the rock microbiota. Enrichment cultures of iron-reducing and sulfate-reducing bacteria and pure cultures of denitrifying bacteria of the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, and *Acinetobacter* were obtained. These results indicate the presence of a small but viable microbial community that can participate in the processes of transformations of carbon, nitrogen, sulfur, and metals in the subsurface horizon when water exchange is activated.

Keywords: deep subsurface horizons, high-throughput sequencing, 16S rRNA gene, bacteria, ITS, fungi, functional diversity, iVikodak, uranium deposit

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ВОЗМОЖНАЯ АКТИВНОСТЬ В ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТАХ ПОДЗЕМНЫХ ХРАНИЛИЩ ГАЗА¹

© 2021 г. Т. Н. Назина^{а, *}, Л. А. Абукова^б, Т. П. Турова^а, Т. Л. Бабич^а,
С. Х. Биджиева^а, Д. С. Филиппова^б, Е. А. Сафарова^б

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

^бИнститут проблем нефти и газа РАН, Москва, 119333 Россия

*e-mail: nazina@inmi.ru

Поступила в редакцию 09.05.2021 г.

После доработки 14.05.2021 г.

Принята к публикации 17.05.2021 г.

В последние годы предлагается использовать подземные хранилища природного газа для хранения “зеленого” газа, содержащего биогаз, синтетический метан и молекулярный водород. Состав микробных сообществ подземных хранилищ газа (ПХГ) и воздействие на них H₂ мало изучены. Настоящая работа посвящена определению микробного разнообразия в пробах пластовой воды из подземных горизонтов Щелковского, Касимовского и Калужского ПХГ. Подземные воды представляют собой анаэробное местообитание, содержащее уксусную кислоту и другие низшие жирные кислоты, метанол и растворенные газы, которые могут служить субстратами для микроорганизмов. Показана низкая численность культивируемых аэробных органотрофных бактерий и анаэробных бродильных, сульфатредуцирующих и метаногенных микроорганизмов в исследованных пробах. Методом высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК в составе всех исследуемых подземных микробных сообществ обнаружены бактерии *Firmicutes* (2.4–53.6%), *Bacteroidetes* (1.0–39.7%), *Alphaproteobacteria* (0.9–9.6%), *Actinobacteria* (0.1–1.7%), *Desulfobacteria* (0.1–1.6%), *Verrucomicrobia* (0–3.4%) и *Planctomycetes* (0–1.3%). Доля архейных последовательностей в библиотеках не превышала 1.5%. В пробе воды из Калужского ПХГ преобладали бактерии рода *Marinobacter*; среди минорных компонентов обнаружены метаногены родов *Methanosphaera*, *Methanobolus* и *Methanobrevibacter*. В пластовой воде из Щелковского и Касимовского ПХГ преобладали метилотрофные бактерии родов *Methylococcus* и *Methylobacterium–Methylorubrum* и анаэробные бродильные бактерии рода *Bacteroides*. С использованием программы iVikodak показана потенциальная способность микробных сообществ к использованию метана, метанола, бензоата и полициклических ароматических углеводородов и участию в превращениях соединений серы и азота. В составе подземных сообществ обнаружены бактерии и археи, потенциально способные использовать H₂ в энергетическом метаболизме, в том числе, в процессах сульфатредукции, метаногенеза и ацетогенеза. Эти результаты свидетельствуют о необходимости микробиологического и геохимического мониторинга в ходе эксплуатации ПХГ, особенно при закачке водорода.

Ключевые слова: подземные хранилища газа, бактерии, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, функциональное разнообразие, iVikodak, водород

DOI: 10.31857/S002636562105013X

Диверсификация источников энергоснабжения сопровождается расширением использования возобновляемых источников энергии, в том числе, “зеленого” газа, включающего биогаз, синтетический метан и водород (Барсук и соавт., 2018). Увеличение доли молекулярного водорода, образуемого биогенно при переработке отходов или в процессе электролиза, обуславливает необходимость его хранения и транспортировки от места

производства к месту потребления. Хранилищами газа служат истощенные нефтяные и газовые месторождения, соляные пещеры, глубинные водоносные горизонты, заброшенные шахты и др. Подземные системы населены микроорганизмами, что наиболее исследовано в случае месторождений нефти и газа (Magot et al., 2000). Поэтому необходима предварительная оценка влияния водорода на подземные микробные процессы и обратное воздействие микроорганизмов на запасы поступающего в пласт водорода. Немногочисленные работы, посвященные изучению разнообразия и функционирования микроорганизмов в

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S002636562105013X для авторизованных пользователей.

ПХГ, обобщены в обзорах (Gregory et al., 2019; Dorffel et al., 2021). Высказано предположение, что нагнетание 5–10% водорода в ПХГ может приводить к активации трех основных микробных процессов – сульфатредукции, метаногенеза и ацетогенеза. Потери внесенного в пласт водорода и образование метана и сероводорода в результате активности метаногенных и сульфатредуцирующих прокариот были зарегистрированы в ПХГ в Лободице (Чехия) (Šmigáň et al., 1990). Состав населяющих пласт микроорганизмов, пластовых вод и пород оказывает определяющее влияние на минералогию и геохимические реакции в пласте. В пробе воды из водоносных горизонтов верхнеюрских отложений, отобранной на расстоянии 350 м от ПХГ (Париж, Франция), было обнаружено малочисленное микробное сообщество, включающее автотрофные сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio aespoeensis* и гомоацетогенные *Acetobacterium carbinolicum*, способные расти на водороде (Basso et al., 2009). Авторы сделали вывод о том, что поступающие в хранилище газы не влияют на микробное разнообразие в водоносном горизонте, расположенном вблизи ПХГ.

Показано, что микроорганизмы, населяющие нефтяные пласты (Nazina et al., 2017), гранитные породы (Pedersen et al., 2014) и другие подземные экосистемы, зависят от метаболизма водорода. Добавление молекулярного водорода в изолированные пробы пластовой воды из нефтяных месторождений приводило к стимуляции процессов сульфатредукции и метаногенеза (Nazina et al., 1995, 2017; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003). Высокоактивный процесс литоавтотрофного ацетогенеза был также зарегистрирован в нефтяном пласте (Велуаев, Ворзенков, 1993). Эти результаты свидетельствуют о наличии в нефтяных пластах микроорганизмов, способных использовать молекулярный водород в процессах сульфатредукции, образования метана и ацетата. Можно полагать, что закачка водорода в выработанные нефтяные и газовые месторождения будет сопровождаться активизацией автохтонных микробных популяций, использующих молекулярный водород для восстановления сульфата или CO_2 /бикарбоната в зависимости от их наличия в подземном местообитании.

В настоящее время в России действует 25 ПХГ, из них 17 хранилищ создано на базе отработанных месторождений, 8 – в водоносных структурах. В пробах воды, отобранных из разных объектов Северо-Ставропольского ПХГ, были обнаружены бродильные, ацетогенные, железоредуцирующие, сульфатредуцирующие и метаногенные прокариоты, которые могут вносить определенный вклад в геохимию органических и неорганических соединений в экосистеме ПХГ (Иванова и соавт., 2007а, 2007б). Зарегистрированы высокие скорости сульфатредукции и метаногенеза в технологических емкостях этого ПХГ. Выделены чистые

культуры прокариот родов *Eubacterium*, *Sporomusa* и *Methanosarcina*, использующие метанол и ацетат (Тарасов и соавт., 2011а). Ацетогенный штамм *Eubacterium limosum* AG12 рос также в среде с H_2 и CO_2 , образуя бутират и ацетат. Штамм *Methanobacterium formicicum* MG134 рос на водород-углекислотной смеси, образуя метан. Ацетогенные штаммы *E. limosum* AG12 и *Sporomusa sphaeroides* AG8-2 при росте на метаноле продуцировали водород, который поддерживал рост водород-использующей сульфатредуцирующей бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* SR12 или метаногена *M. formicicum* MG134 (Тарасов и соавт., 2011б). Микроорганизмы, населяющие подземные горизонты хранилища газа, были приспособлены к физико-химическим условиям местообитания и использовали молекулярный водород, метанол и другие органические субстраты в своем метаболизме. Эти результаты свидетельствуют о необходимости исследования микробных популяций, населяющих подземные горизонты, которые предполагается использовать для закачки “зеленого” газа, содержащего водород.

Целью настоящей работы было определение численности и филогенетического разнообразия микроорганизмов в пробах вод из подземных горизонтов Щелковского, Касимовского и Калужского хранилищ газа и оценка их возможной функциональной активности с использованием методов биоинформатики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектом микробиологических исследований были 17 проб пластовой воды, отобранные в сентябре–октябре 2020 г. с разной глубины из скважин на территории Щелковского, Касимовского и Калужского ПХГ. На Щелковском ПХГ анализировали пробы пластовой воды из щигровского и ряжского горизонтов с глубины 925–980 и 1115–1154 м соответственно (табл. S1, дополнительные материалы). Верхний песчаный пласт щигровского горизонта используется в качестве пласта-коллектора для ПХГ и для захоронения промстоков. Перекрывается щигровский водоносный горизонт пачкой щигровских глин (20 м) и глинисто-карбонатными отложениями толщиной более 100 м. Воды щигровского горизонта – хлоридно-натриевые рассолы с минерализацией 129–131 г/л, рН 6.4–7.0. В состав водорастворенных газов входят азот (60–90 об. %), углекислота (0–4 об. %), метан (0–5 об. %) и водород (1–40 об. %). Пластовые воды ряжского горизонта представлены рассолами хлоридно-кальциевого типа с минерализацией 142.6–217.9 г/л, рН 6.3–7.3. На Касимовском ПХГ отбирали пластовую воду из нижнешигровского горизонта, залегающего на глубине 760–820 м. Пластовые воды горизонта представлены рассолами хлоридно-

кальциевого типа (по Сулину) с минерализацией 137.4–219.4 г/л, pH 6.1–8.8. Водорастворенный газ преимущественно азотного состава, кроме того, в газе присутствовали углеводороды (0.5–13.6 об. %). На Калужском ПХГ анализировали пластовую воду гдовского горизонта, характеризующуюся значительным разнообразием по химическому составу и основным свойствам. Пластовые воды представлены солеными водами или рассолами хлоридно-кальциевого (скв. 13, 27, 31, 32, 61, 70, 81, 106, 121), хлоридно-магниевого (скв. 36 и 65) и гидрокарбонатно-натриевого (скв. 43 и 48) типа с минерализацией до 53.6 г/л. Кислотность вод варьирует от слабокислой до сильнощелочной (pH 5.4–9.7). Водорастворенные газы имеют различный состав от метанового, метаново-азотного до азотно-метанового и азотного. Температура пластов-коллекторов гдовского горизонта варьировала от 17 до 22°C, остальных коллекторов составляла 22–24°C. Характеристика ПХГ приведена в табл. S1 (дополнительные материалы).

Состав сред. Пробы подземных вод использовали для определения численности микроорганизмов ряда физиологических групп методом предельных десятикратных разведений. Результаты оценивали методом наиболее вероятного числа по таблице Мак Креди. Численность аэробных органотрофных микроорганизмов оценивали микроскопированием посевов пластовой воды в серии разведений в среде следующего состава (г/л): глюкоза – 1.0, бакто-триптон – 5.0, дрожжевой экстракт – 2.5, NaCl – 2.0–60.0, pH 7.0–7.2. Численность бродильных микроорганизмов оценивали микроскопированием посевов и обнаружением молекулярного водорода в посевах в среде следующего состава (г/л): пептон – 4.0; глюкоза – 10.0; Na₂SO₄ – 2.0; MgSO₄ – 1.0; NaCl – 2.0–60.0, соль Мора (FeSO₄ · (NH₄)₂SO₄ · 6H₂O) – 0.5; Na₂S · 9H₂O – 0.1. pH 7.2 (Postgate, 1984). В качестве газовой фазы использовали аргон, очищенный от кислорода. Численность денитрифицирующих бактерий оценивали по появлению молекулярного азота в среде следующего состава (г/л): KCl – 0.1; MgSO₄ · 7H₂O – 0.2; CaCl₂ · 2H₂O – 0.2; KH₂PO₄ – 0.75; K₂HPO₄ – 1.5; NH₄Cl – 0.9; NaCl – 2.0–60.0; NaNO₃ – 0.85; ацетат натрия – 2.0; газовая фаза – аргон. Параллельно с определением N₂ в газовой фазе оценивали образование нитрита в среде с помощью реактива Грисса. Численность сульфатвосстанавливающих бактерий определяли по образованию сульфида в посевах в среде, содержащей (г/л): MgCl₂ · 6H₂O – 3.0; CaCl₂ · 2H₂O – 0.15; Na₂SO₄ – 4.0; NH₄Cl – 0.25; KH₂PO₄ – 0.2; KCl – 0.5; NaHCO₃ – 1.6; лактат натрия – 4.0; дрожжевой экстракт – 0.5; Na₂S · 9H₂O – 0.2; NaCl – 2.0–60.0 (Widdel, Bak, 1992); газовая фаза – аргон. Метаногенов учитывали по образованию метана в газовой фазе в серии разведений в среде следующего

состава (г/л): MgCl₂ · 6H₂O – 0.3; CaCl₂ · 2H₂O – 0.15; NH₄Cl – 0.25; KH₂PO₄ – 0.2; KCl – 0.5; NaCl – 2.0–60.0; NaHCO₃ – 2.5; ацетат – 2.5; метанол 2.0 мл/л; Na₂S · 9H₂O – 0.5 г/л, газовая фаза – H₂/CO₂ (4 : 1). Во все среды вносили микроэлементы как описано ранее (Биджиева и соавт., 2018). Среды для анаэробных бактерий готовили, используя анаэробную технику Хангейта. Посевы инкубировали в стационарных условиях при температуре 20–22°C в течение 14–21 сут. Посевы микроскопировали, используя световой микроскоп Olympus с фазово-контрастным устройством, при увеличении 100 × 10.

Аналитические методы. Водород, азот, метан и углекислоту определяли газохроматографическим методом, сульфид – колориметрическим методом с N,N-диметил-*p*-фенилендиамином, летучие кислоты, низшие спирты и кетоны анализировали на газовом хроматографе “Shimadzu GC 2010 Plus” (Япония) с колонкой ZebronZB-FFAP как описано ранее (Биджиева и соавт., 2018).

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование гена 16S рРНК микроорганизмов пластовой воды. Для определения состава микробного сообщества методом анализа гена 16S рРНК использовали пробы пластовой воды объемом 1 л каждая, фиксированные 96% этиловым спиртом (1 : 1, об./об.). Пробы фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (“MerckMillipore”, США). Биомассу клеток смывали с фильтров лизирующим раствором, содержащим 0.15 М NaCl и 0.1 М Na₂EDTA (pH 8.0), и использовали для выделения ДНК. Выделение тотальной ДНК проводили с использованием набора PowerSoil DNA Isolation Kit (“MoBio”, США), согласно рекомендациям производителя. Полученная ДНК хранилась в холодильнике при –20°C. Библиотеки гена 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq были приготовлены по схеме, описанной в статье (Gohl et al., 2016). Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации V4 участка гена 16S рРНК путем ПЦР с использованием двух праймеров. Прямой праймер (5'-CAAGCAGAA-GACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTXXXXXXXXXXXXXZZZZGTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') состоял, соответственно, из “5' Illumina Linker Sequence”, “Index 1”, “Heterogeneity Spacer” (Fadrosh et al., 2014) и 515F праймерной последовательности (Hugerth et al., 2014); обратный праймер (5'-AATGATACGCGACCACCGGATCTACACTCTTTCCCTACGACGCTCTTCCGATCTXXXXXXXXXXXXXZZZZGACTACNVGGGTMTCTAATCC-3') включал “3' Illumina Linker Sequence”, “Index 2”, “Heterogeneity Spacer” и Pro-mod-805R праймерную последовательность (Merkel et al., 2019) соответственно. Длина прочтения составляла 200–

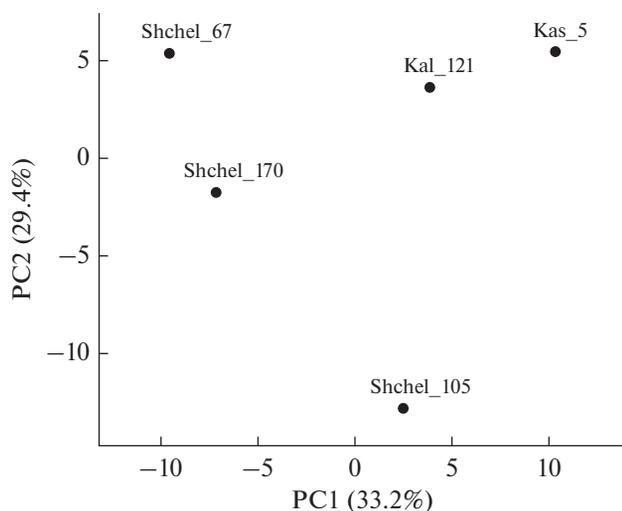


Рис. 1. Сравнение состава микробных сообществ пластовой воды из месторождения ПХГ методом анализа главных компонент (PCA), основанным на относительном обилии операционных таксономических единиц, включающих гены 16S рРНК ($\geq 97\%$ сходства) прокариот. Обозначения библиотек на рис. 1 и далее по тексту соответствуют номерам скважин, из которых получали пластовую воду, Щелковское ПХГ обозначено Shchel, Калужское ПХГ – Kal, Касимовское – Kas.

250 нуклеотидов. Полученные парноконцевые чтения были подвергнуты процедуре контроля качества с использованием UPARSE (Edgar, 2013) и затем сгруппированы для создания операционных таксономических единиц (ОТЕ) с уровнем сходства 97% с использованием USEARCH (Edgar, 2010). ОТЕ идентифицировали с использованием базы данных QIIME, онлайн-ресурса SILVA (<https://www.arb-silva.de/ngs/>). Анализ состава микробных сообществ методом тепловой карты был выполнен с использованием ClustVis (Metsalu, Vilo, 2015). Статистические подсчеты осуществляли с помощью Microsoft Excel. Индексы разнообразия были рассчитаны с использованием программы EstimateS (<http://purl.oclc.org/estimates>). Онлайн-ресурс ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>, декабрь 2020 г.) был использован для создания тепловых карт (heatmaps) членов сообщества на родовом уровне.

Последовательности прокариот с уровнем сходства $\geq 97\%$, объединенные в операционные таксономические единицы (ОТЕ) и идентифицированные с использованием онлайн-ресурса SILVA, были использованы для предсказания функциональных характеристик бактериальных сообществ с использованием пакета программ iVikodak (Nagpal et al., 2019). Модуль Global Mapper базы данных KEGG использовали для получения функциональных профилей, а Local Mapper – для прогнозирования индивидуальных профилей

ферментов метаболизма азота, серы, бензоата и метана у бактерий исследуемых микробных сообществ. Тепловые карты функциональных профилей и ферментов, предсказанных для сообществ, были построены с использованием интернет-ресурса ClustVis (<http://biit.cs.ut.ee/clustvis/>, ноябрь 2020 г.).

Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК исследованных микробных сообществ из водоносных горизонтов ПХГ депонированы в NCBI (Bioproject PRJNA724815, SRA 14189839–14189843).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические условия и численность культивируемых микроорганизмов в пластовых водах из ПХГ. Пробы пластовой воды из подземных горизонтов Щелковского, Калужского и Касимовского подземных хранилищ газа характеризовались широким спектром минерализации от 1.4 до 232.8 г/л, реакцией среды от слабокислой до щелочной (рН 5.2–9.8). В пластовой воде обнаружены низшие спирты, концентрация которых достигала 15–19 г/л, уксусная кислота (0–93 мг/л) и другие C_3 – C_5 низшие летучие кислоты (≤ 57 мг/л) (табл. 1).

В результате посевов пластовой воды на питательные среды были обнаружены аэробные организмы, численность которых была очень низка (≤ 10 кл./мл) (рис. S1, дополнительные материалы). Численность бродильных бактерий в единичных пробах составляла 10^2 кл./мл, среди них доля бактерий, образующих молекулярный водород в составе продуктов брожения, была на порядок ниже. Численность денитрифицирующих бактерий, восстанавливающих нитрат до стадии нитрита и далее до молекулярного азота, также ограничивалась 10^2 кл./мл. Культивируемые сульфатредуцирующие бактерии и метаногены были обнаружены лишь в единичных пробах пластовой воды из Калужского ПХГ. Получены накопительные культуры сульфидогенных и метаногенных прокариот в среде с молекулярным водородом (из скв. 106, 81, 61, 161, 121).

Филогенетическое разнообразие подземного микробного сообщества. ДНК микроорганизмов из пяти проб пластовой воды была использована для секвенирования V4 региона гена 16S рРНК. В результате было получено 5 библиотек, включающих суммарно 36676 фрагментов гена (ридов) (табл. S2, дополнительные материалы). В трех из пяти библиотек количество ОТЕ было в интервале от 1114 до 2068. Несмотря на похожие физико-химические условия, исследованные пробы пластовой воды отличались между собой по составу микроорганизмов, о чем свидетельствуют результаты сравнения бета-разнообразия (рис. 1).

Таблица 1. Физико-химическая характеристика проб воды, отобранных на Щелковском, Касимовском и Калужском ПХГ в 2020 г.

№ скважины	Глубина отбора проб, м	Минерализация, г/л/ NaCl*, г/л	рН	Содержание, мг/л			
				метанол	$\Sigma(C_2-C_4)$ спирты)	ацетат	$\Sigma(C_3-C_5)$ ЛЖК)
Щелковское ПХГ, шигровский горизонт							
67	900	124.04*	7.2	474.6	11.7	22.9	11.7
105	950	136.57*	6.4	41.2	15.9	55.1	20.5
161	980	142.95*	6.6	0	0	93.1	32.2
170	925	138.17*	8.7	5.5	5.6	39.0	17.5
162**	1154	232.81*	5.3	491.3	21.8	35.5	6.9
Касимовское ПХГ, нижнешигровский горизонт							
5	820	147.3	7.0	0.7	13.0	91.1	40.5
Калужское ПХГ, гдовский горизонт							
27	890	1.478	9.6	3.8	0	19.4	25.1
32	895	5.667	6.6	92.9	5.0	38.0	29.1
36	904	6.824	9.8	128.0	6.4	63.6	9.4
43	890	16.677	6.9	611.3	6.6	32.8	14.1
48	885	6.376	9.5	6.3	0	19.5	24.7
61	904	33.222	7.3	450.2	7.9	18.6	17.0
65	376	198.366	7.2	206.6	4.1	9.3	8.7
70	940	17.371	8.5	15078.1	60.1	15.4	6.1
81	910	6.66	5.2	95.1	10.8	28.7	8.4
106	491	23.344	8.2	19211.0	80.3	22.8	8.4
121	40	44.131	8.5	10.0	2.9	11.8	6.0

* Минерализация в пересчете на количество NaCl, г/л.

** Рязский горизонт.

Количественное распределение полученных фрагментов гена 16S рРНК представителей доменов *Bacteria* и *Archaea* в библиотеках на уровне высших таксонов – филумов приведено на рис. 2. В составе микробных сообществ пластовой воды были обнаружены представители 28 филумов, однако только 8 высших таксонов включали более 1% последовательностей в составе хотя бы одной из библиотек, в том числе *Firmicutes* (2.4–53.6%), *Bacteroidetes* (1.0–39.7%), *Proteobacteria* (4.9–94.5%), *Actinobacteria* (0.1–1.7%), *Desulfobacteria* (0.1–1.6%), *Verrucomicrobia* (0–3.4%) и *Planctomycetes* (0–1.3%). Доля архейных последовательностей была низка и составляла 1.5% в библиотеке из пластовой воды скважины 121 Калужского ПХГ (рис. S2, дополнительные материалы). В исследованных сообществах выявлены археи цикла азота – *Candidatus Nitrosopumilus*, метаногены родов *Methanospaera*, *Methanolobus* и *Methanobrevibacter*, а также некультивируемые археи *Woesearchaeales* и *Thermoplasmatota*.

Перечень 25 родов, наиболее представленных в микробных сообществах хотя бы одного из об-

разцов из ПХГ, приведен на рис. 3. В пластовой воде из Щелковского и Касимовского ПХГ преобладали метилотрофные бактерии родов *Methylococcus* и *Methylobacterium*–*Methylorubrum*, использующие метан и/или метанол и метилированные амины в аэробных условиях в присутствии молекулярного кислорода. Кроме того, в исследованных сообществах присутствовали анаэробные бактерии рода *Bacteroides*, способные сбраживать сахаросодержащие субстраты. Эти бактерии встречаются в метаногенных реакторах, перерабатывающих растительные остатки, в озерных и речных осадках, загрязненных хлорсодержащими органическими отходами, муниципальных сточных водах (Ho et al., 2020; Hou et al., 2020; Zerva et al., 2021). В пробе из Калужского ПХГ (Kal-121) преобладали бактерии рода *Marinobacter*, растущие при повышенной солености среды на широком ряде органических субстратов. В составе малочисленного архейного сообщества в этой пробе были обнаружены метаногены родов *Methanospaera*, *Methanolobus* и *Methanobrevibacter*. Метаногены рода *Methanospaera* облигатно нуждаются для роста в метаноле, который они восстанавливают молекулярным водородом

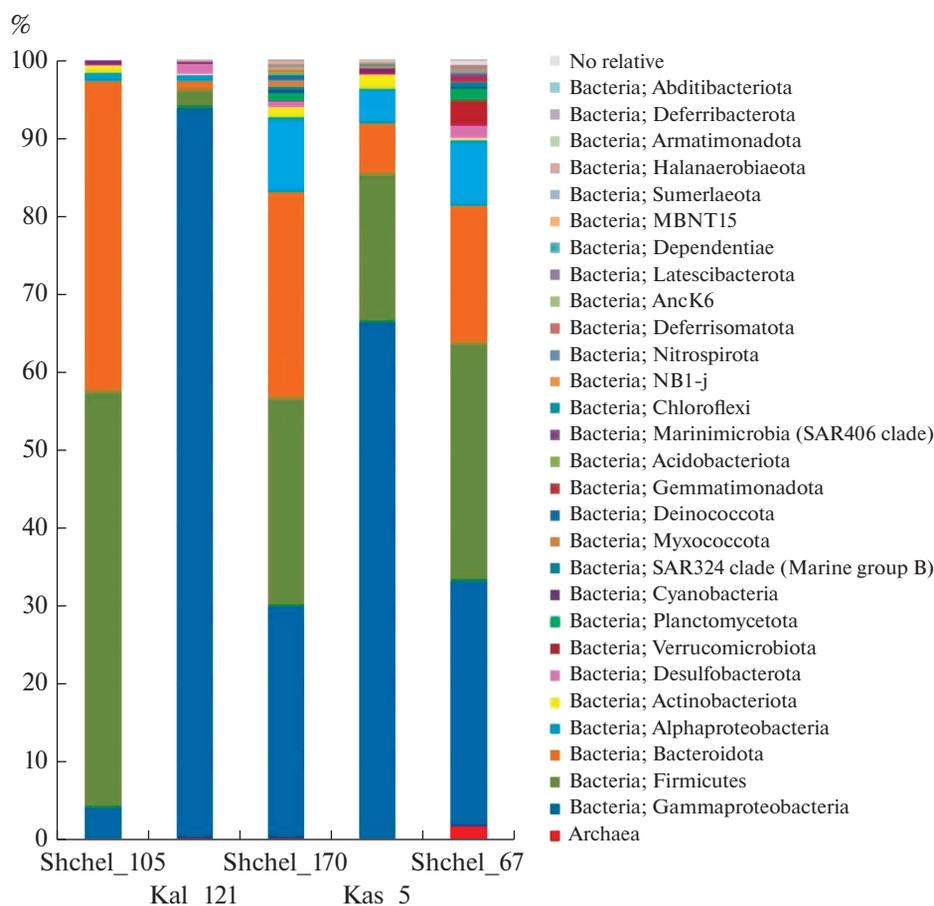


Рис. 2. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria*, представленных на уровне филумов/классов в библиотеках из пластовой воды. Перечислены таксоны, составляющие >1% в каждой библиотеке.

(Miller, Wolin, 1985). Метаногены рода *Methanobrevibacter* растут на метаноле и часто встречаются в подземных экосистемах, включая месторождения газа и угольные пласты (Moser et al., 2005; Mochimaru et al., 2009; Doerfert et al., 2009). Метаногены рода *Methanobrevibacter* используют для роста водород-углекислотную смесь. Обнаружение бактерий кишечной группы рода *Faecalibacterium* в пробах пластовой воды из Щелковского ПХГ может быть обусловлено захоронением промстоков в щигровский горизонт.

Потенциальные функциональные характеристики микробных сообществ пластовой воды из ПХГ. Функциональные характеристики исследуемых микробных сообществ пластовой воды из ПХГ были предсказаны с помощью модуля “Global Mapper” программы iVikodak на основании использования базы данных KEGG (Nagpal et al., 2019). Бактерии, входящие в эти сообщества, обладали потенциальной способностью осуществлять основные пути метаболизма углеводородов и энергетического метаболизма, а также деградацию ксенобиотиков, бензоата, полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), аминокислот,

толуола и хлорсодержащих органических соединений (рис. 4).

У бактерий, входящих в исследуемые сообщества, было предсказано наличие ферментов метаболизма метана (рис. S3а, S4), включающего ферменты двух путей метаногенеза. Ферменты первого пути, метанол кобаламин метилтрансфераза (EC: 2.1.1.90) и метил-коэнзим М редуктаза (EC: 2.8.4.1), катаболизирующие превращение метанола до метил-КоМ и метана соответственно, были наиболее представлены у метилотрофных метаногенных архей родов *Methanosphaera* и *Methanobrevibacter* (сообщество Kal-121). Ферменты второго пути метаногенеза, включающие метилтрансферазы (EC: 2.1.1.249; 2.1.1.250; 2.1.1.248), катаболизирующие превращение ди-, три- и метиламинов до метана через метил-КоМ, вероятно, принадлежат некультивируемым *Woesearchaeales* (Shchel_67). Эта группа некультивируемых архей встречается также в морских осадках с газогидратами метана (Carriger et al., 2020). Кроме того, предсказаны ферменты аэробного окисления метана и C₁-соединений и его окисленных или замещенных производных, не имеющих C–C связи (около

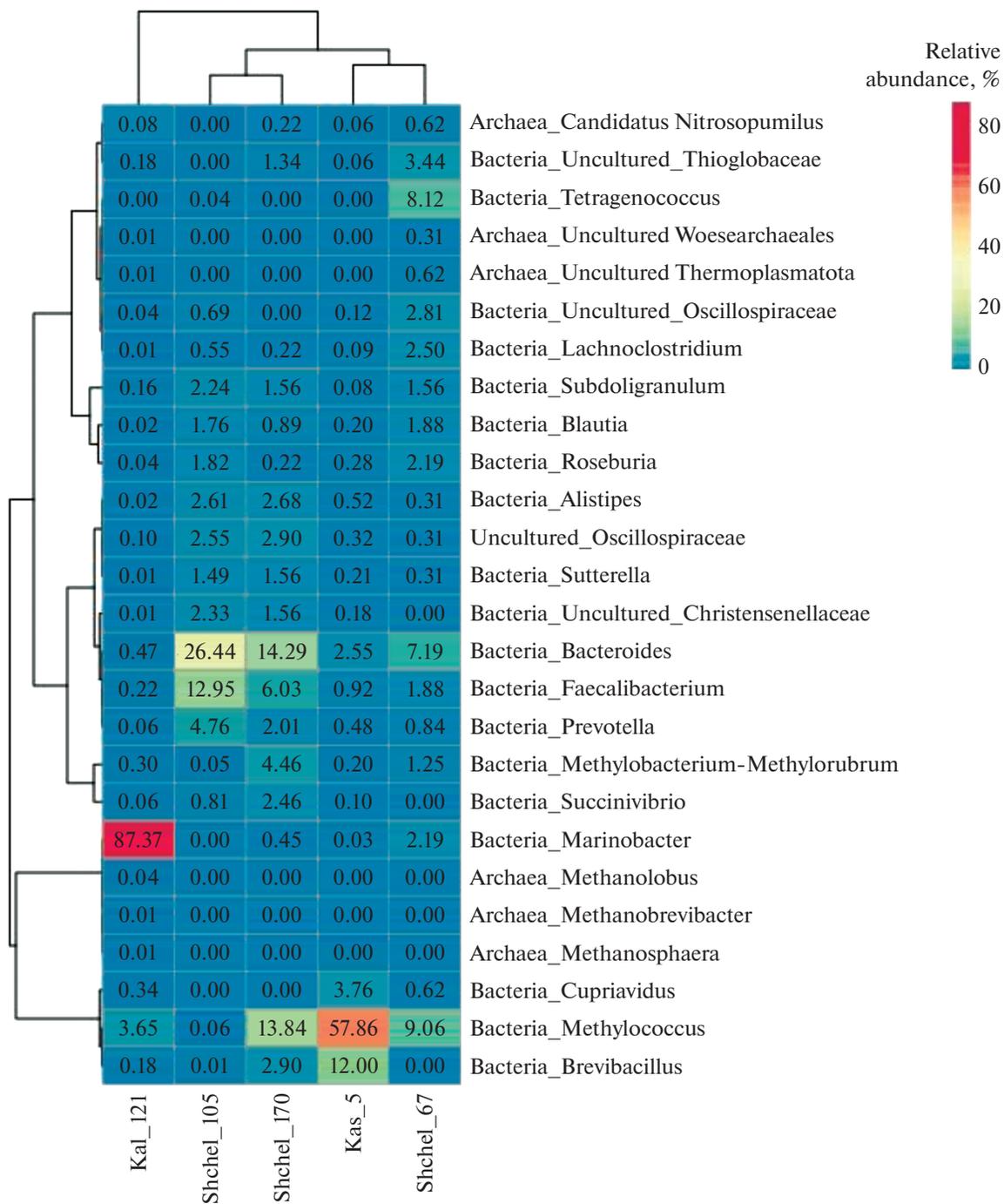


Рис. 3. Тепловая карта (heatmap) распределения 25 доминантных родов в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК прокариотных сообществ пластовой воды из ПХГ. Двойная иерархическая дендрограмма показывает распределение микроорганизмов в этих пробах. Относительные величины содержания отдельных родов от синего до красного цвета обозначают переход от менее представленного к более представленному роду в библиотеке. Цифры на диаграмме обозначают процент от общего количества последовательностей в библиотеке из каждой исследованной пробы жидкости.

50 соединений). В этих процессах метан окисляется до метанола с помощью ключевых ферментов метанотрофии — метанмонооксигеназы (ЕС: 1.14.13.25) и метан/аммоний монооксигеназы (ЕС: 1.14.18.3), а затем с помощью метанолдегидроге-

назы (ЕС: 1.1.2.7) окисляется до формальдегида. В пластовой воде Касимовского ПХГ (Kas-5) и Щелковского ПХГ присутствовали метилотрофные бактерии родов *Methylococcus* и *Methylobacterium-Methylorubrum*, обладающие ферментами деграда-

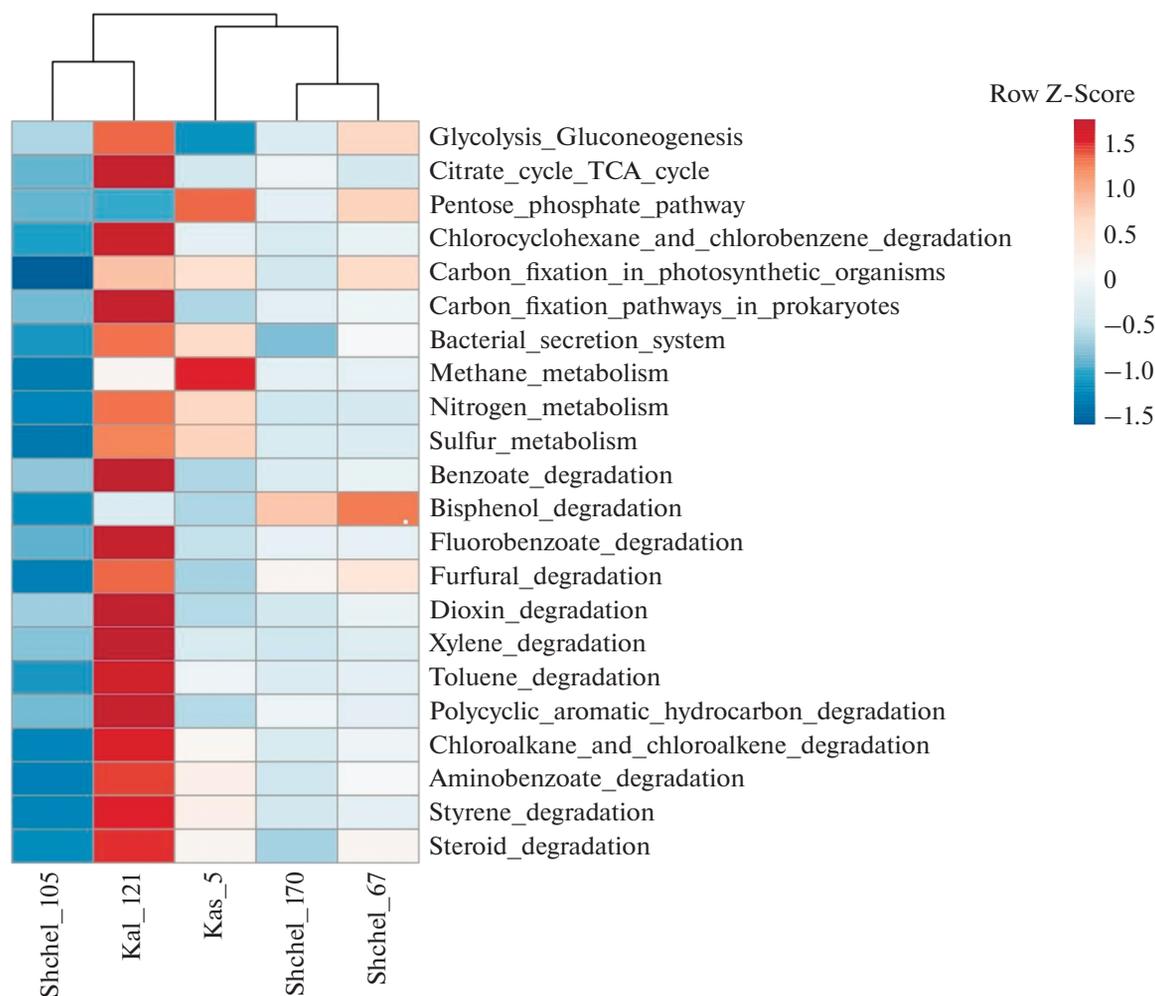


Рис. 4. Тепловая карта, показывающая сравнение функциональных профилей бактериальных сообществ пластовой воды (в относительных процентах) в программе iVikodak. Анализируемые ниже метаболические пути отмечены рамкой.

ции триметиламина, диметиламина и метиламина до формальдегида (рис. S5, дополнительные материалы).

Во всех исследованных сообществах присутствовали бактерии, обладающие двумя ключевыми ферментами пути аэробной деградации бензоата (“Benzoate degradation I”), бензоат-1,2-диоксигеназой (ЕС: 1.14.12.10) и дигидрооксициклогексадиен дегидрогеназой (ЕС: 1.3.1.25), катаболизирующими образование катехола из бензоата (рис. S3г, S6, дополнительные материалы). Предсказано также наличие бактерий, имеющих ферменты катаболизма катехола, как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА. Кроме того, у бактерий присутствовал фермент бензоат-КоА-лигаза (ЕС: 6.2.1.25), катализирующий превращение бензоата в бензил-КоА — интермедиат биodeградации многих ароматических соединений, и большинство ферментов другого пути деградации бензоата (“Benzoate degradation II”), преимущественно ис-

пользуемого анаэробными бактериями. Представленность ферментов этого пути была наиболее высокой у бактерий сообщества Kal-121, в котором за деградацию бензоата отвечали бактерии рода *Marinobacter* (рис. S7, дополнительные материалы). Ряд видов этого рода являются деструкторами алифатических и полициклических ароматических углеводородов, а также ациклических изопреноидных соединений (Duran, 2010). В сообществе Kas-5 потенциальными деструкторами бензоата были бактерии рода *Cupriavidus*, известные способностью к деградации многих алифатических соединений (Pérez-Pantoja et al., 2008), а также бактерии рода *Brevibacillus*.

В исследуемых микробных сообществах присутствовали бактерии, имеющие ферменты катаболизма серы, включающие сульфат аденилилтрансферазу (ЕС: 2.7.7.4), катализирующую восстановление сульфата до аденилилсульфата в процессах сульфатредукции, а также ферментов,

участвующих в дальнейшем восстановлении аденилсульфата до сульфита в ассимиляционной и диссимиляционной сульфатредукции (рис. S3в, S8, дополнительные материалы). Аденозилсульфаткиназа (ЕС: 2.7.1.25) и фосфоаденозин фосфосульфатредуктаза (ЕС: 1.8.4.8), восстанавливающие сульфит до сульфида в ассимиляционном процессе, были наиболее представлены у бактерий рода *Marinobacter*, доминирующих в сообществе Kal-121 (рис. S9, дополнительные материалы). За диссимиляционное восстановление сульфата в пластовых водах, вероятно, отвечала немногочисленная популяция сульфатредуцирующих бактерий родов *Desulfotignum*, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* и *Desulfobulbus*, содержащих аденилсульфатредуктазу (ЕС: 1.8.99.2).

На рис. S10–S15 (дополнительные материалы) приведены ключевые микроорганизмы, участвующие в метаболизме азота, бисфенола и ПАУ в пробах пластовой воды. Несмотря на отсутствие нитрата в пластовых водах ПХГ, была предсказана потенциальная способность бактериальных сообществ к осуществлению превращений азота (рис. S3б, S10). Во всех сообществах присутствовали бактерии, обладающие ферментом нитратредуктазой (ЕС: 1.7.5.1), который катализирует восстановление нитрата до нитрита в процессах денитрификации и диссимиляционной нитратредукции. Нитратредуктаза и остальные ферменты обоих процессов, катализирующие восстановление нитрита до молекулярного азота и аммония, были наиболее представлены у бактерий сообщества Kal-121. Выявлены бактерии, содержащие ферредоксин-нитратредуктазу (ЕС: 1.7.7.2), катализирующую восстановление нитрата до нитрита в процессе ассимиляционной нитратредукции, а также бактерии, обладающие ферредоксин-нитритредуктазой (ЕС: 1.7.7.1), восстанавливающей нитрит до аммония. Ферменты этого пути были наиболее характерны для бактерий сообществ Kas-5, Shchel-67, Shchel-105 и Shchel-170. В сообществе Kal-121 в преобразованиях азота участвовали в основном бактерии рода *Marinobacter* (рис. S11), среди которых известны виды, осуществляющие диссимиляционную нитратредукцию (Sogaia et al., 2008). В сообществе Kas-5 таким компонентом были бактерии рода *Methylococcus*, для которых известно участие в процессах нитрификации, ключевой фермент которой метан/аммоний монооксигеназа (ЕС: 1.14.99.39) был наиболее представлен у бактерий сообщества (рис. S3а). По-видимому, денитрификацию в этом сообществе способны осуществлять минорные компоненты. В пластовой воде из Щелковского ПХГ основной вклад в преобразования азота вносили бактерии родов *Methylococcus* и *Marinobacter*.

Таким образом, в результате биоинформатического анализа полученных библиотек генов 16S рРНК предсказана возможная функциональная

активность бактерий родов *Methylococcus*, *Methylobacterium* и *Bacteroides* в пробах пластовой воды Щелковского и Касимовского ПХГ и бактерий рода *Marinobacter* в пластовой воде Калужского ПХГ.

Уксусная кислота, другие летучие кислоты и метанол, обнаруженные в пластовых водах ПХГ, и газы (CH_4 , CO_2 , H_2), вероятно, служат субстратами для факультативно-аэробных и анаэробных микроорганизмов в подземных горизонтах.

Несмотря на присутствие молекулярного водорода в газовой фазе только Щелковского ПХГ (табл. S1), в составе сообществ выявлены метаногенные археи и бактерии, потенциально способные участвовать в потреблении молекулярного водорода, в том числе, родов *Bacteroides*, *Desulfotignum*, *Desulfomicrobium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Marinobacter*, *Subdoligranulum* и семейств *Lachnospiraceae*, *Thioglobaceae* и *Oscillospiraceae*. Сообщалось об использовании H_2 в качестве источника энергии также штаммом *Methylocystis* sp. SC2 (Nakobyan et al., 2020). Продуцировать H_2 может широкий ряд анаэробных микроорганизмов в процессе брожения органических субстратов. Показано образование H_2 при дефиците кислорода аэробными метилотрофными бактериями *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z (Kalyuzhnaya et al., 2013), *Methylocystis* sp. (Jung et al., 2020) и *Methylomonas* sp. DH-1 (Jo et al., 2020).

Молекулярными методами в пробах пластовых вод обнаружены факультативно-анаэробные и строго анаэробные микроорганизмы, способные использовать метанол. В анаэробных условиях использовать метанол могут метаногенные археи родов *Methanosphaera* и *Methanolobus*, обнаруженные в пластовой воде из скв. 121 Калужского ПХГ. Сульфатредуцирующие бактерии, утилизирующие метанол, были родственны *Desulfovibrio*. В группе аэробных бактерий использовать метанол способны метилотрофные бактерии родов *Methylococcus* и *Methylobacterium*.

Сероводород, поступающий из ПХГ в период отбора газа, может быть внесен при закачке газа из магистрального газопровода или образовываться в пласте бактериями (Dorffel et al., 2021). Поступление метанола и/или молекулярного водорода в подземные горизонты, содержащие сульфат в пластовой воде или вмещающих породах, может способствовать росту сульфатредуцирующих бактерий.

В пластовой воде подземных хранилищ газа нами обнаружено малочисленное, но разнообразное микробное сообщество. Особенностью экосистемы ПХГ является отсутствие кислородсодержащих флюидов. Трансформация доступного микроорганизмам органического вещества происходит в условиях строгого анаэробнозиса. При наличии сульфата и бикарбоната в пластовой воде

поступление водорода в ПХГ может приводить к активации процессов восстановления сульфата, образования метана и ацетата подземным микробным сообществом, сопровождающихся снижением качества газа, изменением минералогии и проницаемости пород, коррозией стального оборудования. В этой связи необходимы дальнейшие исследования ключевых субстратов и путей их метаболизма и функциональной активности микробных сообществ водоносных горизонтов, используемых для подземного хранения газа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Микробиологические исследования водоносных горизонтов подземных хранилищ газа проводили в рамках темы “Научное обоснование оптимальных условий подземного хранения водорода совместно с метаном” (№ АААА-А19-119101690016-9). Биоинформатический анализ микробных сообществ выполняли при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барсук Н.Е., Хайдина М.П., Хан С.А. “Зеленый” газ в газотранспортной системе Европы // Газовая промышленность. 2018. № 10. С. 104–109.
- Биджиева С.Х., Соколова Д.Ш., Турова Т.П., Назина Т.Н. Бактерии рода *Sphaerochaeta* из низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 649–658.
- Bidzhiyeva S.Kh., Sokolova D.Sh., Tourova T.P., Nazina T.N. Bacteria of the genus *Sphaerochaeta* from low-temperature heavy-oil reservoirs (Russia) // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 757–765.
- Иванова А.Е., Борзенков И.А., Тарасов А.Л., Милехина Е.И., Беляев С.С. Микробиологические исследования на объектах подземного газового хранилища в процессе закачки газа // Микробиология. 2007а. Т. 76. С. 515–523.
- Ivanova A.E., Borzenkov I.A., Tarasov A.L., Milekhina E.I., Belyaev S.S. A microbiological study of an underground gas storage in the process of gas extraction // Microbiology (Moscow). 2007a. V. 76. P. 524–532.
- Иванова А.Е., Борзенков И.А., Тарасов А.Л., Милехина Е.И., Беляев С.С. Микробиологические исследования на объектах подземного газового хранилища в процессе отбора газа // Микробиология. 2007б. Т. 76. С. 524–532.
- Ivanova, A.E., Borzenkov I.A., Tarasov A.L., Milekhina E.I., Belyaev S.S. A microbiological study of an underground gas storage in the process of gas extraction // Microbiology (Moscow). 2007b. V. 76. P. 524–532.
- Тарасов А.Л., Борзенков И.А., Черных Н.А., Беляев С.С. Выделение и изучение анаэробных микроорганизмов, участвующих в трансформации метанола в подземном хранилище газа // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 184–191.
- Tarasov A.L., Borzenkov I.A., Chernykh N.A., Belyaev S.S. Isolation and investigation of anaerobic microorganisms involved in methanol transformation in an underground gas storage facility // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 172–179.
- Тарасов А.Л., Борзенков И.А., Беляев С.С. Исследование трофических связей анаэробных микроорганизмов из подземного хранилища газа в процессе утилизации метанола // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 192–199.
- Tarasov A.L., Borzenkov I.A., Belyaev S.S. Investigation of the trophic relations between anaerobic microorganisms from an underground gas repository during methanol utilization // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 180–187.
- Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тощаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655–664.
- Merkel A.Yu., Tarnovetskii I.Yu., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.
- Basso O., Lascourreges J.F., Le Borgne F., Le Goff C., Magot M. Characterization by culture and molecular analysis of the microbial diversity of a deep subsurface gas storage aquifer // Res. Microbiol. 2009. V. 160. P. 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.10.010>
- Belyaev S.S., Borzenkov I.A. Microbial transformation of low-molecular-weight carbon compounds in the deep subsurface // Biogeochemistry of Global Change. N.Y.–London: Chapman & Hall, 1993. P. 825–838.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernykh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu.P., Perov A.N., Mirzabekov A.D., Hippe H., Stackebrandt E., L’Haridon S., Jeanthon C. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 6143–6151. <https://doi.org/10.1128/aem.69.10.6143-6151.2003>
- Carrier V., Svenning M.M., Gründger F., Niemann H., Desandier P.-A., Panieri G., Kalenitchenko D. The impact of methane on microbial communities at marine arctic gas hydrate bearing sediment // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1932. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01932>
- Correia C., Besson S., Brondino C.D., Gonzalez P.J., Fauque G., Lampreia J., Moura I., Moura J.J.G. Biochemical and spectroscopic characterization of the membrane-bound nitrate reductase from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 617 // J. Biol. Inorg. Chem. 2008. V. 13. P. 1321–1333. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0416-1>
- Dopffel N., Jansen S., Gerritse J. Microbial side effects of underground hydrogen storage – Knowledge gaps, risks and opportunities for successful implementation // Int. J. Hydrogen Energy. 2021. V. 46. P. 8594–8606. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.12.058>

- Duran R. Marinobacter* // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. Timmis K.N. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. P. 1725–1735.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_122
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar R.C.* UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nature Methods*. 2013. V. 10. P. 996–998.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B.* An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // *Protoc. Exch.* 2016
<https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
- 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>
- Hakobyan A., Zhu J., Glatter T., Paczia N., Liesack W.* Hydrogen utilization by *Methylocystis* sp. strain SC2 expands the known metabolic versatility of type IIa methanotrophs // *Metab. Eng.* 2020. V. 61. P. 181–196.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.05.003>
- Ho J.Y., Jong M.C., Acharya K., Liew S.S.X., Smith D.R., Noor Z.Z., Goodson M.L., Werner D., Graham D.W., Eswaran J.* Multidrug-resistant bacteria and microbial communities in a river estuary with fragmented suburban waste management // *J. Hazard Mater.* 2021. V. 405. Art. 124687.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124687>
- Hou R., Gan L., Guan F., Wang Y., Li J., Zhou S., Yuan Y.* Bioelectrochemically enhanced degradation of bisphenol S: mechanistic insights from stable isotope-assisted investigations // *iScience*. 2020. V. 24. Art. 102014.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.102014>
- Hugerth L.W., Muller E.E.L., Hu Y.O.O., Lebrun L.A.M., Roume H., Lundin D., Wilmes P., Andersson A.F.* Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia // *PLoS One*. 2014. V. 9. Art. e95567.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095567>
- Jo S.Y., Na Rhie M., Jung S.M., Sohn Y.J., Yeon Y.J., Kim M.-S., Park C., Lee J., Park S.J., Na J.-G.* Hydrogen production from methane by *Methylomonas* sp. DH-1 under micro-aerobic conditions // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2020. V. 25. P. 71–77.
<https://doi.org/10.1007/s12257-019-0256-6>
- Jung G.-Y., Rhee S.-K., Han Y.-S., So-Jeong Kim S.J.* Genomic and physiological properties of a facultative methane-oxidizing bacterial strain of *Methylocystis* sp. from a wetland // *Microorganisms*. 2020. V. 8. Art. 1719.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111719>
- Kalyuzhnaya M.G., Yang S., Rozova O.N., Smalley N.E., Clubb J., Lamb A., Gowda G.A.N., Raftery D., Fu Y., Bringel F., Vuilleumier S., Beck D.A.C., Troitsenko Y.A., Khmelina V.N., Lidstrom M.E.* Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. Art. 2785.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3785>
- Magot M., Ollivier B., Patel B.K.C.* Microbiology of petroleum reservoirs // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2000. V. 77. P. 103–116.
<https://doi.org/10.1023/a:1002434330514>
- Metsalu T., Vilo J.* ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. P. W566–W570.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>
- Miller T.L., Wolin M.J.* *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen // *Arch. Microbiol.* 1985. V. 141. P. 116–122.
<https://doi.org/10.1007/BF00423270>
- Moser D.P., Gihring T.M., Brockman F.J., Fredrickson J.K., Balkwill D.L., Dollhopf M.E., Lollar B.S., Pratt L.M., Boice E., Southam G., Wanger G., Baker B.J., Pfiffner S.M., Lin L.-H., Onstott T.C.* *Desulfotomaculum* and *Methanobacterium* spp. dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 8773–8783.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8773-8783.2005>
- Mochimaru H., Tamaki H., Hanada S., Imachi H., Nakamura K., Sakata S., Kamagata Y.* *Methanolobus profundi* sp. nov., a methylophilic methanogen isolated from deep subsurface sediments in a natural gas field // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 714–718.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.001677-0>
- Doerfert S.N., Reichlen M., Iyer P., Wang M., Ferry J.G.* *Methanolobus zinderi* sp. nov., a methylophilic methanogen isolated from a deep subsurface coal seam // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 1064–1069.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.003772-0>
- Nagpal S., Haque M.M., Singh R., Mande S.S.* iVikodak – a platform and standard workflow for inferring, analyzing, comparing, and visualizing the functional potential of microbial communities // *Front. Microbiol.* 2019. V. 9. Art. 3336.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03336>
- Nazina T.N., Ivanova A.E., Borzenkov I.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V.* Occurrence and geochemical activity of microorganisms in high-temperature, water-flooded oil fields of Kazakhstan and Western Siberia // *Geomicrobiol. J.* 1995. V. 13. P. 181–192.
<https://doi.org/10.1080/01490459509378016>
- Nazina T.N., Shestakova N.M., Ivoilov V.S., Kostrukova N.K., Belyaev S.S., Ivanov M.V.* Radiotracer assay of microbial processes in petroleum reservoirs // *Adv. Biotech. Micro.* 2017. V. 2. Art. 555591. <https://juniperpublishers.com/aibm/pdf/AIBM.MS.ID.555591.pdf>
- Pedersen K., Bengtsson A.F., Edlund J.S., Eriksson L.C.* Sulphate-controlled diversity of subterranean microbial communities over depth in deep groundwater with opposing gradients of sulphate and methane // *Geomicrobiol. J.* 2014. V. 31. P. 617–631.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2013.879508>
- Pérez-Pantoja D., De la Iglesia R., Pieper D.H., González B.* Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134 // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. P. 736–794.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x>
- Postgate J.R.* The Sulfate-Reducing Bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1984.
- Šmigáň P., Greksák M., Kozánková J., Buzek F., Onderka V., Wolf I.* Methanogenic bacteria as a key factor involved in changes of town gas stored in an underground reservoir //

FEMS Microbiol. Lett. 1990. V. 73. P. 221–224.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb03944.x>
 Widdel F., Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria // The Prokaryotes / Ed. Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-Z. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. Ch. 183. P. 3352–3337.

Zerva I., Remmas N., Kagalou I., Melidis P., Ariantsi M., Sylaios G., Ntougias S. Effect of chlorination on microbiological quality of effluent of a full-scale wastewater treatment plant // Life (Basel). 2021. V. 11. Art. 68.
<https://doi.org/10.3390/life11010068>

Diversity and Possible Activity of Microorganisms in Underground Gas Storage Aquifers

T. N. Nazina^{1,*}, L. A. Abukova², T. P. Tourova¹, T. L. Babich¹, S. Kh. Bidzhieva¹,
 D. S. Filippova², and E. A. Safarova²

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

²Oil and Gas Research Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia

*e-mail: nazina@inmi.ru

Received May 9, 2021; revised May 14, 2021; accepted May 17, 2021

Abstract—Underground natural gas storage facilities (UGS) have been recently proposed as sites to store “green” gas containing biogas, synthetic methane, and molecular hydrogen. The composition of the UGS microbial communities and the effect of H₂ on these communities are poorly understood. This work deals with determination of microbial diversity in the samples of reservoir water from the underground horizons of the Shchelkovo, Kasimov, and Kaluga UGS. Groundwater is an anaerobic habitat containing acetic and other lower fatty acids, methanol, and dissolved gases that may serve as substrates for microorganisms. Low abundance of cultivated aerobic organotrophic bacteria and anaerobic fermenting, sulfate-reducing, and methanogenic microorganisms in the studied samples was shown. High-throughput sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene revealed the presence of *Firmicutes* (2.4–53.6%), *Bacteroidetes* (1.0–39.7%), *Alphaproteobacteria* (0.9–9.6%), *Actinobacteria* (0.1–1.7%), *Desulfobacteria* (0.1–1.6%), *Verrucomicrobia* (0–3.4%), and *Planctomycetes* (0–1.3%) in the studied microbial communities. The share of archaeal sequences in the libraries did not exceed 1.5%. In the water sample from the Kaluga UGS, members of the genus *Marinobacter* predominated; methanogens of the genera *Methanosphaera*, *Methanolobus*, and *Methanobrevibacter* were found among the minor components. Methylotrophic bacteria of the genera *Methylococcus* and *Methylobacterium*–*Methylorubrum* and anaerobic fermenting bacteria of the genus *Bacteroides* predominated in the reservoir water from the Shchelkovo and Kasimov UGSs. Using the iVikodak program, the potential ability of microbial communities to use methane, methanol, benzoate, and polycyclic aromatic hydrocarbons, as well as to participate in the transformations of sulfur and nitrogen compounds, was shown. In the underground communities, bacteria and archaea were found, potentially capable of using H₂ in their energy metabolism, including the processes of sulfate reduction, methanogenesis and acetogenesis. These results indicate that microbiological and geochemical monitoring is required during the operation of UGS, especially during the injection of hydrogen.

Keywords: underground gas storage, bacteria, high-throughput sequencing, 16S rRNA gene, functional diversity, iVikodak, hydrogen

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ, ПРИУРОЧЕННЫХ
К МЕЛКОВОДНЫМ СИПАМ В ПОЙМЕ РЕКИ БОЛЬШАЯ РЕЧКА,
ЗАПАДНАЯ СИБИРЬ

© 2021 г. О. В. Данилова^{а,*}, А. А. Иванова^а, И. Е. Терентьева^б, М. В. Глаголев^с, А. Ф. Сабреков^б

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

^бИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, 119991 Россия

*e-mail: olga.v.danilova10@gmail.com

Поступила в редакцию 27.04.2021 г.

После доработки 23.05.2021 г.

Принята к публикации 26.05.2021 г.

Одним из потенциально значимых и неучтенных источников метана в природе являются недавно открытые поля сипов, широко распространенные в средней тайге Западной Сибири. Локализованные исключительно в поймах небольших рек и ручьев, сипы обнаруживают значительную гетерогенность по форме и размерам, локализации в пространстве, а удельный поток метана из них может достигать высоких значений, делая эти природные формирования значимым региональным источником. Информация о составе микроорганизмов, приуроченных к сипам, остается фрагментарной и затрагивает лишь метанотрофные бактерии. В настоящей работе впервые проведена оценка общего разнообразия бактериального сообщества в осадках мелководных сипов, расположенных в пойме реки Большая Речка, с помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК. Молекулярный анализ состава сообщества показал доминирование представителей *Gammaproteobacteria* и *Actinobacteria* (соответственно, 28.5–33.8 и 11–13.2% полученных фрагментов гена 16S рРНК). Значительная доля последовательностей была представлена филами *Chloroflexi*, *Desulfobacterota* и *Bacteroidota*. Представители *Acidobacteriota* и *Verrucomicrobiota* выявлены в количестве 1.5–2.7 и 1–1.9% соответственно. В метанотрофном сообществе преобладали бактерии рода *Methylobacter*. Наиболее многочисленная (8% от всех полученных фрагментов гена 16S рРНК) операционная единица видового уровня была представлена *Methylobacter tundripaludum*. Последовательности метанотрофных *Alphaproteobacteria* в сипах выявлены не были. Полученные результаты указывают на существование в осадках мелководных сипов смешанного микробного сообщества, ведущая роль в котором принадлежит метанотрофам *Gammaproteobacteria*.

Ключевые слова: субарктические пресноводные экосистемы, метановые сипы, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК, психрофильные метанотрофные бактерии, *Methylobacter tundripaludum*

DOI: 10.31857/S0026365621050049

Метан (CH₄) – ключевой парниковый газ для атмосферы Земли. Общее радиационное воздействие (форсинг) метана составляет треть от форсинга всех долгоживущих парниковых газов, что делает его третьим по важности парниковым газом после воды и углекислого газа (Ciais et al., 2013). Поскольку концентрация метана в воздухе, измеренная за индустриальный период развития человечества, имеет тенденцию к увеличению (с ~0.8 ppm до современных ~1.8 ppm), а общий дисбаланс между источниками и стоками метана за последние десятилетия оценивается в ±25 Тг CH₄ в год (Bousquet et al., 2006; Ciais et al., 2013), то каждый значимый, даже на региональном мас-

штабе, источник привлекает внимание исследователей (Fletcher, Schaefer, 2019). К таким потенциально новым и неучтенным источникам относятся сипы – локализованные выходы метана, обнаруженные в начале 2000-х годов в поймах рек и ручьев средней тайги Западной Сибири. Несмотря на прошедшие десятилетия, эти природные объекты все еще остаются крайне слабо изученными. Предварительные расчеты показали, что удельный поток метана из сипов может достигать достаточно высоких значений (Белова и соавт., 2013; Oshkin et al., 2014; Sabrekov et al., 2020), а его происхождение до сих пор не установлено. Имеющиеся данные позволяют с высокой степенью ве-

роятности утверждать, что метан, выделяющийся через сипы, генерируется в верховых болотах, почти полностью покрывающих водоразделы в регионе исследований (Terentieva et al., 2016), и транспортируется горизонтально в поймы рек с помощью грунтовых вод (Sabrekov et al., 2020). Сипы, найденные в средней тайге Западной Сибири, сосредоточены исключительно в поймах рек; они отсутствуют на покрытых болотами водоразделах, облесенных склонах и в озерах, и представляют собой плоские не покрытые растительностью участки насыщенного водой грунта с многочисленными отверстиями, воронками, кратерами, из которых выходят на поверхность грунтовые воды. Размер сипов колеблется от одиночных “луж” площадью несколько квадратных метров до вытянутых вдоль русла цепей полей сипов площадью до 10000 м² каждое. При этом газ и вода, выделяющиеся из сипов, не содержат кислород (Sabrekov et al., 2020).

Несмотря на уникальность экосистемы, данные о составе сообществ микроорганизмов, обитающих в местах локальных выходов метана в сипах, остаются фрагментарными. Известно лишь несколько работ, посвященных оценке разнообразия метанотрофного сообщества (Белова и соавт., 2013; Oshkin et al., 2014). В данных работах исследовали крупные одиночные сипы-воронки, представляющие собой выпуклые участки насыщенного водой грунта, формирующие ярко выраженные кратерные структуры, высотой 10–20 см. Было показано доминирование в данных сипах метанотрофов *Gamma*proteobacteria, среди которых значительную долю занимали психрофильные представители рода *Methylobacter*. Работ же по общему микробному разнообразию сообществ, населяющих сипы-воронки, до настоящего времени сделано не было.

В настоящей работе впервые исследованы мелководные сипы, представляющие собой слегка вогнутые участки грунта, для которых глубина затопления не превышает нескольких сантиметров. Мелководные сипы формируют обширные поля по всей исследуемой территории и представляют собой стабильные природные объекты, вследствие чего были выбраны нами для оценки общего микробного разнообразия.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследований. Исследования и отбор проб проводили в сентябре 2019 г. в пойме реки Большая Речка (60.945° с.ш., 68.341° в.д.) (рис. 1) в зоне средней тайги Западной Сибири со среднегодовой температурой воздуха –0.5°C и среднегодовым количеством осадков 550 мм. Климат региона – континентальный субарктический с жарким летом (среднемесячная температура воздуха в июле 17°C) и очень холодной зимой (средне-

сячная температура воздуха в январе –20°C) (meteoinfo.ru). На данном участке представлено типичное поле мелководных сипов, расположенное в 30 м от русла реки. В качестве объектов исследования было выбрано три мелководных сипа на расстоянии около 10 м друг от друга. Окружающая пойменная растительность представлена монодоминантными сообществами осоки водяной (*Carex aquatilis* Wahlenb.) на пониженных и затопленных участках и канареечника (*Phalaris arundinacea* L.) на повышенных участках. На склонах террас и водоразделов произрастают березово-осиновые леса, сменяющиеся на террасах зональными таежными сообществами.

Измерение концентрации растворенного метана в воде, выделяющейся из сипов. Концентрацию растворенного в воде метана оценивали с помощью метода равновесия (Hope et al., 1995). Пробы воды в трех повторностях для каждого сипа объемом 5 мл отбирали в пластиковый шприц, после чего в этот же шприц добавляли 15 мл атмосферного воздуха и закрывали носик резиновой пробкой. Полученную смесь энергично встряхивали в течение трех минут, воду сливали, а оставшуюся пробу газа транспортировали в лабораторию. Концентрацию метана в пробе газа измеряли с помощью инфракрасного газоанализатора Gas Scouter G4302 (“Picarro”, США) в течение 72 ч после отбора.

Отбор образцов для анализа. Отбор проб грунта осуществляли с поверхности насыщенного водой ила по краю воронки по одной пробе для каждого сипа. Пробы грунта отбирали в пластиковые сосуды Falcon объемом 15 мл, герметично закрывали крышкой и фиксировали пленкой Parafilm (“Pechiney Plastic Packaging”, США). До анализа грунт хранили при температуре –20°C.

Пробы воды для химического анализа отбирали в трех повторностях для каждого сипа с помощью пластиковых шприцев (50 мл) максимально близко к отверстию воронки, из которой текла вода. Отобранные пробы воды фильтровали в лаборатории через одноразовые фильтры-насадки из ацетилцеллюлозы (диаметр фильтра 28 мм, диаметр пор 0.2 мкм, “Corning”, США) и хранили при 4°C. Химический анализ проб воды проводился с помощью системы капиллярного электрофореза Капель-205 (“Люмэкс”, Россия).

Величины pH и удельной электропроводности поступающей из сипов воды измеряли в трех повторностях для каждого сипа в полевых условиях с помощью портативного прибора HANNA HI 98130 (“Hanna Instruments”, США). Температуру воды оценивали с помощью термодатчика Thermochron Ibutton (“Maxim Integrated”, США).

Оценка микробного разнообразия сообщества мелководных сипов с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. Для выделения тотальной ДНК из исследуемого осадка использовали

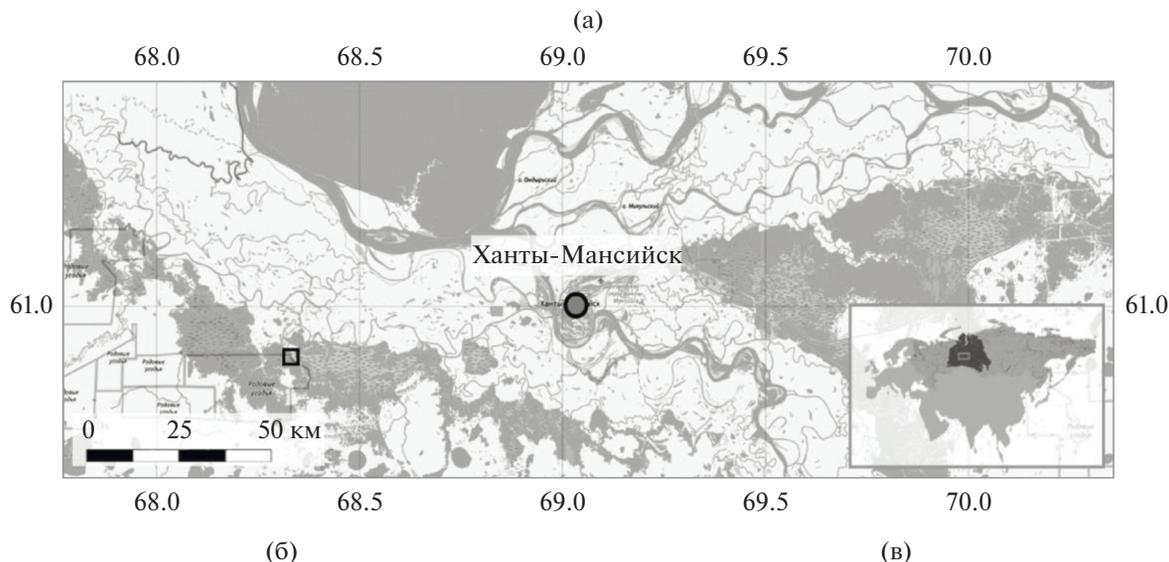


Рис. 1. (а) Локализация исследуемого участка на карте. Черная рамка указывает расположение места отбора образцов; (б) общий вид р. Большая Речка, ХМАО. На первом плане видно поле сипов; (в) общий вид сипов мелководного типа. Черные стрелки указывают места выхода метана на поверхность.

навеску ила весом 0.5 г. ДНК выделяли с использованием набора FastDNA SPIN kit for soil (“MP Bio-medicals”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Полученные образцы ДНК хранили до анализа при -20°C . Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК. Для получения ампликонов использовали прямой праймер (5'-CAAGCAGAAGACGGCAT-ACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTXXXXXZZZGTGBCAGCMC-CGCGGTA-3'), состоящий, соответственно, из “5' Illumina Linker Sequence”, “Index 1”, “Heterogeneity Spacer” (Fadrosh et al., 2014) и 515F праймерной последовательности (Hugerth et al., 2017) и обратный праймер (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATC-TACACTCTTCCCTACACGACGTCTTCCGAT-CTXXXXXZZZGACTACNVGGGTMTCTAATC-

C-3'), состоящий из “3' Illumina Linker Sequence”, “Index 2”, “Heterogeneity Spacer” и Pro-mod-805R праймерной последовательности соответственно (Меркель и соавт., 2019). Для каждого образца ДНК было приготовлено две библиотеки, секвенированные параллельно с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 (“Illumina”, США) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистическая обработка полученных данных. Полученные фрагменты последовательностей гена 16S рРНК анализировали с использованием программного обеспечения пакета QIIME 2 v.2018.11 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). Отбор нуклеотидных последовательностей, контроль их качества, удаление химерных последовательностей проводили с помощью плагина DADA2

Таблица 1. Физико-химическая характеристика воды, вытекающей из мелководных сипов

Концентрация растворенного метана, мг/л	8.3 ± 1.1
Концентрация растворенного кислорода (мг/л)	0.0
pH	7.1 ± 0.1
Удельная электропроводность, мкСм/см	473 ± 25
Концентрация SO ₄ ²⁻ , мг/л	7.5 ± 1.2
Концентрация HCO ₃ ²⁻ , мг/л	273 ± 27
Концентрация Ca ²⁺ , мг/л	66 ± 15
Концентрация растворенного Fe, мг/л	4.7 ± 1.2

(Callahan et al., 2016). Последовательности кластеризовали в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на видовом уровне идентичности (97% сходства) с помощью плагина VSEARCH (Rognes et al., 2016) и базы данных Silva v. 138 (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014). Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили по базе Silva v. 138 методом BLASTN. Оценку биоразнообразия осуществляли путем расчета индексов на базе программы QIIME 2. С помощью данной программы строили также тепловую карту вариабельности метанотрофов в мелководных сипах. Построение филогенетического дерева проводили с использованием программного пакета MEGA X (версия 10.2.2) (Kumar et al., 2018).

Полученные в результате секвенирования последовательности гена 16S рРНК депонированы в GenBank под номером PRJNA731098.

Оценку численности метанотрофов на основе копийности гена *pmoA* выполняли на термоциклере StepOnePlus™ Real-Time PCR System (“Thermo Fisher Scientific”, США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR Kit (“Евроген”, Россия) по методике, описанной в работе Kubista et al. (2006). Последовательности гена *pmoA* были получены с использованием праймерной системы A189f (GGNGACTGGGACTTCTGGG)–A650r (ACGTCCTTACCGAAGGT) (Holmes et al., 1995; Bourne et al., 2001) в соответствии со следующей программой: 94°C – 20 с, 62°C – 20 с, 72°C – 15 с в реакционной смеси общим объемом 50 мкл, содержащей праймеры в концентрации 0.5 мкМ. В качестве стандартов применяли растворы клонированных фрагментов гена *pmoA* чистой культуры *Methylococcus capsulatus*. Анализ проводили в трех повторностях для каждого образца. Коэффициент корреляции для стандартной кривой составлял 0.998.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика исследуемых метановых сипов и измерения концентрации метана. Полевые исследования в поймах реки Большая Речка, а

также близлежащих ручьях и старицах, выявили присутствие большого количества активных мелководных сипов (рис. 1а, 1б). Аналогичные поля сипов обнаружены также при исследовании ручьев близ деревни Шапша (61.087° с.ш., 69.481° в.д.), в районе одной из протоков реки Оби, и старицах реки Большой Салым, близ деревни Лемпино (60.968° с.ш., 71.234° в.д.). В целом, наличие мелководных сипов в той или иной степени характерно для всей 100 км территории вокруг г. Ханты-Мансийск.

В табл. 1 суммированы результаты измерений физико-химических характеристик воды, вытекающей из исследованных сипов в пойме реки Большая речка. Проведенный анализ показал, что в данных сипах вода слабоминерализованная (≤500 мг/л), с около-нейтральным значением pH. Среди ионов присутствует карбонат, кальций, в меньшей степени сульфат и железо. Концентрация метана в исследованных сипах была сходной (около 8 мг/л), а процесс выделения его был достаточно стабилен и слабо различался от сипа к сипу. Концентрация растворенного в воде кислорода была ниже предела обнаружения использованного прибора (0.1 мг/л). Таким образом, ввиду избытка метана и недостатка кислорода, доступность последнего может иметь влияние на интенсивность окисления метана и разнообразие бактериального сообщества в исследованных мелководных сипах.

Общее разнообразие микробного сообщества, населяющего зоны микросипования в мелководных сипах. В результате проведенного анализа было получено 44103 нуклеотидных последовательности размером, в среднем, 250 п.о. После процедуры контроля качества, выбраковки химер, удаления небактериальных и неархейных фрагментов, а также последовательностей размером менее 250 п.о., осталось 32605 ридов, из которых, в дальнейшем, было сформировано 741 ОТЕ со степенью сходства 97% (табл. 1). Индексы разнообразия Chao1 и Shannon варьировали в диапазонах 204–281 и 6.65–7.05 соответственно. Анализ

Таблица 2. Количество полученных и проанализированных фрагментов последовательностей гена 16S рРНК

Образцы	Номер	Исходные последовательности	Последовательности после процедуры фильтрации	%	Количество ОТЕ	Индексы разнообразия	
						Chao1	Shannon
S1	1	6672	6385	95.7	204	204	6.65
	2	8578	8381	97.7	278	281	7.05
S2	1	7054	6899	97.8	265	266	6.85
	2	6906	6731	97.5	236	236	6.73
S3	1	7770	7565	97.4	266	266	6.98
	2	7123	6869	96.4	248	248	7.03

полученных последовательностей показал, что компонентный состав бактериального сообщества варьировал между образцами незначительно. Лишь малая часть всех идентифицированных последовательностей (от 0.19 до 0.31%) принадлежала представителям группы *Archaea*. Она была представлена некультивируемыми археями *Woeserchaeales (Nanoarchaeota)* и *Methanosaeta (Halobacterota)*. Последовательности, относящиеся к археям группы ANME, осуществляющим процесс анаэробного окисления метана, в сипах обнаружены не были. Наиболее многочисленная группа полученных фрагментов гена 16S рРНК принадлежала представителям *Gammaproteobacteria* (от 28.5 до 33.7% всех прочтений) (рис. 2). Относящиеся к данному филуму представители *Methylococcales* и *Burkholderiales* представляли собой одни из наиболее многочисленных ОТЕ бактерий в данных сообществах (табл. 2). Доминировали в сипах метанотрофы рода *Methylobacter*, доля последовательностей которых составляла около 11% от общего количества полученных прочтений. Также, внутри группы *Methylococcales* значительная доля последовательностей принадлежала группе ОТЕ, идентифицированных как *Crenothrix polyspora*. Показано, что эта группа бактерий широко распространена в пресноводных экосистемах, предпочитая водоемы с застойной водой, где занимает микроаэрофильные зоны (Oswald et al., 2017). Из бактерий-неманотрофов вторую по численности группу занимают метилотрофы рода *Methylothera*, относящиеся к классу *Methylophilaceae* (табл. 2). Данные бактерии относятся к одной из наиболее часто встречающихся групп в консорциумах с метанотрофами (Kalyuzhnaia et al., 2008). Доля нуклеотидных последовательностей, принадлежащих представителям *Alphaproteobacteria*, составляла от 3.2 до 6% и была представлена целым рядом гетеротрофных организмов: *Hyphomicrobium*, *Polymorphobacter*, *Rhodospseudomonas*, *Bradyrhizobium*. Среди бактерий филума *Actinobacteriota*, представляющего собой вторую по численности группу в исследуемом со-

обществе (от 13.1 до 19% всех полученных последовательностей), значительную долю занимали некультивируемые представители таких малоизученных групп, как ОРВ41 и РеМ15, функции которых в бактериальном сообществе остаются невыясненными. Доля представителей филумов *Chloroflexi*, *Desulfobacterota* и *Bacteroidota*, широко распространенных в различных экосистемах, в полученном пуле данных составляла 9.9–12.1, 6.3–11.1 и 4.9–10.1% соответственно (рис. 2). Среди представителей филума *Muxococcota* существенную долю (около 75%) составляли бактерии рода *Anaeromyxobacter* – типичные обитатели разнообразных почв и пресноводных осадков (Sanford et al., 2012; Onley et al., 2017). Способность к анаэробному росту, с использованием широкого спектра неорганических и органических веществ, наряду с возможностью азотфиксации, позволяет данным бактериям доминировать в различных экосистемах. В исследуемом микробном сообществе осадков мелководных сипов доля бактерий рода *Anaeromyxobacter* достигала 3.3–4.9% от общего количества последовательностей 16S рРНК (табл. 2).

Филогенетическое разнообразие групп *Acidobacteriota* и *Verrucomicrobiota*. Анализ разнообразия представителей двух широко распространенных, но крайне малоизученных филумов *Acidobacteriota* и *Verrucomicrobiota* в исследованных сипах показал, что доля их в общем микробном разнообразии составляла 1.5–2.7 и 1.0–1.9% соответственно. Ацидобактерии являются одной из доминирующей групп бактерий в почвах, составляя до 20% всей ее микробиоты (Janssen, 2006). Они обнаружены в разнообразных почвах (Navarret et al., 2013), зонах ризосферы (da Rocha et al., 2013), морских местообитаниях, включая глубоководные осадки (Liao et al., 2011). Однако их экологическая функция в различных эконишах остается малоизученной (Kielak et al., 2016). Все культивируемые к настоящему моменту представители ацидобактерий являются гетеротрофами, способными использо-

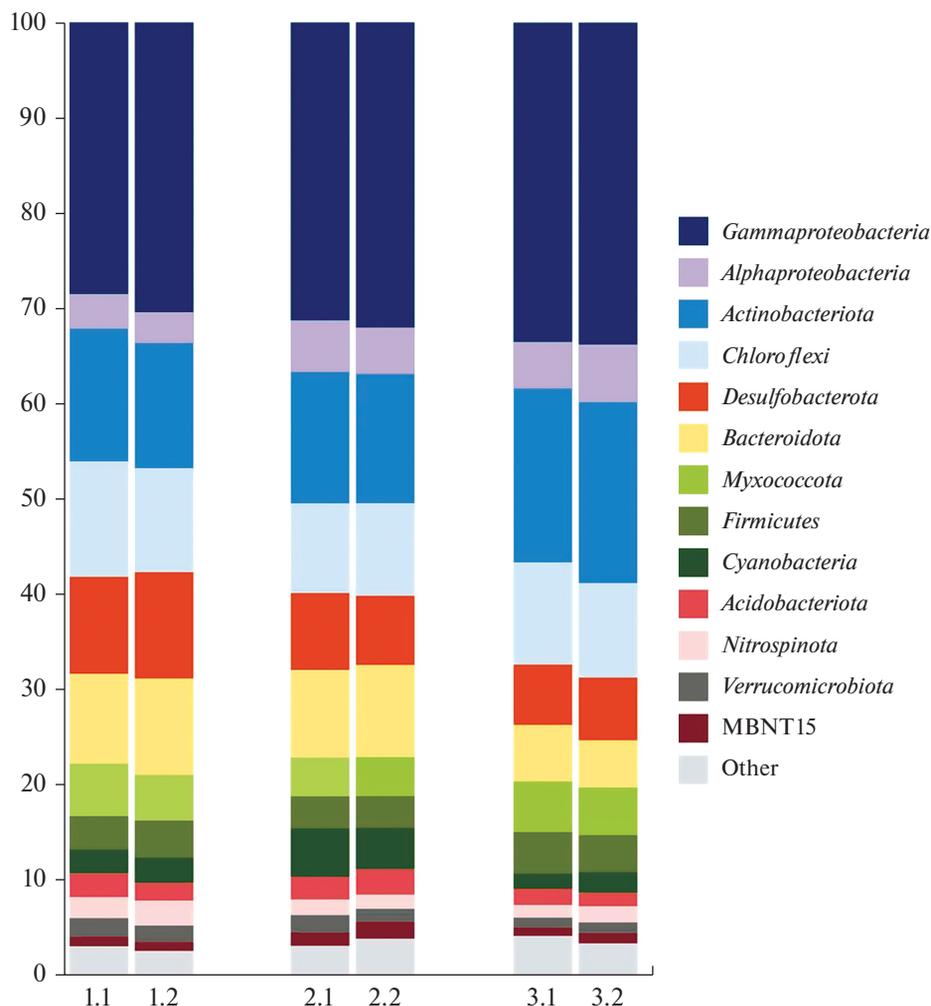


Рис. 2. Состав бактериального сообщества на основании разнообразия гена 16S рНК в природном образце ила, отобранном вблизи выхода метана в сипах мелководного типа.

вать широкий спектр органических веществ. В полученных библиотеках фрагментов гена 16S рНК самая многочисленная группа ацидобактериальных последовательностей (от 30 до 58%) принадлежала классу *Vicinamibacteria*, в котором относительно недавно было описано два культивируемых представителя (рис. 3а). (Huber et al., 2016; Vieira et al., 2017). К одному из них, роду *Luteitalea*, принадлежала часть выявленных последовательностей. Группа *Vicinamibacteria* является одной из наиболее распространенных классов ацидобактерий, представители которой предпочитают около нейтральные значения pH и способны к росту в психрофильных условиях. Другими численно значимыми группами ацидобактерий в исследованных сипах являлись подгруппы 7 и 10, а также филум *Aminicenantia*. Данные группы до настоящего момента не имеют культивируемых представителей, в связи с чем экологическая роль их неизвестна. Оставшуюся часть (около

20%) всех полученных из осадков мелководных сипов последовательностей гена 16S рНК ацидобактерий составляли представители классов *Thermoanaerobacula*, *Holophagae*, *Blastocatellia*, *Acidobacteriia*, ацидобактерии подгруппы 18. Описанные представители первых двух классов являются анаэробными термофилами, неспособными к росту ниже 25°C. Ацидобактерии *Blastocatellia* в большинстве своем описаны как аэробные гетеротрофы, способные к активному росту в близких к нейтральным значениям pH и психрофильных условиях (Pascual et al., 2015).

Доля последовательностей гена 16S рНК, принадлежащих бактериям филума *Verrucomicrobiota*, в полученной библиотеке составляла от 1 до 2% от общего количества фрагментов. Разнообразие их в осадках мелководных сипов было относительно невысоким и состояло из представителей нескольких порядков: *Verrucomicrobiales*, *Chthoniobacterales*, *Pedosphaerales* и *Opiritales* (рис. 3б). Более 70%

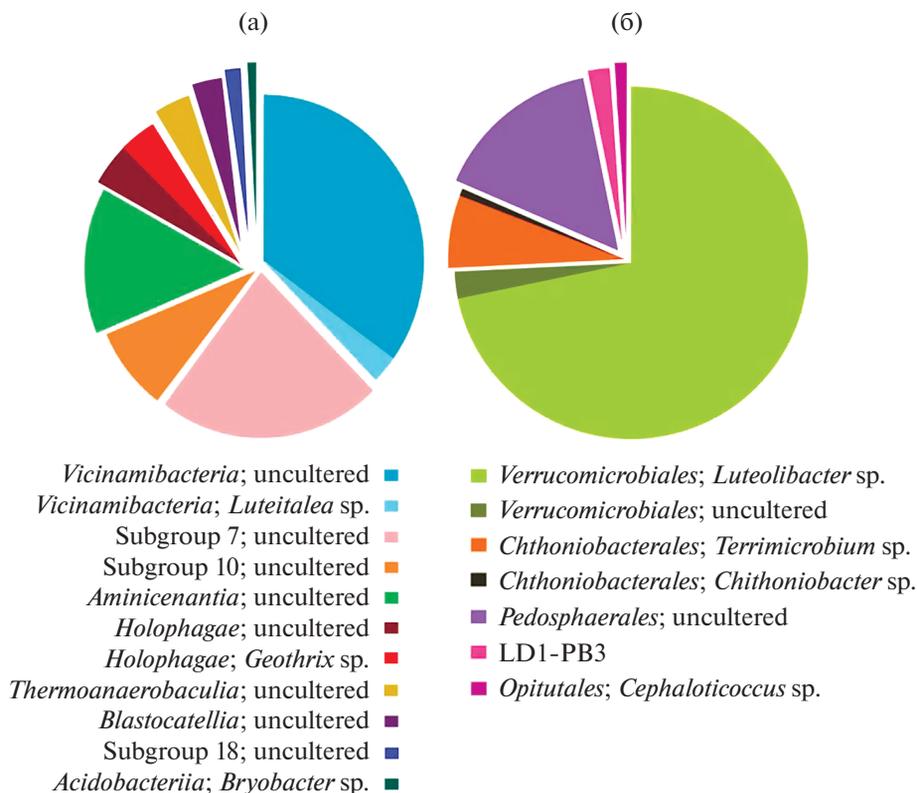


Рис. 3. Круговая диаграмма, отображающая разнообразие групп *Acidobacteria* (а) и *Verrucomicrobia* (б) в исследованных образцах осадков вблизи мелководных сипов на основании разнообразия гена 16S рРНК.

всех последовательностей гена 16S рРНК бактерий *Verrucomicrobia* показывали филогенетическую близость к роду *Luteolibacter*, принадлежащему классу *Verrucomicrobiae*. На настоящий момент этот род насчитывает восемь охарактеризованных видов, полученных из различных местообитаний (Yoon et al., 2008; Pascual et al., 2017). Бактерии рода *Luteolibacter* предпочитают нейтральные или слабощелочные условия среды, и, по меньшей мере, для вида *Luteolibacter arcticus* показан активный рост при 4°C (Kim et al., 2015). Способность использовать целый спектр органических субстратов позволяет данным бактериям эффективно заселять различные экосистемы, включая холодноводные сипы. Вторая по численности группа последовательностей *Verrucomicrobiota* (около 15%) была филогенетически родственна представителям некультивируемого порядка *Pedosphaerales*. Минорную часть последовательностей *Verrucomicrobiota* составляли представители родов *Terrimicrobium*, *Cephalotococcus* и *Chthoniobacter* (составляя, в среднем, 7, 2 и ≤1% соответственно). Показано, что они способны использовать простые сахара, предпочитая для роста нейтральные условия среды (Qiu et al., 2014; Lin et al., 2016).

Разнообразие и обилие метанотрофного сообщества осадков мелководных сипов. В общем пуле

данных доля последовательностей гена 16S рРНК метанотрофов достигала 18% и насчитывала 5885 фрагментов, составляющих 12 ОТЕ. Более 80% от всего количества прочтений были представлены бактериями рода *Methylobacter*. При этом на долю одной ОТЕ (DQ066945), принадлежащей к виду *Methylobacter tundripaludum*, приходилось более 40% всех фрагментов гена 16S рРНК (рис. 4). Этот метанотроф был также доминирующим видом во всем микробном сообществе, составляя 7.5% от общего количества последовательностей (табл. 2). Представленные результаты коррелируют с полученными ранее данными о составе метанотрофного сообщества холодных грязевых вулканов (Белова и соавт., 2013; Oshkin et al., 2014), где доминировали представители рода *Methylobacter*. *Methylobacter tundripaludum*, наряду с метанотрофом *Methylovulum psychrotolerans* (Oshkin et al., 2016) способен к активному росту при низких температурах, вплоть до 4°C, что позволяет ему эффективно заселять холодные пресноводные экосистемы. Среди других метанотрофов *Gammaproteobacteria* значительная часть последовательностей (около 7.5%) принадлежала представителем рода *Methylomonas*, однако доля их в общем метанотрофном сообществе была ниже по сравнению с детектированной ранее в сипах (Oshkin et al., 2014). Единичные последовательности гена

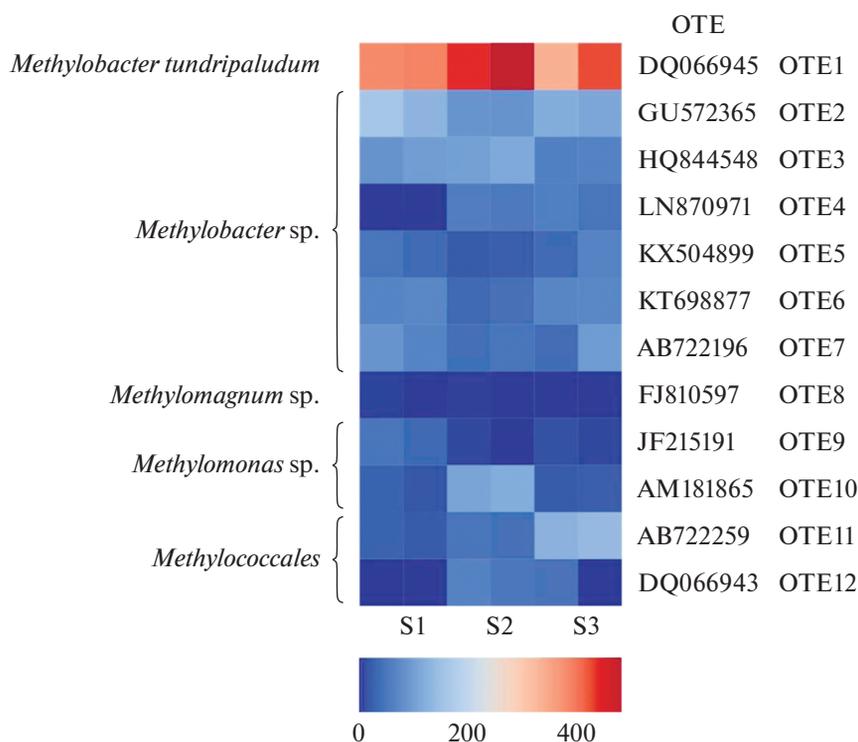


Рис. 4. Тепловая карта, отображающая общее разнообразие и количественную представленность метанотрофных бактерий.

16S рРНК (0.01%) в пуле данных принадлежали метанотрофам рода *Methyломagnum*. Небольшая часть метанотрофных последовательностей, в среднем 2.8 и 6.9%, представленная двумя ОТЕ (AB722259 и DQ066943 соответственно), филогенетически принадлежала кластеру *Methylobacter*. Однако сходство данных ОТЕ с ближайшим описанным видом *Methylobacter tundripaludum* было низким (91.5% для AB722259 и 93.1% для DQ066943), что позволяет выделить их в отдельную ветвь, возможно, родового уровня внутри класса *Methylococcales* (рис. 5). Метанотрофных представителей класса *Alphaproteobacteria* в исследуемом пуле данных гена 16S рРНК обнаружено не было, в отличие от выявленных ранее в сходных сипах бактерий рода *Methylocystis* (Oshkin et al., 2014). Также в работе 2014 г. показано присутствие в сипах некультивируемых групп метанотрофов lake cluster-2, LW и RPC-2В. Существование этих групп в осадках мелководных сипов сложно оценить, ввиду отсутствия знаний о соответствующих им генах 16S рРНК. В целом, полученные в настоящем исследовании данные о составе метанотрофного сообщества, населяющего осадки мелководных сипов, сопоставимы с опубликованными ранее данными для грязевых вулканов из схожих экосистем (Белова и соавт., 2013; Oshkin et al., 2014). Значительная доля метанотрофного сообщества представлена психрофильными бактериями рода *Methylobacter* —

типичными обитателями холодных пресноводных экосистем.

Для оценки обилия метанотрофных бактерий в исследуемом сообществе был использован метод количественной ПЦР, результаты которого оказались неоднозначными. Основанный на подсчете количества копий гена *pmoA*, кодирующего мембранную метаномоноксигеназу (ключевого фермента окисления метана), метод показал присутствие метанотрофов в исследуемом сообществе в количестве около 10^5 кл./г сухого осадка. Эти результаты значительно ниже полученных ранее значений (10^7 кл./г сухого осадка) для сообщества грязевого сипа, определенных путем прямого подсчета клеток методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (метод FISH) со специфичными для метанотрофов зондами M84 + M705 и M450 (Oshkin et al., 2014). Причиной низкой детекции метанотрофных бактерий можно предположить как высокую чувствительность данного метода к остаточным ингибирующим веществам в экстракте исследуемых ДНК, так и недостаточной специфичностью использованных праймерных систем при связывании с матрицей.

В целом, полученные в настоящей работе результаты показывают широкое распространение и разнообразие метановых сипов в поймах рек средней тайги Западной Сибири. В осадках мелководных сипов развивается разнообразное мик-

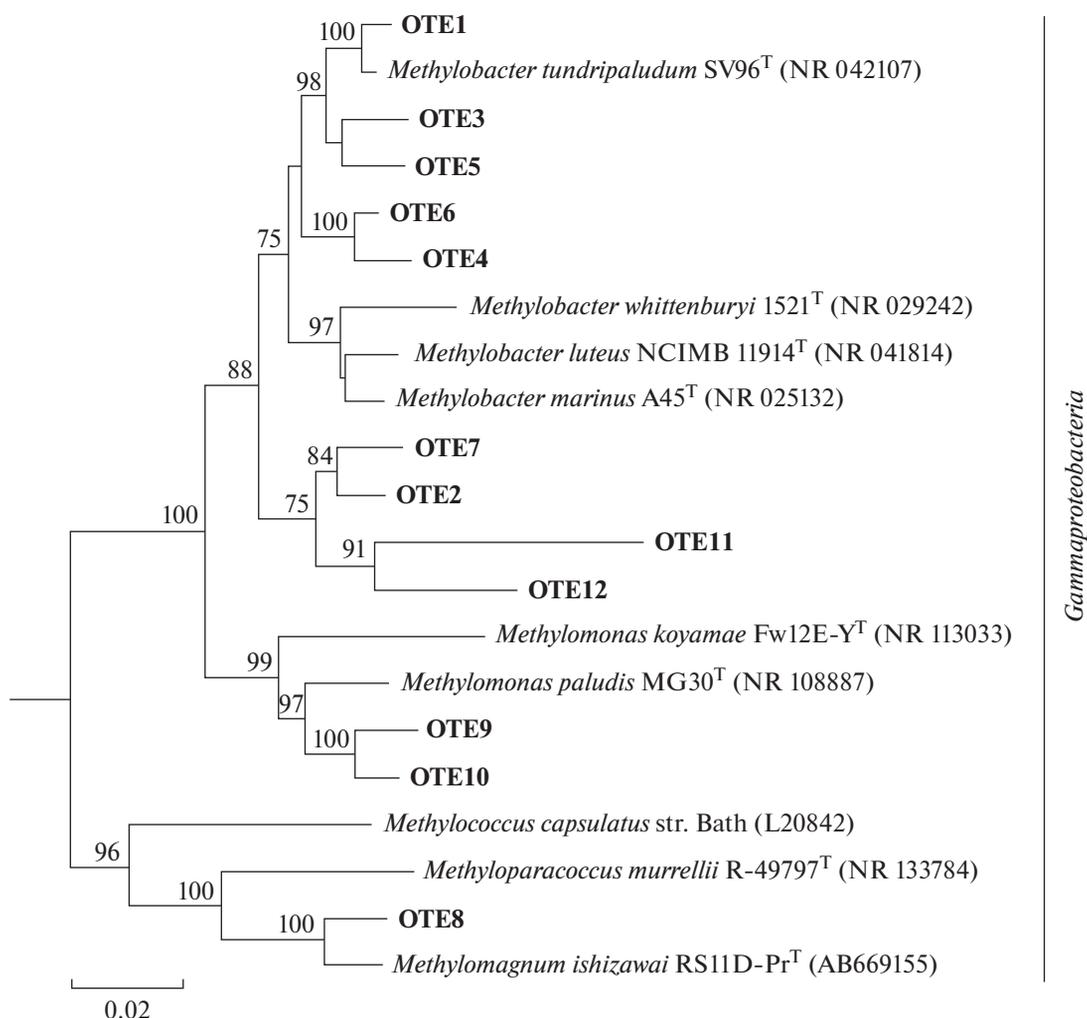


Рис. 5. Филогенетическая дендрограмма, построенная методом ближайших соседей на основе сравнительного анализа генов 16S рРНК полученных ОТЕ метанотрофных бактерий, населяющих осадки мелководных сипов (выделены жирным шрифтом) и других охарактеризованных метанотрофных бактерий. Показан бутстрэп (1000 построений) >75%. В качестве внешней группы использовались последовательности метанотрофов *Alphaproteobacteria*. Маркер — 0.02 замещение на нуклеотидную позицию.

робное сообщество. Присутствие повышенного содержания метана в совокупности с низкими температурами приводит к доминированию психрофильных метанотрофов рода *Methylobacter*. Компаньонами к ним выступают метилотрофы рода *Methylotenera*, эффективно использующие их метаболиты. Доминирующая роль в сообществе принадлежала представителям филума *Gammaproteobacteria*. Из других групп значительное развитие достигали представители филумов *Muchococcota* и *Actinobacteriota*. Показано, что в осадках мелководных сипов развивалось достаточно разнообразное ацидобактериальное сообщество с доминирующим видом рода *Luteitalea* класса *Vicinamibacteria*. Филум *Verrucomicrobiota* был представлен несколькими порядками с преобладанием бактерий рода *Luteolibacter*. Метанотрофное сообщество

сипов было представлено исключительно, метанотрофами *Gammaproteobacteria*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-77-10074). Логистика работы была организована при поддержке гранта Правительства Тюменской области в соответствии с программой Западно-Сибирского межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня в рамках национального проекта “Наука”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Таблица 3. Наиболее многочисленные ОТЕ, полученные в результате молекулярного анализа бактериального сообщества, населяющего осадки мелководных сипов вблизи выхода метана

ОТЕ	Silva-таксономия	Численность, %	Ближайший гомолог	Сходство по 16S рРНК, %
1	DQ066945	7.5	<i>Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylobacter tundripaludum</i> SV96	99.0
2	GU572365	2.2	<i>Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylobacter</i> sp.	96.6
3	HQ844548	1.6	<i>Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylobacter</i> sp.	96.8
4	FPLS01034453	3.83	<i>Gammaproteobacteria; Burkholderiales; Methylothermus</i> sp.	98.5
5	HE648180	3.26	<i>Мухомоццота; Мухомоццалес; Анаеромухомобактер</i>	100.0
4	JX222588	2.65	<i>Desulfobacterota; Geobacterales; Geobacter</i> sp.	96.8
5	JX505286	2.55	<i>Actinobacteriota; Gaiellales; uncultured</i>	100.0
7	JN540130	2.0	<i>Actinobacteriota; Coriobacteriia; OPB41</i>	100.0
8	GQ351574	1.86	<i>Сяанобактерия; Сяанобактериалес; Плантактотрикс</i> sp.	98.50
9	AY145533	1.83	<i>Actinobacteriota; Actinobacteria; uncultured</i> PeM15	100.0
11	HM346763	1.46	<i>Bacteroidota; Bacteroidales; uncultured Bacteroidetes</i> vadin HA17	100.0
12	JQ711701	1.29	<i>Firmicutes; Clostridiales; Clostridium</i> sp.	96.13
13	AB722259	1.24	<i>Gammaproteobacteria; Methylococcales; Crenothrix polyspora</i>	91.42
14	LC124505	1.22	<i>Gammaproteobacteria; Burkholderiales; uncultured</i>	100.0
15	KP896360	1.21	<i>Nitrospina; P9X2b3D02; uncultured Nitrospina</i> sp.	98.24
16	EU360304	1.18	<i>Bacteria; MBNT15; uncultured</i>	100.0
17	AB722196	1.18	<i>Gammaproteobacteria; Methylococcales; uncultured Crenothrix</i>	100.0
19	EU801391	1.12	<i>Gammaproteobacteria; Burkholderiales; uncultured</i> OM43 clade	100.0
20	JX223484	1.09	<i>Chloroflexi; Anaerolineales; Leptolinea</i> sp.	96.65
21	FJ382072	1.04	<i>Gammaproteobacteria; Burkholderiales; Albidiferax</i> sp.	98.37
22	MG576019	1.03	<i>Gammaproteobacteria; Burkholderiales; Rhodoferrax fermentans</i>	100.0

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белова С.Э., Ошкин И.Ю., Глаголев М.В., Лапина Е.Д., Максюттов Ш.Ш., Дедыш С.Н. Метанотрофные бактерии грязевых микровулканов в поймах северных рек // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 732–740.

Belova S.E., Oshkin I.Y., Dedysh S.N., Glagolev M.V., Lapshina E.D., Maksyutov S.S. Methanotrophic bacteria in cold

seeps of the floodplains of northern rivers // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 743–750.

Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тошчаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655–664.

Merkel A.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V., Tarnovetskiy I.Y. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.

Bourne D.G., McDonald I.R., Murrell J.C. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methano-

- troph diversity in three Danish soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 3802–3809.
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F. et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 852–857.
- Bousquet P., Ciais P., Miller J.B., Dlugokencky E.J., Haultaine D.A., Prigent C., van der Werf G.R., Peylin P., Brunke E.-G., Carouge C., Langenfelds R.L., Lathière J., Papa F., Ramonet M., Schmidt M., Steele L.P., Tyler S.C., White J.* Contribution of anthropogenic and natural sources to atmospheric methane variability // *Nature.* 2006. V. 443. P. 439–443.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods.* 2016. V. 13. P. 581–583.
- Ciais P., Sabine C., Bala G., Bopp L., Brovkin V., Canadell J., Chhabra A., DeFries R., Galloway J., Heimann M. et al.* Carbon and other biogeochemical cycles // *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC* / Ed. Stocker T.F. et al. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. P. 465–570.
- da Rocha U.N., Plugge C.M., George I., van Elsas J.D., van Overbeek L.S.* The rhizosphere selects for particular groups of *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* // *PLoS One.* 2013. V. 8. Art. e82443.
- Fadrosh D., Ma B., Gajer P., Sengamalai N., Ott S., Brotman R., Ravel J.* An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome.* 2014. V. 2. P. 6.
- Fletcher S.E.M., Schaefer H.* Rising methane: A new climate challenge // *Science.* 2019. V. 364. P. 932–933.
- Holmes A.J., Costello A., Lidstrom M.E., Murrell J.C.* Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonium monooxygenase may be evolutionarily related // *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. V. 132. P. 203–208.
- Hope D., Dawson J.J., Cresser M.S., Billett M.F.* A method for measuring free CO₂ in upland streamwater using headspace analysis // *J. Hydrol.* 1995. V. 166. P. 1–14.
- Huber K.J., Geppert A.M., Wanner G., Fösel B.U., Wüst P.K., Overmann J.* The first representative of the globally widespread subdivision 6 *Acidobacteria*, *Vicinamibacter silvestris* gen. nov., sp. nov., isolated from subtropical savannah soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 2971–2979.
- Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S. Engstrand L., Andersson A.F.* DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 80. P. 5116–5123.
- Janssen P.H.* Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 1719–1728.
- Kalyuzhnaya M.G., Lapidus A., Ivanova N., Copeland A.C., McHardy A.C., Szeto E., Salamov A., Grigoriev I.V., Suciú D., Levine S.R., Markowitz V.M., Rigoutsos I., Tringe S.G., Bruce D.C., Richardson P.M., Lidstrom M.E., Chistoserdova L.* High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1029–1034.
- Kielak A.M., Barreto C.C., Kowalchuk G.A., van Veen J.A., Kuramae E.E.* The ecology of *Acidobacteria*: moving beyond genes and genomes // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 744.
- Kim M., Pak S., Rim S., Ren L., Jiang F., Chang X., Liu P., Zhang Y., Fang C., Zheng C., Peng F.* *Luteolibacter arcticus* sp. nov., isolated from high Arctic tundra soil, and emended description of the genus *Luteolibacter* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 1922–1928.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Ståhlberg A., Zorica N.* The real-time polymerase chain reaction // *Mol. Aspects Med.* 2006. V. 2. P. 95–125.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Liao L., Xu X.W., Jiang X.W., Wang C.S., Zhang D.S., Ni J.-Y., Wu M.* Microbial diversity in deep-sea sediment from the cobalt-rich crust deposit region in the Pacific Ocean // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011. V. 78. P. 565–585.
- Lin J.Y., Russell J.A., Sanders J.G., Wertz J.T.* *Cephalotococcus* gen. nov., a new genus of “*Verrucomicrobia*” containing two novel species isolated from *Cephalotes* ant guts // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 3034–3040.
- Navarrete A.A., Kuramae E.E., de Hollander M., Pijl A.S., van Veen J.A., Tsai S.M.* Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. V. 83. P. 607–621.
- Onley J.R., Ahsan S., Sanford R.A., Löffler F.E.* Denitrification by *Anaeromyxobacter dehalogenans*, a common soil bacterium lacking the nitrite reductase genes *nirS* and *nirK* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 84. Art. e01985-17.
- Oshkin I.Y., Belova S.E., Danilova O.V., Miroshnikov K.K., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damste J.S., Liesack W., Dedysh S.N.* *Methylovulum psychrotolerans* sp. nov., a cold-adapted methanotroph from low-temperature terrestrial environments, and emended description of the genus *Methylovulum* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 2417–2423.
- Oshkin I.Y., Wegner C.E., Lüke C., Glagolev M.V., Filippov I.V., Pimenov N.V., Liesack W., Dedysh S.N.* Gammaproteobacterial methanotrophs dominate cold methane seeps in floodplains of West Siberian rivers // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 5944–5954.
- Oswald K., Graf J., Littmann S., Tienken D., Brand A., Wehrli B., Albertsen M., Daims H., Wagner M., Kuypers M., Schubert C.J., Milucka J.* *Crenothrix* are major methane consumers in stratified lakes // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 2124–2140.
- Pascual J., Garcia-Lopez M., Gonzalez I., Genilloud O.* *Luteolibacter gellanilyticus* sp. nov., a gellan-gum-degrading bacterium of the phylum *Verrucomicrobia* isolated from miniaturized diffusion chambers // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 3951–3959.
- Pascual J., Wüst P.K., Geppert A., Foesel B.U., Huber K.J., Overmann J.* Novel isolates double the number of chemotrophic species and allow the first description of higher taxa in *Acidobacteria* Subdivision 4 // *Syst. Appl. Microbiol.* 2015. V. 38. P. 534–544.
- Qiu Y.L., Kuang X.Z., Shi X.S., Yuan X.Z., Guo R.B.* *Terrimicrobium sacchariphilum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic

bacterium of the class “*Spartobacteria*” in the phylum *Verrucomicrobia*, isolated from a rice paddy field // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 1718–1723.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 590–596.

Ratcliffe J.L., Creevy A., Andersen R., Zarov E., Gaffney P.P., Taggart M.A., Mazeie Y., Tsyganov A.N., Rowson J.G., Lapshina E.D., Payne, R.J. Ecological and environmental transition across the forested-to-open bog ecotone in a west Siberian peatland // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 607. P. 816–828.

Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ.* 2016. V. 4. Art. e2584.

Sabrekov A.F., Terent'eva I.E., Glagolev M.V., Litti Y.V., Maksyutov S.S. Methane seeps in West Siberian middle taiga river floodplains: origin and fluxes // *AGU Fall Meeting.* 2020.

Sanford R.A., Wagner D.D., Wu Q., Chee-Sanford J.C., Thomas S.H., Cruz-García C., Rodríguez G., Massol-Deyá A., Krishnani K.K., Ritalahti K.M., Nissen S., Konstantinidis K.T., Löffler F.E. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reduc-

tase gene diversity and abundance in soils // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 19709–19714.

Terent'eva I.E., Glagolev M.V., Lapshina E.D., Sabrekov A.F., Maksyutov S. Mapping of West Siberian taiga wetland complexes using Landsat imagery: implications for methane emissions // *Biogeosci.* 2016. V. 13. P. 4615–4626.

Vieira S., Luckner M., Wanner G., Overmann J. *Luteitalea pratensis* gen. nov., sp. nov. a new member of subdivision 6 *Acidobacteria* isolated from temperate grassland soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 1408–1414.

Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W., Glöckner F.O. The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 643–648.

Yoon J., Matsuo Y., Adachi K., Nozawa M., Matsuda S., Kasai H., Yokota A. Description of *Persicirhabdus sediminis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ishigakijimensis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ponti* sp. nov., *Roseibacillus persicicus* sp. nov., *Luteolibacter pohnppeiensis* gen. nov., sp. nov. and *Luteolibacter algae* sp. nov., six marine members of the phylum “*Verrucomicrobia*”, and emended descriptions of the class *Verrucomicrobiae*, the order *Verrucomicrobiales* and the family *Verrucomicrobiaceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 998–1007.

Microbial Community Composition of Floodplains Shallow-Water Seeps in the Bolshaya Rechka Floodplain, Western Siberia

O. V. Danilova¹*, A. A. Ivanova¹, I. E. Terent'eva², M. V. Glagolev³, and A. F. Sabrekov²

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

²Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

³Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: olga.v.danilova10@gmail.com

Received April 27, 2021; revised May 23, 2021; accepted May 26, 2021

Abstract—Recently discovered fields of seeps in western Siberia are an important, previously unknown source of methane. Seeps are located in the floodplains of small rivers and vary in shape, size and localization. Methane fluxes from seeps may be high, making them the sources of high regional importance. However, the data on the seep bacterial community composition are scarce, concentrating mainly on methanotrophic bacteria. In the present work, the overall bacterial diversity in the sediments of shallow-water seeps at the floodplain of the Bolshaya Rechka River was studied using high-throughput 16S rRNA gene sequencing. Molecular analysis revealed that *Gammaproteobacteria* and *Actinobacteria* were the most abundant bacterial groups (28.5–33.8 and 11–13.2% of total 16S rRNA genes, respectively). A significant part of the sequences belonged to *Chloroflexi*, *Desulfobacterota*, and *Bacteroidota*. *Acidobacteriota* and *Verrucomicrobiota* were responsible for 1.5–2.7 and 1.0–1.9%, respectively. The methanotrophic community was dominated by bacteria of the genus *Methylobacter*. The most numerous species-level OTU (8% of all 16S rRNA gene sequences) belonged to *Methylobacter tundripaludum* (97% identity). Methanotrophic *Alphaproteobacteria* were not detected in the seeps. Our results point to the presence of an mixed microbial community in the sediments of shallow-water seeps, with predominance of methanotrophic *Gammaproteobacteria*.

Keywords: subarctic freshwater habitats, methane seeps, microbial diversity, high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene fragments, psychrophilic methanotrophs, *Methylobacter tundripaludum*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ НА *ESCHERICHIA COLI* СУПЕРГИДРОФИЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ МАГНИЕВОГО СПЛАВА

© 2021 г. В. В. Каминский^{a, b}, А. М. Емельяненко^{c, *}, А. В. Алешкин^a,
К. А. Емельяненко^c, Л. Б. Бойнович^c

^aМосковский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, 125212 Россия

^bРоссийский научный центр рентгенорадиологии Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

^cИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: ame@phyc.ace.ru

Поступила в редакцию 30.04.2021 г.

После доработки 19.05.2021 г.

Принята к публикации 20.05.2021 г.

Установлено, что поверхность магниевого сплава МА8, модифицированная методом лазерной обработки, приобретает супергидрофильные свойства и высокую бактерицидную активность в отношении взаимодействующей с ней *Escherichia coli* K12 С600. Основными механизмами бактерицидного действия являются нарушение целостности наружной мембраны бактериальной клетки при ее перфорировании наночастицами на текстурированной поверхности и подщелачивание дисперсионной среды при ее взаимодействии с металлом. Предложенный метод открывает новые перспективы защиты металлов от биокоррозии путем создания супергидрофильных покрытий с высокими бактерицидными свойствами.

Ключевые слова: антибактериальные поверхности, лазерное модифицирование поверхности, экстремальное смачивание, контактный бактериолиз

DOI: 10.31857/S0026365621050098

В последние годы резко возрос интерес научного сообщества к изучению поведения магния и его сплавов в различных средах и к разработке новых материалов на основе магния для биомедицины. Такому интересу способствуют биосовместимость магния, возможность его использования в качестве имплантов и других биоразлагаемых устройств и, наконец, привлекательные механические свойства магниевых сплавов. Дополнительным, очень ценным свойством материалов на основе магния является их антибактериальный потенциал, поскольку инфекции относятся к одним из самых неблагоприятных осложнений, связанных с имплантацией любого устройства. Поэтому в настоящее время значительные усилия направляются на исследование бактерицидных свойств материала при одновременном анализе скорости его деградации. Ранее, на примере сплавов меди, нами было показано, что супергидрофильные поверхности, получаемые лазерным текстурированием, обладают значительным антибактериальным потенциалом (Емельяненко и соавт., 2019; Emelyanenko et al., 2020). Что касается

магния, для борьбы с бактериальными загрязнениями до настоящего времени в литературе описывалось его применение в виде суспензий оксида магния в воде или частиц магния и магниевых сплавов в качестве наполнителей для полимерных матриц (Li et al., 2018). Одной из основных проблем использования бактерицидных свойств металлов и их оксидов является плохо контролируемое распределение частиц в жидкой среде и их быстрая седиментация.

В этой работе мы опишем метод приготовления пластин магниевого сплава МА8, декорированного микро- и наночастицами оксида магния, применение которых позволяет с высокой эффективностью деконтаминировать капли бактериальной суспензии *Escherichia coli* K12 С600. Наблюдаемая нами кинетика деконтаминации магниевых поверхностей позволяет рассматривать магниевые сплавы с разработанными нами покрытиями как перспективный материал для производства поверхностей, к которым часто прикасаются инфицированные пациенты в учреждениях, связанных с оказанием медицинской помощи. К та-

ким поверхностям можно отнести ручки дверей, тумблеры выключателей, смывные кнопки и т.д. Простота получения покрытий и относительно низкая цена магниевых сплавов позволяет рассматривать разработанные покрытия, как эффективный и экономически обоснованный метод борьбы с распространением больничных инфекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследований противобактериальной активности магниевых сплавов был разработан метод лазерной обработки листов и пластин сплава МА8, приводящий к формированию на поверхности многомодальной шероховатости и значительному увеличению эффективной площади поверхности. Метод основан на растровом сканировании поверхности материала лазерным пучком наносекундной длительности и длиной волны 1.064 мкм. Для обработки образцов использовали лазерную установку “Аргент-М” (Россия) мощностью 20 Вт с иттербиевым волоконным лазером, имеющим диаметр пятна контакта с поверхностью 40 мкм, и блоком управления перемещением лазерного луча RAYLASE MS10 2 (Германия). В результате предварительных экспериментов был выбран режим лазерной обработки поверхности с частотой импульсов 20 кГц, длительностью импульсов 200 нс, плотностью растрового сканирования 50 линий/мм и скоростью движения лазерного пучка 200 мм/с.

Описанный режим лазерной обработки привел к формированию высокопористой супергидрофильной поверхности, в которую капиллярное впитывание капли исследуемой бактериальной суспензии происходило полностью в течение нескольких секунд. Для сравнения антибактериальной активности поверхностей исходного магниевого сплава (обозначенного в наших экспериментах как контроль) и супергидрофильного покрытия использовали пластины размером 10 × 10 × 1 мм.

В данной работе исследовали бактерицидную активность магниевых пластин по отношению к суспензии, содержащей клетки *E. coli* K12 С600 (В-7158; ГКПМ-Оболensk). Для приготовления бактериальной суспензии суточную бактериальную культуру *E. coli* вносили в мясопептонный бульон (МПБ; “Медгамал”) и инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Для экспериментов использовали суспензии бактериальных клеток с исходным титром 5×10^7 КОЕ/мл.

Необходимое в соответствии с экспериментальным протоколом количество контрольных и супергидрофильных пластинок помещали в стерильные боксы с предварительно созданными влажными условиями. Увлажнение обеспечивали размещением вдоль боковых стенок бокса филь-

тровой бумаги, смоченной физиологическим раствором. Поддержание насыщения водными парами препятствовало испарению воды из суспензии и поддерживало режим “влажного” контакта суспензия–подложка. Бактериальную загрязненность пластинки измеряли через определенное время (15 и 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч). Для количественной оценки бактерицидного действия после фиксированного времени контакта пластины с каплей суспензии, пластину помещали в пробирку с 1 мл стерильного физиологического раствора и встряхивали на шейкере при 250 об./мин в течение 10 мин. Из полученной бактериальной суспензии готовили 10-кратные разведения и по 0.1 мл из каждого разведения равномерно распределяли в чашках Петри по поверхности агара Мюллера–Хинтона (“HiMedia Laboratories Pvt. Limited”), и после 24 ч инкубации в термостате при 37°C определяли титр бактерий. Для каждого временного интервала использовали отдельные пластины, и каждый эксперимент повторяли не менее двух раз.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 8.0. Различия считали статистически значимыми при доверительной вероятности >0.95, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

Морфологию бактериальных клеток, контактировавших с супергидрофильной поверхностью магниевого сплава, и текстуру самих супергидрофильных пластин исследовали во вторичных электронах с применением растрового электронного микроскопа, входящего в комплекс Helios Nanolab 600 (“FEI”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология супергидрофильного покрытия на магниевом сплаве, бактерицидные свойства которого исследовали в данной работе, представлена на рис. 1а.

Полученная после лазерной обработки поверхность характеризуется многомодальной шероховатостью, формируемой наночастицами и их микроагрегатами. Согласно закону Дерягина–Венцеля, такая шероховатость, в комбинации с гидрофильностью исходного магниевого сплава, обеспечивает супергидрофильное состояние поверхности.

При контакте капли бактериальной суспензии с такой поверхностью, как уже упоминалось выше, происходит капиллярная пропитка текстуры бактериальной суспензией. При этом, благодаря 100% влажности в боксе, жидкость сохранялась в порах в течение всего эксперимента, и бактериальные клетки в исследуемой системе находились

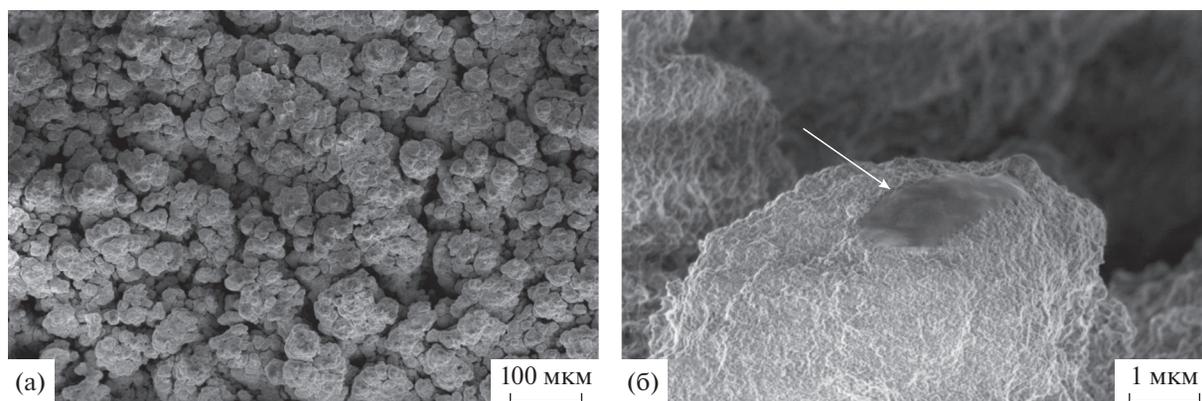


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение супергидрофильного покрытия на магниевом сплаве (а) и клетки *E. coli* (б, указана стрелкой), подвергшейся бактериолизу вследствие нарушения целостности наружной мембраны при ее перфорировании наночастицами при контакте с поверхностью покрытия.

как в планктонной форме, так и в виде клеток, осажденных на поверхность стенок текстуры. На контрольной пластине сплава магния суспензия сохраняла форму капли, практически не меняющейся за время наблюдения.

На гистограмме (рис. 2) представлено изменение во времени титра жизнеспособных клеток *E. coli* в суспензиях, контактировавших с супергидрофильной и контрольной пластинами; пунктирной линией показан титр исходной суспензии. Полученные данные показывают, что даже кратковременный контакт бактериальных клеток с поверхностью магниевых сплавов и процедуры изолирования клеток от подложки вызывают значительное снижение титра, по отношению к титру суспензии, исходно помещаемой на подложку. Однако при более длительном контакте бактерицидное действие супергидрофильной магниевой пластины проявляется значительно быстрее, чем контрольной. Так, уже через 4 ч титр бактерий был порядка 10^2 КОЕ/мл, что на 5 порядков ниже исходного и, по существу, может рассматриваться, как безопасная концентрация. После 24 ч контакта с бактериальной суспензией супергидрофильная пластина была полностью деконтаминирована. Жизнеспособность бактериальных клеток, контактировавших с контрольной пластиной, была значительно выше, и даже после 8 ч контакта бактериальный титр оставался на уровне 10^4 КОЕ/мл. После 24 ч концентрация жизнеспособных клеток оставалась на уровне 10^2 КОЕ/мл, что указывает на значимые бактерицидные свойства даже исходной пластины сплава МА8.

Остановимся теперь на механизмах бактерицидной активности магниевых сплавов, как для гладкой пластины, так и для супергидрофильной пластины, многомодальная поверхность которой обеспечивает значительное увеличение эффек-

тивной площади поверхности по отношению к геометрической или кажущейся площади.

Бактериальные клетки, попадающие на такую поверхность вследствие седиментации, погибают в результате действия комбинации различных факторов. С одной стороны, имеет место нарушение целостности наружной мембраны бактериальной клетки при ее перфорировании наночастицами, осаждающимися на поверхность в процессе лазерной обработки (Tripathy et al., 2017; Voinovich et al., 2018). Далее происходит деформация клетки, потеря внутриклеточной жидкости и бактериолиз (рис. 1б). С другой стороны, взаимодействие магния с коррозионно-активной средой, роль кото-

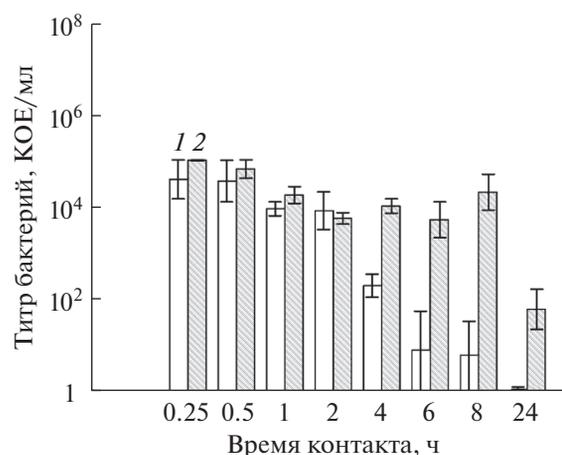


Рис. 2. Изменение титра бактериальных клеток *E. coli* при различных временах контакта капли бактериальной суспензии с супергидрофильной (1) и контрольной (2) магниевыми пластинами. Вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение экспериментальных данных, пунктирной линией показан титр исходной суспензии.

рой в данном исследовании играет мясопептонный бульон, приводит к выделению водорода и резкому подщелачиванию жидкой среды. Ранее нами было показано (Емельяненко и соавт., 2019; Emelyanenko et al., 2020), что белки из МПБ адсорбируются на поверхность металла и стимулируют коррозию. Как отмечается в ряде исследований (Luque-Agudo et al., 2020; Lin et al., 2021), именно повышение pH среды и является одним из основных элементов токсического действия магния. Этот механизм приводит к гибели как планктонной формы бактерий, так и бактерий, находящихся на поверхности сплава. Здесь важно подчеркнуть, что если первый из указанных механизмов играет значительную роль только для поверхности с многомодальной шероховатостью, то механизм, связанный с ростом pH, важен и для гладких поверхностей, и для шероховатых. Однако скорость подщелачивания пропорциональна площади контакта подложки с коррозионной средой, а значит, будет выше именно для супергидрофильной поверхности, приводя к ускорению бактерицидного действия. Экспериментальные исследования эволюции pH в суспензиях, контактирующих с контрольной и супергидрофильной пластинами (Emelyanenko et al., 2021), подтверждают приведенный выше анализ.

Наконец, третьим важным механизмом гибели бактериальных клеток вблизи поверхностей из магниевых сплавов является повышение концентрации ионов магния в жидкой среде, приводящее к осмотическим эффектам в клетке (Luque-Agudo et al., 2020). Выполненные нами недавно исследования концентрации ионов магния в бактериальных суспензиях (Emelyanenko et al., 2021) показали, что, как правило, концентрация ионов магния в жидкой среде оказывается того же порядка, что и типичные внутриклеточные концентрации (Jahnen-Dechent and Ketteler, 2012; Luque-Agudo et al., 2020), что позволяет для обсуждаемой здесь системы не рассматривать механизм, связанный с осмотическими клеточными эффектами, как значительно влияющий на гибель бактерий в дисперсионной среде.

Таким образом, представленные здесь данные по действию пластин магниевых сплавов на планктонную и осажденную на подложку формы бактериальных клеток *E. coli* показывают, что эффективность бактерицидного действия магния оказывается близкой к таковой для меди (Емельяненко и соавт., 2019), рассматриваемой в литературе как один из самых сильных бактерицидных металлов. Однако широкому использованию антибактериальных свойств меди препятствует ее токсичность для человека. Для магниевых сплавов, при практически таком же значительном, как и для меди, антибактериальном эффекте, упоминания о токсичности в литературе отсутствуют. Полу-

ченные здесь данные показывают, что антибактериальные свойства используемого в работе супергидрофильного покрытия значительно превосходят отмеченные для гладкой контрольной пластины. Это открывает дальнейшие перспективы по подбору морфологии поверхности супергидрофильных покрытий, которая позволит в значительной степени усилить бактерицидный эффект магния.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств проекта РФФИ 18-29-05008 и частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Емельяненко А.М., Каминский В.В., Пыцкий И.С., Домантовский А.Г., Емельяненко К.А., Аleshkin A.B., Бойнович Л.Б. Антибактериальные свойства супергидрофильной текстурированной меди при контакте с бактериальными суспензиями // Бюлл. эксп. биол. мед. 2019. Т. 168. № 10. С. 474–478.
- Emelyanenko A.M., Kaminskii V.V., Pytskii I.S., Domantovsky A.G., Emelyanenko K.A., Aleshkin A.V., Boinovich L.B. Antibacterial properties of superhydrophilic textured copper in contact with bacterial suspensions // Bull. Exp. Biol. Med. 2020. V. 168. № 4. P. 488–491.
- Boinovich L.B., Modin E.B., Aleshkin A.V., Emelyanenko K.A., Zulkarneev E.R., Kiseleva I.A., Vasiliev A.L., Emelyanenko A.M. Antibacterial effect of textured surfaces induced by extreme wettability and bacteriophage seeding // ACS Appl. Nanomater. 2018. V. 1. P. 1348–1359.
- Emelyanenko A.M., Kaminsky V.V., Pytskii I.S., Emelyanenko K.A., Domantovsky A.G., Chulkova E.V., Aleshkin A.V., Boinovich L.B. Antimicrobial activity and degradation of superhydrophobic magnesium substrates in bacterial media // bioRxiv. 2021.04.29.441950. <https://doi.org/10.1101/2021.04.29.4419>
- Emelyanenko A.M., Pytskii I.S., Kaminskii V.V., Chulkova E.V., Domantovsky A.G., Emelyanenko K.A., Sobolev V.D., Aleshkin A.V., Boinovich L.B. Superhydrophobic copper in biological liquids: antibacterial activity and microbiologically induced or inhibited corrosion // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2020. V. 185C. Art. 110622.
- Jahnen-Dechent W., Ketteler M. Magnesium basics // Clin. Kidney J. 2012. V. 5 (Suppl. 1). P. i3–i14.
- Li L.Y., Cui L.Y., Zeng R.C., Li S.Q., Chen X.B., Zheng Y.F., Kannan M.B. Advances in functionalized polymer coatings on biodegradable magnesium alloys – A review // Acta Biomater. 2018. V. 79. P. 23–36.

Lin Z., Sun X., Yang H. The role of antibacterial metallic elements in simultaneously improving the corrosion resistance and antibacterial activity of magnesium alloys // Mater. Des. 2021. V. 198. Art. 109350.

Luque-Agudo V., Fernández-Calderón M.C., Pacha-Olivencia M.A., Pérez-Giraldo C., Gallardo-Moreno A.M.,

González-Martín M.L. The role of magnesium in biomaterials related infections // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2020. V. 191. Art. 110996.

Tripathy A., Sen P., Su B., Briscoe W.H. Natural and bioinspired nanostructured bactericidal surfaces // Adv. Colloid Interface Sci. 2017. V. 248. P. 85–104.

Efficiency and Mechanisms of Bactericidal Effect of Superhydrophilic Magnesium Alloy Surface against *Escherichia coli*

V. V. Kaminsky^{1,2}, A. M. Emelyanenko^{3,*}, A. V. Aleshkin¹, K. A. Emelyanenko³, and L. B. Boinovich³

¹Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 125212 Russia

²Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

³Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: ame@phyche.ac.ru

Received April 30, 2021; revised May 19, 2021; accepted May 20, 2021

Abstract—The surface of the MA8 magnesium alloy, modified by laser treatment, was found to acquire superhydrophilic properties and high bactericidal activity against *Escherichia coli* K12 C600. The main mechanisms of bactericidal action were disruption of the integrity of the bacterial outer membrane, which was perforated by nanoparticles on a textured surface, and alkalization of the dispersion medium when it interacted with the metal. The proposed method opens up new prospects for metal protection against biocorrosion by creating superhydrophilic coatings with high bactericidal properties.

Keywords: antibacterial surfaces, laser surface modification, extreme wettability, contact bacteriolysis

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НОРАДРЕНАЛИНА НА РОСТ БИОПЛЕНОК КОММЕНСАЛА КОЖИ ЧЕЛОВЕКА *KYTOCOCCUS SCHROETERI* H01

© 2021 г. Н. Д. Данилова^а, О. В. Гераськина^б, Е. В. Дювенжи^а,
А. В. Феофанов^б, В. К. Плакунов^а, А. В. Ганнесен^{а, *}

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

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 22.03.2021 г.

После доработки 20.05.2021 г.

Принята к публикации 23.05.2021 г.

Впервые исследовано действие норадrenalина на рост планктонных культур и биопленок комменсального микроорганизма *Kytococcus schroeteri* H01. Показан дозозависимый ингибирующий эффект норадrenalина на биопленки после 24 и 72 ч инкубации *K. schroeteri* H01 на тефлоне: наибольшее подавление роста биопленок отмечено при концентрации гормона 3.5×10^{-7} М после 24 ч инкубации ($71 \pm 13\%$ от контроля) и 3.5×10^{-6} М после 72 ч роста ($78 \pm 10\%$ от контроля). Биопленки на стекле в присутствии норадrenalина становились значительно более плоскими и тонкими. Значимого воздействия на метаболическую активность клеток в составе биопленок не обнаружено. По-видимому, норадrenalин влияет на начальные этапы перехода к биопленочному способу существования и синтез матрикса у *K. schroeteri*.

Ключевые слова: норадrenalин, биопленки, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, *Kytococcus schroeteri*, микробиота человека

DOI: 10.31857/S0026365621050037

Биопленки микроорганизмов играют важную роль в глобальных биогеохимических циклах элементов, в функционировании различных природных экосистем, иммунной системы человека и поддержании гомеостаза комменсальной микробиоты кожи, кишечника и других органов (Нужевникова и соавт., 2015). Представители филума *Actinobacteria* широко используются в биотехнологии, а также широко представлены как комменсалы человека, в частности, кожи (Fourniere et al., 2020). В настоящее время все возрастающий интерес представляют исследования взаимодействия гуморальных систем человека и его микробиоты (в особенности, биопленок комменсалов и патогенов) с точки зрения потенциальной регуляции гомеостаза микробиоты гормонами. Катехоламины являются наиболее исследованными гормонами, однако их влияние на грамположительные микроорганизмы исследовано слабо, в частности, мало изучен эффект воздействия на актинобактерии. Недавно было показано, что катехоламины (норадrenalин, адреналин) способны оказывать значительный стимулирующий эффект на рост биопленок *S. acnes* и *M. luteus* (Vorrel

et al., 2019; Данилова и соавт., 2020). Помимо этого, сравнительно мало сведений о жизнедеятельности и формировании биопленок некоторых грамположительных микроорганизмов, обитающих на коже и их взаимодействии с организмом человека. В этом аспекте интересно исследование *Kytococcus schroeteri* — микроорганизма, выделенного из рода *Micrococcus* по ряду биохимических признаков и отнесенного, согласно современной классификации, к семейству *Kytococcaceae* порядка *Micrococcales* класса *Actinobacteria* (Becker et al., 2002, Nouioui et al., 2018). Этот микроорганизм является крайне мало исследованным с точки зрения биохимии и физиологии, что затрудняет понимание механизмов вызываемых им клинических случаев эндокардитов, пневмоний и обрастающий имплантатов, приводящих к распространению инфекции (Shah et al., 2019). В недавнем исследовании полного генома (Boukerb et al., 2019) *K. schroeteri* H01, выделенного с кожи, показано, что для него характерно высокое содержание Г + Ц, как и для других актинобактерий, а также наличие около 2200 кодирующих генов и 2.5 млн пар оснований. Таким образом, этот организм является типичным

представителем данной физиологической группы, несмотря на особенности его экотопы (Boukerb et al., 2019). О биопленках *K. schroeteri* H01 практически ничего не известно, поэтому, а также из-за того, что этот потенциально опасный и малоизученный микроорганизм обитает на здоровой коже человека, важно исследовать его биопленки и связь с гуморальными системами человека.

В настоящей работе использовали штамм *K. schroeteri* H01, выделенный ранее с кожи добровольца (Журина и соавт., 2017; Boukerb et al., 2019), и воздействие на него норадреналина ("Merck", США), показавшее, что данный гормон является одним из существенных факторов регуляции метаболизма указанного обитателя кожи человека. В работе опирались на данные о содержании гормона в плазме крови человека в норме (верхний предел нормы, согласно Vouyanova, 2017, — 3.5×10^{-9} М). Помимо этого исследовали также концентрации 3.5×10^{-8} , 3.5×10^{-7} , 3.5×10^{-6} М. Бактерии выращивали на обогащенной клостридиальной среде (Gannesen et al., 2018). Инкубацию проводили при 33°C, что соответствует температуре кожи, где обитает этот микроорганизм (Boutcher et al., 1995; Lange-Asschenfeldt et al., 2011). Результаты представляли в виде средних абсолютных и относительных значений (% от контроля). Эксперименты проводили не менее чем в трех независимых повторностях. Статистическую достоверность данных характеризовали непараметрическим критерием Манна–Уитни при $p < 0.05$ с использованием пакета Microsoft Excel 2010.

Биопленки выращивали в модельных системах с тефлоновыми кубиками и в планшетах со стеклянным дном, как описано ранее (Журина и соавт., 2017; Gannesen et al., 2018). В обоих случаях биопленки формировались в равновесии с планктонной культурой. Одну часть образцов окрашивали кристаллическим фиолетовым для определения общей биомассы, а другую часть окрашивали метаболизируемым красителем 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ) по методике, разработанной ранее (Журина и соавт., 2017). Это позволило оценить метаболическую активность клеток в составе биопленок, а именно работу электрон-транспортных цепей и НАДН-дегидрогеназ, поскольку акцептор электронов МТТ является универсальным инструментом для подобной оценки, как в случае клеток животных, так и бактерий (Berridge et al., 2005). В планшетах анализировали трехмерную структуру биопленок (плотность биомассы, т.е. объем на единицу площади поля зрения, и среднюю толщину) с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ).

Перед началом основных экспериментов предварительно определили время инкубации для получения формирующихся и сформированных

биопленок *K. schroeteri* — 24 и 72 ч соответственно. Исследование роста биопленок на тефлоновых кубиках в присутствии различных концентраций норадреналина показало дозозависимый характер действия гормона. После 24 ч инкубации гормон не оказывал значимого эффекта на конечную биомассу планктонных культур, за исключением образцов с максимальной концентрацией, в которых наблюдали стимуляцию роста планктонной культуры до $122 \pm 10\%$ от контроля (рис. 1а). При этом рост биопленок снижался в присутствии норадреналина; заметное ингибирование наблюдали при 3.5×10^{-8} и 3.5×10^{-7} М: 78 ± 11 и $71 \pm 13\%$ соответственно (рис. 1б). После 72 ч инкубации какого-либо влияния на конечную биомассу планктонных культур, определяемую по оптической плотности, не наблюдали, хотя обозначалась тенденция к подавлению их роста (рис. 1в). В случае биопленок наблюдали аналогичную тенденцию: достоверное ингибирование до $78 \pm 10\%$ происходило только при 3.5×10^{-6} М норадреналина в среде (рис. 1г). Исследование метаболической активности при 3.5×10^{-6} М норадреналина в среде не показало ощутимого ингибирования, что, вероятно, указывает на влияние норадреналина скорее на синтез матрикса и формирование архитектуры биопленки, чем на способность клеток восстанавливать МТТ. Как и в случае *M. luteus* (Данилова и соавт., 2020), вероятные изменения метаболизма *K. schroeteri* в присутствии норадреналина сильнее сказываются на росте биопленок, как более характерной для микроорганизмов-комменсалов человека форме существования.

Впервые было проведено исследование биопленок *K. schroeteri* с помощью КЛСМ. Измерения окрашенных SYTO9 Green образцов проводили с помощью микроскопа LSM510 и программного пакета ImageJ (плагин Comstat2) по методике, описанной ранее (Gannesen et al., 2018). Исследование структуры зрелых биопленок *K. schroeteri* в присутствии 3.5×10^{-9} и 3.5×10^{-6} М норадреналина показало сильный ингибирующий эффект гормона (рис. 2). Так значительно снижалась толщина биопленок (11.3 ± 4.7 мкм в контроле, 4.0 ± 1.2 мкм при 3.5×10^{-9} М норадреналина и 2.8 ± 1.2 мкм при 3.5×10^{-6} М гормона в среде, рис. 2а). Плотность биомассы биопленок при этом тоже уменьшалась, значимо — при 3.5×10^{-6} М гормона в среде (2.93 ± 1.1 мкм³/мкм² в контроле и 0.99 ± 0.3 мкм³/мкм² в присутствии норадреналина). При концентрации 3.5×10^{-9} М норадреналина также наблюдали утончение биопленок до 2.1 ± 0.51 мкм, однако разброс показателей не позволял говорить о значимости эффекта. Визуализация изображений (рис. 2б–2г) демонстрирует более плоские биопленки китокочков в присутствии гормона (рис. 2в–2г). Таким образом, можно предполагать, что норадре-

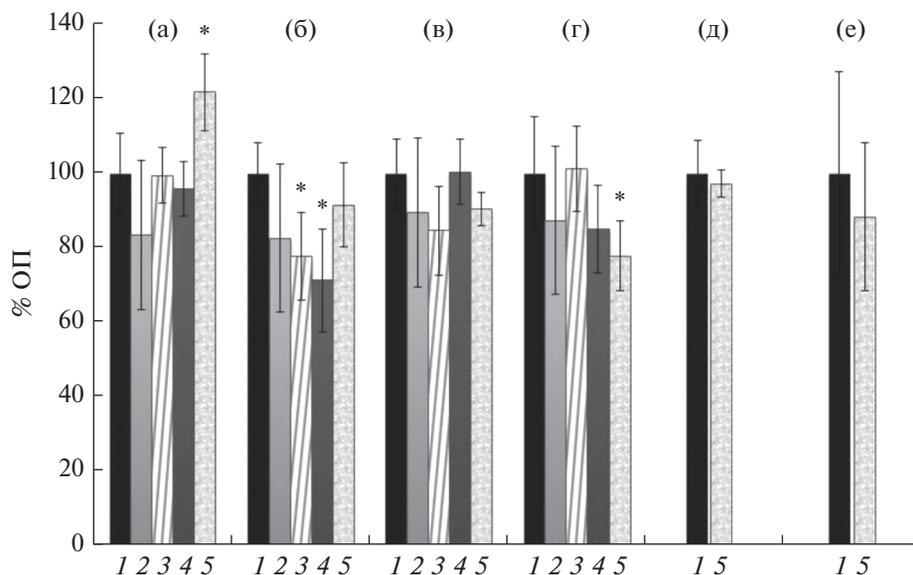


Рис. 1. Влияние норадrenalина на рост планктонных культур и биопленок *K. schroeteri* H01 в системе с тefлоновыми кубиками (б, г – окраска КФ, д, е – окраска МТТ): а – планктонные культуры через 24 ч инкубации; б, д – биопленки через 24 ч инкубации; в – планктонные культуры через 72 ч инкубации, г, е – биопленки через 72 ч инкубации. 1 – контроль без добавок; 2 – норадrenalин, 3.5×10^{-9} М; 3 – норадrenalин, 3.5×10^{-8} М; 4 – норадrenalин, 3.5×10^{-7} М; 5 – норадrenalин, 3.5×10^{-6} М. * $p < 0.05$.

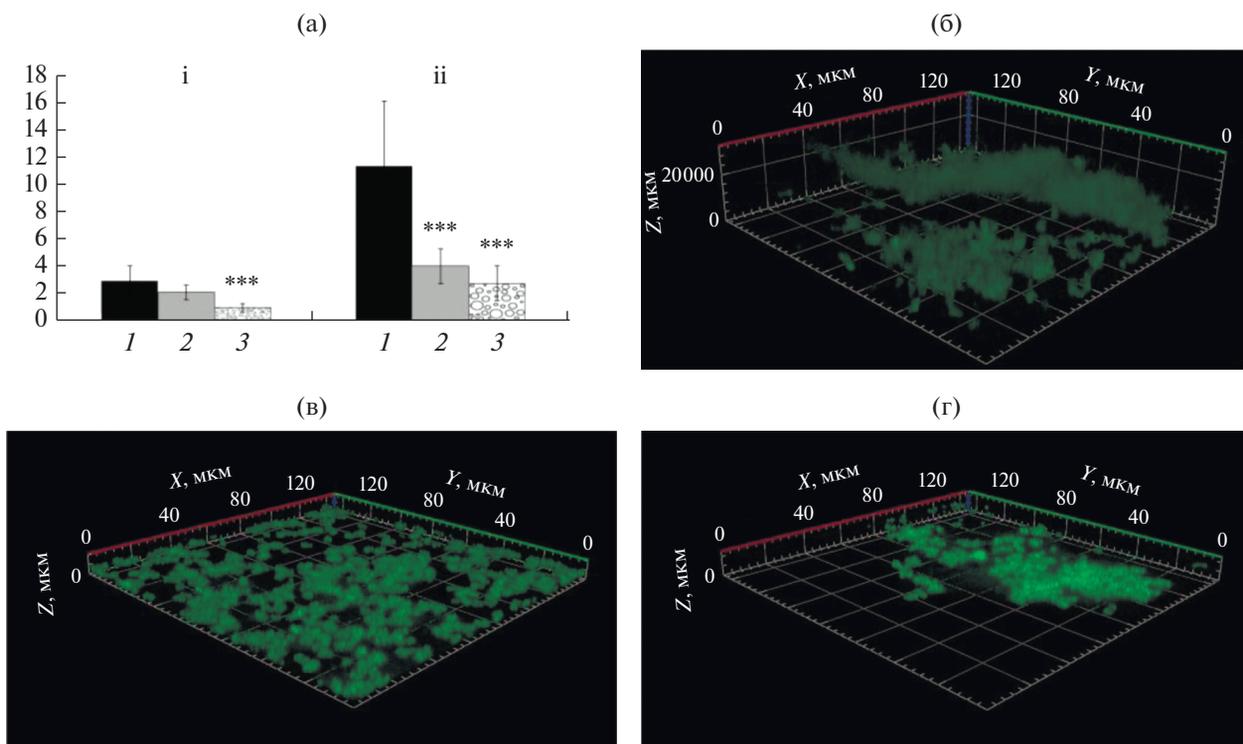


Рис. 2. КЛСМ биопленок *K. schroeteri* H01, окрашенных SYTO 9 Green после 72 ч инкубации: а – количественные характеристики биопленок; б – контроль без добавок; в – норадrenalин, 3.5×10^{-9} М; г – 3.5×10^{-6} М; и – плотность биомассы биопленок, $\text{мкм}^3/\text{мкм}^2$ (1 – контроль, 2 – норадrenalин 3.5×10^{-9} М, 3 – норадrenalин 3.5×10^{-6} М); ii – средняя толщина биопленок, мкм. *** $p < 0.001$.

налин в модельных системах не влияет на процесс адгезии клеток к абиотическим поверхностям – тефлону и стеклу. Возможно, что в присутствии норадrenalина активируются некие глобальные каскады биохимических реакций, подобные тем, которые запускаются сигнальной системой QseBC у *Escherichia coli* (Weigel, Demuth, 2016). У грамположительных микроорганизмов пока не обнаружено систем, подобных QseBC, однако потенциально мишенями для гормонов могут быть другие сенсоры. Также вероятно, что гормон действует сразу на несколько мишеней, но при разных концентрациях в среде, что потенциально могло бы служить объяснением дозозависимого эффекта, или один рецептор может по-разному реагировать на различные концентрации гормона, как это показано на моторной коре у человека (Fresnoza et al., 2014). Помимо этого, имеются свидетельства о мультитаргетном действии других гормонов на клетки. К примеру, прогестерон при разных концентрациях активирует различные мишени в Т-клетках, модулируя иммунный ответ при аутоиммунных заболеваниях (Tan et al., 2015). Потенциально, похожие явления возможны и в бактериальных клетках. Необходимы исследования изменений биохимического состава матрикса биопленок *K. schroeteri*, изменения поверхностных свойств клеток и экспрессии генов для дальнейшего углубленного изучения эффекта норадrenalина.

Таким образом, впервые были получены данные о структуре биопленок *Kytococcus schroeteri* и эффекте норадrenalина на бактерию. Получено еще одно доказательство взаимосвязи комменсальной микробиоты человека и его гормональных регуляторных систем. Несмотря на гораздо более сложные взаимодействия микроорганизмов с организмом человека и друг с другом в составе мультивидовых сообществ на коже, полученные нами результаты способствуют продвижению к лучшему пониманию взаимодействия человека и его микробиоты на примере *K. schroeteri*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-74-10071. Работа проф. В.К. Плакунова выполнена за счет финансовой поддержки Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Данилова Н.Д., Соловьева Т.В., Мартыанов С.В., Журина М.В., Ганнесен А.В. Стимулирующий эффект адrenalина на биопленки *Micrococcus luteus* C01 // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 488–492.
- Danilova N.D., Solovyeva T.V., Mart'yanov S.V., Zhurina M.V., Gannesen A.V. Stimulatory effect of epinephrine on biofilms of *Micrococcus luteus* C01 // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 493–497.
- Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Штратникова В.Ю., Плакунов В.К. Никлозамид как перспективный антибиопленочный агент // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 439–447.
- Zhurina M.V., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Shtratnikova V.Y., Plakunov V.K. Niclosamide as a promising antibiofilm agent // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 455–462.
- Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии // Микробиология. 2015. V. 84. P. 623–644.
- Nozhevnikova A.N., Botchkova E.A., Plakunov V.K. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 731–750.
- Becker K., Schumann P., Wüllenweber J., Schulte M., Weil H.P., Stackebrandt E., Peters G., von Eiff C. *Kytococcus schroeteri* sp. nov., a novel Gram-positive actinobacterium isolated from a human clinical source // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1609–1614.
- Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction // Biotechnol. Annu. Rev. 2005. V. 11. P. 127–152.
- Borrel V., Thomas P., Catovic C., Racine P.J., Konto-Ghiorgi Y., Lefevre L., Duclairoir-Poc C., Zouboulis C., Feuilloley M.G. Acne and stress: impact of catecholamines on *Cutibacterium acnes* // Front. Med. 2019. V. 6. P. 155.
- Boukerb A.M., Robert M., Teteneva N.A., Danilova N.D., Zhurina M.V., Mart'yanov S. V., Plakunov V.K., Feuilloley M.G., Gannesen A.V. Draft genome sequence of *Kytococcus schroeteri* strain h01, isolated from human skin // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. Art. e01081-19.
- Boutcher S.H., Maw G.J., Taylor N.A. Forehead skin temperature and thermal sensation during exercise in cool and thermoneutral environments // Aviat. Space Environ. Med. 1995. V. 66. P. 1058–1066.
- Boyanova L. Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria // Anaerobe. 2017. V. 44. P. 13–19.
- Fournière M., Latire T., Souak D., Feuilloley M. G., Bedoux G. *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 1752.
- Fresnoza S., Stiksrud E., Klinker F., Liebetanz D., Paulus W., Kuo M.F., Nitsche M.A. Dosage-dependent effect of dopamine D2 receptor activation on motor cortex plasticity in humans // J. Neurosci. 2014. V. 34. P. 10701–10709.
- Gannesen A.V., Borrel V., Lefevre L., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilloley M.G. Effect of two cosmetic compounds on the growth, biofilm formation activity, and surface properties of acneic strains of *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* // MicrobiologyOpen. 2019. V. 8. Art. e00659.

Lange-Asschenfeldt B., Marenbach D., Lang C., Patzelt A., Ulrich M., Maltusch A., Terhorst D., Stockfleth E., Sterry W., Lademann J. Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin // *Skin Pharmacol. Physiol.* 2011. V. 24. P. 305–311.

Nouioui I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpidis N.C., Pukall R., Klenk H.-P., Goodfellow M., Goker R. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2007.

Shah A.S., Vijayvargiya P., Jung S., Wilson J.W. Postoperative hardware-related infection from *Kytococcus schroeteri*:

its association with prosthetic material and hematological malignancies – a report of a case and review of existing literature // *Case Rep. Infect. Dis.* 2019. V. 2019. Art. 6936472.

Tan I.J., Peeva E., Zandman-Goddard G. Hormonal modulation of the immune system – A spotlight on the role of progestogens // *Autoimmun. Rev.* 2015. V. 14. P. 536–542.

Weigel W.A., Demuth D.R. Qse BC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae* // *Mol. Oral Microbiol.* 2016. V. 31. P. 379–397.

Inhibitory Effect of Norepinephrine on Biofilm Growth of the Human Skin Commensal *Kytococcus schroeteri* H01

N. D. Danilova¹, O. V. Geraskina², E. V. Diuvenji¹, A. V. Feofanov²,
V. K. Plakunov¹, and A. V. Gannesen^{1, *}

¹Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

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

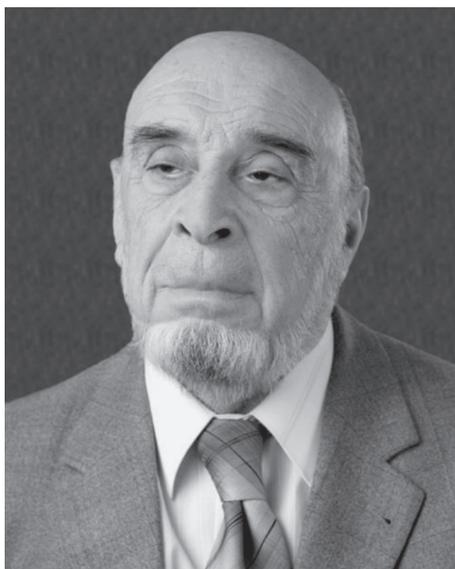
Received March 22, 2021; revised May 20, 2021; accepted May 23, 2021

Abstract—This is the first report on the effect of norepinephrine on biofilms and planktonic cultures of a human skin commensal *Kytococcus schroeteri* H01. A dose-dependent inhibitory effect of norepinephrine on *K. schroeteri* was shown after 24 and 72 h of incubation on PTFE cubes. The most pronounced effect was observed at 3.5×10^{-7} M norepinephrine after 24 h of incubation ($71 \pm 13\%$ of the control) and at 3.5×10^{-6} M after 72 h ($78 \pm 10\%$ of the control). Biofilms formed on glass in the presence of norepinephrine were thinner and flatter than in the controls. No significant effect of norepinephrine on metabolic activity of the cells in biofilms formed on PTFE cubes was revealed. Norepinephrine probably affects initial stages of the switching to biofilm lifestyle and matrix synthesis in *K. schroeteri* H01.

Keywords: norepinephrine, biofilms, confocal laser scanning microscopy, *Kytococcus schroeteri*, human microbiota

ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА ДМИТРИЯ ГРИГОРЬЕВИЧА ЗВЯГИНЦЕВА (09.03.1932–08.05.2021)

DOI: 10.31857/S0026365621050116



8 мая 2021 г. ушел из жизни Дмитрий Григорьевич Звягинцев — замечательный ученый, известный специалист в области почвенной микробиологии, доктор биологических наук, заслуженный профессор МГУ, заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕН, лауреат Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники, премии им. М.В. Ломоносова. Дмитрий Григорьевич родился в Москве 9 марта 1932 г., учился в московской школе № 7, в 1955 г. окончил биолого-почвенный факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Вся его деятельность связана с кафедрой биологии почв МГУ: он выпускник этой кафедры, здесь же под руководством член-корр. АН СССР Н.А. Красильникова закончил аспирантуру, защитил кандидатскую диссертацию и остался работать на кафедре сначала лаборантом, затем младшим научным сотрудником, старшим научным сотрудником, профессором. В течение 37 лет заведовал кафедрой биологии почв МГУ и создал школу почвенных микробиологов, опирающихся на общую микробиологию и экологию.

Д.Г. Звягинцев — специалист в области общей и почвенной микробиологии, биологии почв, биотехнологии и экологии, автор более 500 научных статей, 10 монографий, классического уни-

верситетского учебника “Биология почв” (2005 г.) и 7 учебных пособий и практикумов. Работы Д.Г. Звягинцева широко известны в мировой науке. Большой цикл работ Д.Г. Звягинцева посвящен адгезии (адсорбции, иммобилизации) микробных клеток на твердых поверхностях, особенно на почвенных частицах и агрегатах. Он подробно изучил закономерности и механизмы адгезии и разработал методы десорбции клеток с поверхностей (ультразвуковая обработка). Большинство клеток в почве находятся в иммобилизованном состоянии, что определяет специфику их жизнедеятельности и предотвращает вымывание из почвы в грунтовые воды. Его монография “Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями” (1973 г.) удостоена Ломоносовской премии МГУ. Разработанный Д.Г. Звягинцевым прямой микроскопический метод изучения микроорганизмов в почве с помощью люминесцентной микроскопии в отраженном свете позволил исследовать микробоценоз в почвенной суспензии и непосредственно на срезах почвы или почвенных агрегатов. Профессор Д.Г. Звягинцев разработал методы для дифференциации живых и мертвых клеток непосредственно в почвенной суспензии и установил, что только небольшая часть микробной биомассы находится в активном состоянии, а основная часть пребывает в состоянии анабиоза. Оригинальное направление в исследованиях Д.Г. Звягинцева — специфика почвы как среды обитания микроорганизмов. Им сформулированы основные принципы и концепции строения и функционирования комплекса почвенных микроорганизмов (почва как множество микросред обитания, концепция микробного пула и пула микробных метаболитов, принцип ненасыщенности почвы микроорганизмами, принцип дублирования). Результаты этих исследований обобщены в монографии “Почва и микроорганизмы” (1987 г.), за которую автор был удостоен премии им. С.Н. Виноградского АН СССР. Логическим продолжением темы взаимодействия микроорганизмов с почвой явилось изучение роли микробов в биосферных функциях почв. Результаты этих исследований вошли в коллективную монографию “Структурно-функциональная роль почвы в биосфере” (1999 г.). За цикл работ “Функционально-экологические основы

изучения, охраны, повышения плодородия почв и рациональное использование почвенных ресурсов” удостоен Государственной премии РФ (2001 г.). Д.Г. Звягинцевым с позиций общей экологии разработаны разделы Экология микробной клетки в почве и Экология микробных популяций в почве.

В работе “Структурно-функциональная организация микробных сообществ” (1999 г.) Д.Г. Звягинцевым четко прослежена вертикальная стратификация микроорганизмов в наземных экосистемах, включая все ярусы экосистемы – от крон деревьев до нижних почвенных горизонтов и подстилающих почву пород, проведены исследования эколого-географического распространения микроорганизмов, разработаны новые экологические показатели микробного биоразнообразия, установлены четкие различия в доминирующих видах микроорганизмов в различных типах почв. Определены схемы распространения доминантов в основных зональных, интразональных и антропогенно преобразованных почвах (“Микроорганизмы и охрана почв”, 1989; “Почвы и микробное разнообразие”, 1996 г.). Изучены распространение и экология актиномицетов, в том числе и так называемых редких родов актиномицетов в различных типах почв (“Экология актиномицетов”, 2001 г.). Эта работа удостоена Ломоносовской премии (2005 г.) и премии им. В.Р. Вильямса (2003 г.).

Д.Г. Звягинцев читал курсы лекций в университетах Японии, Словакии, Кубы. Под его руководством выполнено 66 кандидатских диссертаций; 15 его учеников стали докторами наук. Д.Г. Звягинцевым проводилась большая научно-организационная работа. В течение 25 лет он являлся Пред-

седателем комиссии биологии почв Докучаевского общества почвоведов, был вице-президентом комиссии биологии почв Международного общества почвоведов, председателем Московского отделения Всесоюзного общества микробиологов, долго работал членом Экспертного совета ВАК, членом диссертационного совета Института микробиологии РАН, председателем диссертационного совета по микробиологии на факультете почвоведения МГУ, членом редколлегии журналов “Микробиология” и “Вестник Московского Университета, серия Почвоведение”.

Многие сотрудники кафедры биологии почв МГУ, ИНМИ РАН, ИБФМ РАН и других академических институтов и производственных организаций – прямые ученики Дмитрия Григорьевича Звягинцева – защитили докторские и кандидатские диссертации при его консультировании и непосредственном руководстве. Дмитрий Григорьевич обладал уникальной способностью видеть в научной проблеме главное, поэтому многие обращались к нему за советом по вопросам научной работы. Несмотря на то, что Дмитрий Григорьевич в последнее время по состоянию здоровья уже не мог присутствовать в университете, сотрудники ощущали его внимание к делам кафедры, он делился мудрыми советами и рекомендациями. Ему всегда можно было позвонить, посоветоваться, просто пообщаться...

Дмитрий Григорьевич Звягинцев навсегда останется в нашей памяти.

*Коллектив кафедры биологии почв
Редколлегия журнала “Микробиология”*