

СОДЕРЖАНИЕ

Том 90, номер 1, 2021

ОБЗОРЫ

Обзор методов определения микробной продукции и эмиссии метана в почвах <i>М. В. Глаголев, О. Р. Коцюрбенко, А. Ф. Сабреков, Ю. В. Литти, И. Е. Терентьева</i>	3
Бистабильность и формирование матрикса биопленки как механизмы адаптации <i>Bacillus subtilis</i> в стационарной фазе <i>М. Р. Шарипова, А. М. Марданова, Н. Л. Рудакова, Д. С. Пудова</i>	24
Липиды микросмицетов и стресс <i>Е. В. Федосеева, О. А. Данилова, Е. А. Януцевич, В. А. Терехова, В. М. Терешина</i>	43

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Снижение эффективности формирования биопленок и их устойчивости к окислительному стрессу и высушиванию у <i>ahpC</i> мутанта <i>Azospirillum brasilense</i> <i>А. В. Шелудько, Д. И. Мокеев, С. С. Евстигнеева, Ю. А. Филипьевичева, А. М. Буров, Л. П. Петрова, Е. И. Кацы</i>	64
Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфатов в циклическом аэробно-анаэробном культивировании <i>А. В. Пелевина, Ю. Ю. Берестовская, В. А. Грачёв, И. К. Дорофеева, В. В. Сорокин, А. Г. Дорофеев, А. Ю. Каллистова, Ю. А. Николаев, Р. Ю. Котляров, А. В. Белецкий, Н. В. Равин, Н. В. Пименов, А. В. Марданов</i>	76
Биовыщелачивание медно-цинкового концентрата с высоким содержанием мышьяка <i>Ю. А. Елкина, В. С. Меламуд, А. Г. Булаев</i>	90
Идентификация фитат-гидролизующих ризобактерий рода <i>Rantoea</i> на основе фенотипических признаков и мультилокусного анализа <i>А. Д. Сулейманова, Д. Л. Иткина, Д. С. Пудова, М. Р. Шарипова</i>	100
Структура и биологические свойства О-специфического полисахарида и липида А <i>Rantoea agglomerans</i> П324 <i>Э. Л. Здоровенко, А. А. Кадыкова, А. С. Шашков, Л. Д. Варбанец, Т. В. Булыгина, Ф. В. Тоукач</i>	110
Галактофуранан клеточной стенки актинобактерий рода <i>Raenarthrobacter</i> <i>Н. В. Потехина, А. С. Шашков, Е. М. Тульская, Е. В. Арискина, Л. В. Дорофеева, Л. И. Евтушенко</i>	122

Contents

Vol. 90, No. 1, 2021

Reviews

- Methodologies for Measuring Microbial Methane Production and Emission from Soils—A Review
M. V. Glagolev, O. R. Kotsyurbenko, A. F. Sabrekov, Yu. V. Litti, and I. E. Terentjeva 3
- Bistability and Formation of the Biofilm Matrix as Adaptive Mechanisms during the Stationary Phase of *Bacillus subtilis*
M. R. Sharipova, A. M. Mardanova, N. L. Rudakova, and D. S. Pudova 24
- Micromycete Lipids and Stress
E. V. Fedoseeva, O. A. Danilova, E. A. Ianutsevich, V. A. Terekhova, and V. M. Tereshina 43
-

Experimental Articles

- Suppressed Biofilm Formation Efficiency and Decreased Biofilm Resistance to Oxidative Stress and Drying in an *Azospirillum brasilense ahpC* Mutant
A. V. Shelud'ko, D. I. Mokeev, S. S. Evstigneeva, Yu. A. Filip'echeva, A. M. Burov, L. P. Petrova, and E. I. Katsy 64
- Phosphates Removal by a Microbial Consortium under Conditions of Cyclic Aerobic-Anaerobic Cultivation
A. V. Pelevina, Yu. Yu. Berestovskaya, V. A. Grachev, I. K. Dorofeeva, V. V. Sorokin, A. G. Dorofeev, A. Yu. Kallistova, Yu. A. Nikolaev, R. Yu. Kotlyarov, N. V. Pimenov, and A. V. Mardanov 76
- Bioleaching of a Copper-Zinc Concentrate with High Arsenic Content
Yu. A. Elkina, V. S. Melamud, and A. G. Bulaev 90
- Identification of *Pantoea* Phytate-Hydrolyzing Rhizobacteria Based on Their Phenotypic Features and Multilocus Sequence Analysis (MLSA)
A. D. Suleimanova, D. L. Itkina, D. S. Pudova, and M. R. Sharipova 100
- Structure and Biological Properties of the O-Specific Polysaccharide and Lipid A from *Pantoea agglomerans* P324
E. L. Zdorovenko, A. A. Kadykova, A. S. Shashkov, L. D. Varbanets, T. V. Bulyhina, and P. V. Toukach 110
- Cell Wall Galactofuranan of the *Paenarthrobacter* Actinobacteria
N. V. Potekhina, A. S. Shashkov, E. M. Tul'skaya, E. V. Ariskina, L. V. Dorofeeva, and L. I. Evtushenko 122
-
-

ОБЗОР МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНОЙ ПРОДУКЦИИ И ЭМИССИИ МЕТАНА В ПОЧВАХ

© 2021 г. М. В. Глаголев^{a, b, c, d, *}, О. Р. Коцорбенко^b, А. Ф. Сабреков^{b, c},
Ю. В. Литги^e, И. Е. Терентьева^c

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

^bЮгорский государственный университет, Ханты-Мансийск, 628011 Россия

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

^dИнститут лесоведения РАН, Успенское, Московская обл., 143030, Россия

^eФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: m_glagolev@mail.ru

Поступила в редакцию 13.05.2020 г.

После доработки 16.07.2020 г.

Принята к публикации 07.08.2020 г.

Метан — важный парниковый газ, климатический эффект которого невозможно долгосрочно прогнозировать без знания распределения наземных источников его поступления в атмосферу. Цель работы — дать обзор широко используемых в настоящее время методов измерения микробной продукции и эмиссии метана в почвах. Предложена классификация методов измерения продукции метана в почвах, основанная на фундаментальных физических принципах и математических схемах обработки данных для каждого метода измерений. В лабораторных условиях продукция метана определяется методами инкубации образцов почвы и послойно-балансовым методом, которые позволяют исследовать метаногенный потенциал сообщества для последующего моделирования микробных процессов, но не могут быть напрямую экстраполированы на природную экосистему. Для определения продукции в полевых условиях применяются почвенно-градиентные методы, а также полевая модификация послойно-балансового метода, разработанная для болотных почв. Описаны методы измерения эмиссии метана, их преимущества и ограничения для разных почвенных систем. Традиционные камерные методы до сих пор популярны благодаря простоте использования. Их применение, однако, имеет ряд ограничений: при использовании камеры происходит изменение естественных условий, работа возможна в небольших пространственных масштабах, существуют проблемы при установке камеры в некоторых экосистемах. Этих недостатков лишены более современные микрометеорологические методы, позволяющие получить репрезентативную оценку эмиссии на масштабе биогеоценоза, даже если выделение газа неоднородно в пространстве и во времени. Для определения эмиссии из специфических объектов (полигонов ТБО, животноводческих хозяйств), а также на очень большом пространственном масштабе (региональном и даже глобальном) используется “метод обратной задачи”.

Ключевые слова: метаногенез, потенциальная продукция метана, эмиссия метана, камерный метод, микрометеорологические методы, метод обратной задачи

DOI: 10.31857/S0026365621010055

Метан — один из важных парниковых газов, влияющих на тепловой баланс в климатической системе Земли (Alm et al., 1999). От 70 до 90% атмосферного метана образуется в результате микробных процессов (Ehhalt et al., 1978; Кондратьев и соавт., 2003; Каллистова и соавт., 2017; Kotsyurbenko et al., 2020). До открытия аэробного метаногенеза считалось, что метан образуется исключительно в результате жизнедеятельности метаногенных архей, являясь при этом конечным продуктом анаэробного разложения органического вещества в метаногенном микробном сообществе. В насто-

ящее время доказано, что метан может также образовываться в аэробных условиях при разложении полисахаридных эфиров метилфосфоновых кислот морскими аэробными гетеротрофными бактериями (Kamat et al., 2013; Repeta et al., 2016). Есть также данные об аэробном образовании метана различными фототрофами и метаногенами (Grossart et al., 2011; Vižić-Ionescu et al., 2018).

Основным источником метана являются анаэробные почвенные экосистемы, в особенности те из них, где отсутствуют или находятся в низкой концентрации соединения (сульфаты, окислы

железа и т.д.), служащие акцепторами электронов конкурентным для метаногенов микробным группам. Среди таких экосистем следует в первую очередь назвать увлажненные и заболоченные почвы, в том числе расположенные в условиях умеренного и холодного климата (Haas-Laurson et al., 1996; Waddington et al., 1996; Кондратьев и соавт., 2003; Etiope, 2009). Значительное количество метана образуется при разложении различных антропогенных органических отходов, происходящем на полигонах их захоронения (Nozhevnikova et al., 1993; Кондратьев и соавт., 2003; Goldsmith et al., 2012; Foster-Wittig et al., 2015). Также среди почвенных источников следует упомянуть заливные рисовые поля (Cicerone, Shetter, 1981; Минько 1988; Schütz et al., 1989; Marik et al., 2002) и грунты вечной мерзлоты (Kobabe et al., 2004; Ganzert et al., 2007). Наконец, в последнее время возрос интерес к продукции метана в почвах заболоченных лесов и лесов, периодически подвергающихся переувлажнению (Aronson et al., 2012; Christiansen et al., 2012; Glagolev et al., 2018), хотя ранее леса в качестве глобального источника метана всерьез не рассматривались.

Особым интересом к вопросам глобального газообмена отмечен период с начала 80-х гг. XX в., когда перед мировым научным сообществом встала проблема прогнозирования изменения климата, и были установлены ранее неизвестные особенности влияния газообразных примесей атмосферы на ее радиационный режим. Результаты мониторинга примесей атмосферы свидетельствуют лишь о вторичных изменениях, происходящих в системе планетарного газообмена. Поэтому уже около 40 лет назад стало ясно, что успешное решение проблемы долгосрочного прогнозирования климатического эффекта парниковых газов невозможно без знания распределения их наземных источников (Минько, 1988). При этом очевидно, что решение различных задач требует разных методов измерения, каждый из которых мог бы работать в своем пространственном масштабе, а вся система методов охватывала бы любые масштабы, условно говоря — от болотной кочки до континентов.

Поначалу в полевых условиях лишь локально измеряли суммарный поток CH_4 на поверхности раздела почва/атмосфера простейшим камерным методом, а иногда только концентрацию метана в пресноводных осадках и почвах (Mah et al., 1977; Cicerone, Shetter, 1981; Harriss et al., 1982), и отбирали образцы. Продукцию или потребление CH_4 определяли в лабораторных условиях, помещая эти образцы во флаконы и инкубируя их при определенной температуре с добавлением субстратов, иногда содержащих радиоактивную метку (Zeikus, Winfrey, 1976; Kelley, Chynoweth, 1980; King et al., 1981). В дальнейшем был разработан новый послойно-балансовый метод для изучения процессов газооб-

мена (Минько и соавт., 1987; Орлов и соавт., 1987; Alperin et al., 1988). Этот метод применялся, в частности, для измерения метаногенеза в “мезокосмах” в лабораторных условиях (Минько и соавт., 1987), а также в полевой модификации (в англоязычной литературе для нее было предложено специальное название — “deep soil chamber technique”) в экспериментах *in situ* (Glagolev, 1998; Panikov et al., 2001). В этом методе скорость метаногенеза рассчитывалась из уравнения баланса массы CH_4 в профиле почвы. В литературе существует некоторая неоднозначность в использовании терминов “микрокосм” и “мезокосм” — ср., например, (Федоров, Гильманов, 1980; Гюнтер и соавт., 1982; Одум, 1986; Blodau et al., 2004). В настоящей статье термин “мезокосм” будет использован для обозначения “образца почвы ненарушенного сложения” (Blodau et al., 2004). Термин “микрокосм” будет использован для обозначения искусственной экосистемы, т.е. почвы с нарушенным строением, например, почвы, разбавленной культуральной средой. Для исследования почвенного мезокосма обычно используют контейнер объемом от нескольких литров до нескольких десятков литров, тогда как для создания микрокосмов используются различные емкости для микробного культивирования, как правило, флаконы 20–120 мл.

Целью работы является обзор широко используемых в настоящее время методов измерения микробной продукции и эмиссии метана в почвах, а также оценка эффективности применения этих методов в различных экосистемах.

ПРОДУКЦИЯ И ЭМИССИЯ МЕТАНА В ПОЧВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Основным источником CH_4 в атмосферу являются переувлажненные болота (Tathy et al., 1992; Bridgham et al., 2013; Lohila et al., 2016), в которых за счет обводнения почв создаются анаэробные условия, необходимые для функционирования метаногенного микробного сообщества. В тропической зоне источниками метана являются почвенные системы мангровых лесов, периодически затопляемые морской водой, и другие тропические переувлажненные земли (Torres-Alvarado et al., 2005; Kristiansen, 2007). Эмиссия CH_4 зарегистрирована также из черноземов, в том числе орошаемых или затопляемых под культуру риса (Каспаров и соавт., 1986; Минько и соавт., 1987; Минько, 1988), дерново-подзолистых, глеегаежных, глее-мерзлотных и др. почв, расположенных в зонах бореального климата (Минько, 1988), в частности, почв под заболоченным лесом (Ullah et al., 2009; Lohila et al., 2016; Mochenov et al., 2018), а также в поймах рек (Bartlett et al., 1990; van Huissteden et al., 2005; Belova et al., 2013; Oshkin et al., 2014) и т.п. Метаногенные археи обнаружены практически во всех

типах почвенных экосистем, однако эмиссия метана в атмосферу зависит также от активности метанотрофных микроорганизмов, которые, обитая в поверхностных аэрируемых слоях почвы, потребляют CH_4 . Поступление метана в атмосферу — результат работы микробного метанового цикла, основными микробными агентами которого как раз и являются метаногены и метанотрофы.

Эмиссия метана из увлажненных почв также зависит от процессов его транспорта из анаэробной зоны к поверхностным слоям. Метан поступает к ним благодаря трем основным механизмам: пузырьковому, диффузионному и через растения. Учет этих механизмов необходим при корректной оценке потоков CH_4 из увлажненных почв (Torges-Alvarado et al., 2005). Дополнительно, увлажненные торфяные почвы характеризуются пространственной структурной неоднородностью, которая затрудняет экстраполяцию значений продукции или эмиссии метана. Сложность оценки продукции и эмиссии CH_4 в почвах полигонов твердых бытовых отходов (ТБО) также связана с гетерогенностью, поскольку ТБО закладываются на полигоны неоднородными слоями. Слои различаются по химическому составу, количеству и биоразлагаемости органического вещества, содержащегося в ТБО. Более того, велика неоднородность и в пределах одного слоя (Nozhevnikova et al., 1993; Каллистова и соавт., 2006; Foster-Wittig et al., 2015; Терентьева и соавт., 2017).

Актуальность точной оценки продукции и эмиссии метана из различных почвенных экосистем связана с важной экологической ролью этих экосистем и их существенным вкладом в глобальную эмиссию CH_4 . Современные методы определения продукции и эмиссии метана позволяют в той или иной степени учитывать специфические особенности каждой отдельной почвенной экосистемы. В связи с большим разнообразием этих экосистем, а также физико-химических и гидрологических условий, в которых они находятся, существует необходимость классификации имеющихся методов, анализа их применимости, а также нахождения наиболее оптимального метода для каждой из рассматриваемых экосистем.

ОБЩИЙ ПРИНЦИП КЛАССИФИКАЦИИ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ И ЭМИССИИ МЕТАНА

Проблема классификации методов измерения продукции CH_4 в почвенных экосистемах связана с учетом пространственной структуры и физико-химических условий в месте измерения. С самой общей точки зрения определение интенсивности метаногенеза представляет собой известную в физике задачу определения мощности источника массы какого-либо компонента системы, в дан-

ном случае массы метана (мощность источника массы определенного компонента — величина массы этого компонента, порождаемая в единице объема в единицу времени (Филиппов, 1986)). Рассмотренное ниже решение этой задачи применительно к почвенным экосистемам легло в основу предлагаемой классификации.

Источником массы какого-либо компонента называют причину изменения массы компонента за счет внутренних процессов, происходящих в веществе, т.е. в отсутствие потоков массы. *Потоком массы* называют массу, переносимую в единицу времени сквозь заданную поверхность S (следовательно, размерностью потока будет: ед. массы/ед. времени, например, мг/ч). Для характеристики потока через отдельные элементы поверхности вводится понятие об *удельном потоке* как о потоке через единицу поверхности. Следовательно, размерностью удельного потока будет: ед. массы · (ед. времени)⁻¹ · (ед. площади)⁻¹, например, мг/(ч · м²). Количественная характеристика действия источника — *мощность источника* (Филиппов, 1986), определение которой было дано выше. Согласно определению, размерностью *мощности источника* будет: ед. массы · (ед. времени)⁻¹ · (ед. объема)⁻¹, например, мг/(ч · м³). Очевидно, что физическое понятие “удельный поток” соответствует широко применяемому в экологии понятию “эмиссия”, а “мощность источника” — “продукция” или “скорость продукции”.

Для CH_4 источниками будут локальные микробные процессы его образования (метаногенез). Иногда от биологов и экологов можно услышать, что также источниками метана будут места его накопления (газогидраты, сипы, нефтегазовые месторождения и т.д), из которых CH_4 может мигрировать на поверхность. Со строгой физической точки зрения это, конечно, не так, поскольку в этом случае в единице объема масса метана не порождается, а лишь перемещается. Действительно, в данный момент времени и в сипе, и в нефтяном месторождении метан уже есть, он там не “порождается” — не образуется (разве что случай газогидрата несколько более сложен).

Источники, характеризующиеся отрицательной мощностью, именуется *стоками* (Филиппов, 1986). Для CH_4 стоками будут любые процессы, в которых он поглощается, например, в атмосфере это фотохимические реакции окисления, в почве — биологическое потребление метанотрофными микроорганизмами.

В общем случае в системе (например, в разных ее частях) могут действовать одновременно источники, мощность которых мы обозначим p^+ , и стоки с мощностью p^- . В этом случае наблюдаемая результирующая мощность источника (p) будет определяться наложением процессов образования и расходования вещества:

$$p = p^+ - p^- \quad (1)$$

Однако в реальности эта простая схема подчас существенно усложняется. При оттаивании “вечномерзлых” пород, например, может выделяться метан, не локально образованный метаногенами, а накопленный много лет назад под слоем замерзшей почвы. Может выделяться и абиогенный метан. Формально, раз нет образования/распада метана, а есть лишь перемещение уже существовавшего метана, то описание этих процессов должно идти не через мощность источника массы CH_4 , а через его потоки между разными резервуарами. Но феноменологически и в этом случае часто прибегают к описанию именно через источники/стоки.

Специфика совместного действия источников и стоков метана может проявляться, в частности, в том, что в нижних (анаэробных) слоях профиля болотной почвы может происходить образование метана с высокой интенсивностью p^+ , а в верхнем (насыщенном кислородом) слое – окисление метана с интенсивностью p^- . Если образование метана немного превышает его окисление, то весь профиль почвы будет выглядеть для внешнего наблюдателя как источник метана с небольшой результирующей мощностью, равной $(p^+ - p^-)$. Напротив, какой бы большой ни была величина p^+ , но если окисление метана превышает его образование, то весь профиль почвы будет выглядеть как сток метана.

Строгой количественной основой определения результирующей мощности источника является то фундаментальное уравнение, в которое она входит. Это – уравнение закона сохранения массы.

Рассмотрим соотношение, являющееся общей формулировкой закона сохранения массы. Принципиально различных (с физической точки зрения) причин изменения концентрации метана в фиксированном объеме (V_0) две: во-первых, это *поток* газа сквозь поверхность S (охватывающую рассматриваемый объем) и, во-вторых, *действие источников/стоков* газа в рассматриваемом объеме. Запишем это аналитически:

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{V_0} C dV = \int_{V_0} p dV - \int_S \mathbf{j} \cdot \mathbf{dn} \quad (2)$$

Здесь C – объемная плотность (концентрация); \mathbf{j} – удельный поток (далее – УП); p – результирующая мощность источника; вектор \mathbf{dn} по абсолютной величине равен площади элемента поверхности, а направлен по нормали к ней. Воспользуемся теоремой Остроградского для того, чтобы выразить поверхностный интеграл в этой формуле через объемный, и перенесем все члены в левую часть. Получаем (Филиппов, 1986):

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{V_0} C dV - \int_{V_0} p dV + \int_{V_0} \text{div}(\mathbf{j}) dV = 0 \quad (3)$$

Или, по известному свойству интеграла (“интеграл суммы равен сумме интегралов”):

$$\int_{V_0} \left[\frac{\partial C}{\partial t} - p + \text{div}(\mathbf{j}) \right] dV = 0 \quad (4)$$

Ввиду произвольности выделенной поверхности подынтегральное выражение равно нулю (Филиппов, 1986; Ландау, Лифшиц, 1988):

$$\partial C / \partial t + \text{div}(\mathbf{j}) = p \quad (5)$$

Как видим, скорость изменения концентрации газа, его удельный поток и результирующая мощность источника оказались связаны в едином уравнении. Следовательно, на базе такого уравнения можно теоретически построить классификацию методов измерения и продукции, и эмиссии. Практически же факт указанной связи означает, что, зная динамику концентрации, можно по потокам определить продукцию или, наоборот, по продукции – эмиссию.

Подставив выражение (5) в уравнение (1) получаем уравнение для мощности источника:

$$p^+ = p^- + \frac{\partial C}{\partial t} + \text{div}(\mathbf{j}) \quad (6)$$

Замкнутая поверхность S разграничивает две области: внутреннюю D и внешнюю D_1 (рис. 1). При постановке задач необходимо оговаривать, для какой из двух областей требуется искать решение. В соответствии с этим различают *внутренние* и *внешние* задачи (Арсенин, 1984). Возникает вопрос, как можно во внешней области D_1 определить мощность источника, расположенного во внутренней области D ? Для области D_1 уравнение (6) превратится в $\partial C / \partial t = -\text{div}(\mathbf{j})$, поскольку в D_1 нет источников и стоков, т.е. $p^+ = p^- = 0$. Однако при постановке полной математической задачи (уравнение и граничные условия) поток на границе S окажется зависящим от p^+ и p^- . Следовательно, и во внешней задаче мы будем иметь зависимость поля концентрации от мощности источников, а это значит, что мощность можно будет определить по полю концентраций.

В целом, любой экспериментальный метод определения интенсивности образования какого-либо вещества основан на уравнении (6) или непосредственно на уравнении (2), из которого (6) было получено. При этом экспериментально измеряются все члены в правой части уравнения (6) или эксперимент ставится таким образом, чтобы наиболее сложно измеряемые члены этого уравнения оказались равны нулю, тогда останется экспериментально измерить лишь оставшиеся члены.

Рассмотрим пример. Если взять образец небольшого объема, в котором находятся микроор-

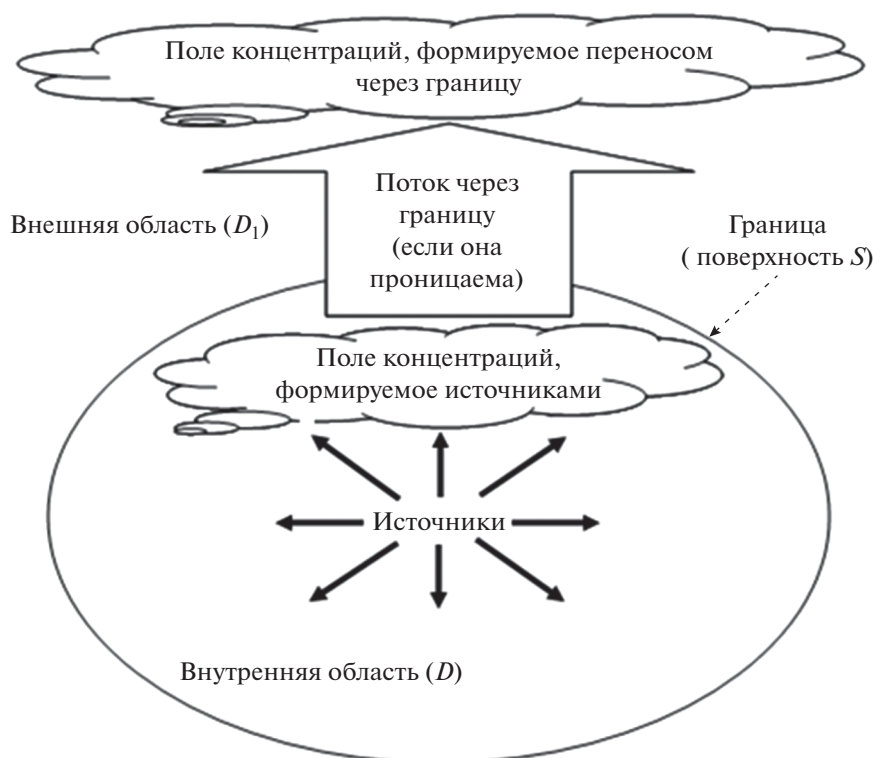


Рис. 1. Схема взаимодействия основных параметров, используемых для классификации методов измерения продукции метана.

ганизмы – источники метана (это может быть болотная почва, осадки озер и т.п.), и поместить его в герметично закрытый сосуд, в котором созданы анаэробные условия, то

1. $p^- = 0$ в силу анаэробности,
2. $\text{div}(\mathbf{j}) \approx 0$ в силу малого объема (в данном случае “малость” объема сосуда определяется условием $\text{div}(\mathbf{j}) \ll \partial C/\partial t$).

Необходимо отметить, что анаэробное окисление метана как процесс установлено, хотя ни чистых культур, ни биохимии процесса пока не изучено. Показано, что, как правило, для анаэробного окисления метана нужны такие акцепторы электронов как сульфаты (Voetius et al., 2000; Orphan et al., 2001) или нитраты (Raghoebarsing et al., 2006), хотя есть также указания на осуществление процесса обратного метаногенеза (Morgan et al., 2005). Вклад анаэробного окисления в эмиссию метана в океанах оценивается в 6–20%. Для наземных экосистем, оценка не проводилась, но, предположительно, вклад пресных систем значительно ниже. С большой вероятностью в олиготрофных болотах этот процесс либо незначителен, либо вообще не происходит, хотя был отмечен для осадков озер (Eller et al., 2005).

Соответственно, мы можем допустить отклонения p^- от 0, если мы учитываем анаэробное

окисление метана для систем, где оно вполне вероятно, хотя это отклонение будет скорее всего очень невелико. Но для болот и заболоченных территорий этим допущением можно пренебречь.

Следовательно, из (6) при допущении отсутствия или пренебрежимо малого анаэробного окисления метана получаем: $p^+ = \partial C/\partial t$, т.е. по возрастанию концентрации метана в сосуде можно напрямую судить о потенциальной продукции метана микроорганизмами. Такой метод широко применяется для исследования метаногенеза в различных образцах – водных, почвенных и др. (подробнее данный способ будет изложен в разделе “Определение потенциальной продукции метана “методом инкубации””).

На основании уравнения (6) предложена классификация наиболее распространенных методов определения продукции и эмиссии метана (табл. 1). При этом оказываются реализованными не все логические возможности. Например, нам не известен метод, который был бы основан на решении внешней задачи при $p^- = 0$, $\partial C/\partial t \neq 0$ и $\text{div}(\mathbf{j}) \neq 0$. Действительно, представить себе такой метод весьма проблематично. Не ясно, каким образом возможно обеспечить отключение метанотрофии ($p^- = 0$), при том, что концентрация метана измеряется в атмо-

Таблица 1. Сравнение различных методов измерения эмиссии и продукции в рамках классификации, основанной на фундаментальном уравнении переноса

Метод	Члены уравнения (5)			Задача*
	p^-	$\partial C/\partial t$	$\text{div}(\mathbf{j})$	
Определение потенциальной продукции “ <i>in vitro</i> ”	0	$\neq 0$	0	Внутренняя
Полевая модификация послойно-балансового метода (DSC-technique)	0	$\neq 0$	$\neq 0$	Внутренняя
Почвенно-градиентный метод	0 или $\neq 0$ **	0	$\neq 0$	Внутренняя
Статический камерный метод	$\neq 0$	$\neq 0$	0	Внешняя
Динамический камерный метод	$\neq 0$	0	0	Внешняя
Статический камерный метод с ингибированием	0	$\neq 0$	0	Внешняя
Динамический камерный метод с ингибированием	0	0	0	Внешняя
Градиентный метод	$\neq 0$	0	$\neq 0$	Внешняя
Метод турбулентных пульсаций	$\neq 0$	$\neq 0$	$\neq 0$	Внешняя

* Здесь во всех случаях уравнение внешней задачи: $\partial C/\partial t = -\text{div}(\mathbf{j})$, p^- входит в нижнее граничное условие.

** В зависимости от конкретной реализации у разных авторов – ср. (Alm et al., 1999; Шнырев, 2016; Глаголев и Сабреков, 2016).

сфере (поскольку задача – внешняя), следовательно, речь идет о достаточно большой пространственной области, в которой $\text{div}(\mathbf{j}) \neq 0$?

Таким образом, предложенная классификация, основанная на учете фундаментальных физических основ и математических схем обработки данных для каждого метода измерений, позволяет, во-первых, оценить возможность разработки того или иного метода; во-вторых, (при наличии такой возможности) очертить масштабы его применимости; и, в-третьих, оценить свойственные ему принципиальные ограничения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ МЕТАНА

Определение продукции метана в лабораторных условиях

Определение потенциальной продукции метана “методом инкубации”. Метод инкубации, основанный на измерении скорости метаногенеза в почвенных образцах, помещенных в герметичные емкости и инкубируемых при определенной температуре в течение определенного времени, хорошо известен и широко используется. Орлов и соавт. (1987) использовали для этого метода названия “имитационный модельный эксперимент” и “метод имитации”, но в дальнейшем эта терминология отошла к области вычислительных экспериментов (расчетов по математическим моделям), и при экспериментальном определении продукции метана она не применяется. Термин “потенциальная” продукция метана используется исходя из предположения, что условия в сосуде, содержащем почвенный образец, отличаются от условий *in situ*.

Для лабораторных инкубационных экспериментов почвенные образцы используют в виде

микрокосмов или суспензий. В последнем случае происходит гомогенизация образца после удаления из него крупных частей растительного материала. Важным критерием при подготовке образцов является соотношение твердой и жидкой фазы, которое должно быть максимально близко к соотношению *in situ* (Chin, Conrad, 1995; Kotsyurbenko, Glagolev, 2015). Перед началом основного эксперимента обычно проводят предынкубацию, целью которой является достижение постоянной скорости метаногенеза.

Для определения потенциала отдельной группы метаногенов в образцы вносят различные субстраты метаногенеза, например, ацетат, $\text{H}_2 + \text{CO}_2$, метилированные C_1 -соединения, и анализируют прирост концентрации метана в газовой фазе при инкубации с использованием конкретного субстрата.

При изучении вклада какого-либо конкретного метаболического пути метаногенеза (как правило, водород-зависимого или ацетокластического метаногенеза) в общую продукцию метана используют радиоактивно меченые субстраты ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, $\text{Na}-[2-^{14}\text{C}]$ ацетат), которые добавляют в микроколичествах в образец, инкубируют его в течение нескольких часов в условиях *in situ*, фиксируют и далее определяют концентрацию радиоактивно меченого метана. В процессе жизнедеятельности метаногенов ^{14}C из субстрата переходит в продукт $^{14}\text{C}-\text{CH}_4$. Радиоактивный метан и CO_2 детектируются с помощью счетчика радиоактивности, после чего вклад определенного пути метаногенеза (f) можно определить из данных по общей динамике субстратов и продуктов процесса образования метана и из динамики их радиоак-

тивной составляющей. Например, вклад водород-зависимого метаногенеза (f_{H_2}) в общий метаногенез вычисляется посредством расчетов удельных скоростей образования CH_4 (SR_{CH_4}) и CO_2 (SR_{CO_2}) (Conrad et al., 1989; Conrad, Klose, 1999):

$$f_{H_2} = SR_{CH_4} / SR_{CO_2}, \quad (7)$$

где $SR_{CH_4} = C_{CH_4}^* / C_{CH_4}$, а $SR_{CO_2} = C_{CO_2}^* / C_{CO_2}$ (соотношение концентраций радиоактивных (*) и нерадиоактивных веществ).

Метод радиоактивно меченых субстратов дает возможность точно определить, в какие продукты превращается вводимый в образец субстрат. Однако если в системе происходят конкурентные микробные процессы, например, автотрофная сульфатредукция или синтрофное разложение ацетата, то конечный результат будет иметь погрешность. Кроме того, лаборатория, в которой проводятся работы с изотопами, должна отвечать всем необходимым требованиям техники безопасности, чтобы исключить любое радиоактивное заражение.

В качестве альтернативного метода определения вклада различных путей метаногенеза в общую продукцию CH_4 используют специфические ингибиторы. Основное распространение получили ингибиторы общего (бромэтансульфонат и хлороформ) и ацетокластического (фторацетат, фторметил, хлорметил) метаногенеза, принцип действия которых основан на конкурентном ингибировании ключевых ферментов метаногенеза.

При добавлении ингибиторов в образец происходит подавление либо общего, либо ацетокластического метаногенеза, что приводит к дисбалансу трофической цепи анаэробного сообщества и накопление в среде промежуточных продуктов метаболизма. Для каждого из таких продуктов известно уравнение его разложения с образованием либо субстратов метаногенов, либо непосредственно молекулы CH_4 . На основе таких уравнений составляется углеродный баланс по потенциальному образованию ацетата и метана из всех промежуточных продуктов, после чего вычисляется вклад ацетокластического метаногенеза в общий метаногенез (Conrad, Klose, 2000).

Метод ингибиторов достаточно прост и может быть проведен посредством обычной инкубации образцов с последующим измерением накопившихся продуктов. Недостатком метода является точность результатов, которая зависит от определенных допущений. Так же как и в методе изотопов погрешности могут возникнуть при прохождении в системе конкурентных микробных процессов, которые не учитываются при вычислениях.

Еще одним методом для оценки скоростей различных путей метаногенеза является метод, в основе которого лежит явление фракционирования

стабильных изотопов углерода ^{13}C и ^{12}C . В общем виде фактор фракционирования α для реакции $A \rightarrow B$ определяется как:

$$\alpha_{A,B} = (\delta^{13}C_A + 1000) / (\delta^{13}C_B + 1000), \quad (8)$$

где $\delta^{13}C$ – величина соотношения стабильных изотопов в образце (в промилле, ‰). Фактор фракционирования α далее используется в уравнениях для вычисления соотношения вкладов различных путей метаногенеза в общую продукцию CH_4 (Conrad, 2005).

Тем не менее, величина $\delta^{13}C-CH_4$, определяющая соотношение стабильных изотопов в молекуле метана также является важным индикатором преобладания различных путей образования метана в системе, причем как биогенных, так и абиогенных. Микробное образование метана идет преимущественно по ацетокластическому пути, если величина $\delta^{13}C-CH_4$ имеет значение -60 (‰) и выше, тогда как водород-зависимый метаногенез преобладает при значениях -70 (‰) и ниже. Диапазон значений $-60...-70$ относится к смешанной области, в которой оба пути метаногенеза могут преобладать или иметь сходный вклад в общий метаногенез (Whiticar, 1999).

Данный метод применяется при исследовании метаногенеза различных наземных экосистем, таких как болота (Galand et al., 2010) и донные отложения озер (Conrad et al., 2020). Основное преимущество метода – возможность получения информации в отношении очень разнообразных путей образования метана. Однако точность метода не всегда дает возможность уверенно делать выводы о вкладе конкретного пути метаногенеза.

Достоверную информацию о соотношении различных путей образования CH_4 в исследуемой системе и оценке их скоростей можно получить при одновременном применении нескольких вышеописанных методов как взаимодополняющих. К сожалению, методика постановки модельных экспериментов “методом инкубации” исключает возможность изучения пространственной составляющей процесса образования газов, тогда как он протекает не просто в почвенной массе, а в почвенном профиле. Характеризуясь низким коэффициентом подобия по отношению к природной обстановке, настоящий метод может рассматриваться лишь как вспомогательный при исследовании функции почв (Орлов и соавт., 1987).

“Послойно-балансовый метод” (в мезокосмах). В послойно-балансовом методе профиль почвы рассматривается как система диффузионно-связанных слоев. Принимается, что скорость изменения концентрации газа в i -ом слое складывается из скорости его продукции в этом слое (V_i) и скоростей диффузионного обмена с соседними (вышележащим и нижележащим) слоями. Рас-

четная формула метода может быть записана в виде:

$$V_i = m \frac{c_i - C_i}{\Delta t} + D_0 \frac{c_i + C_i - 0.5(c_{i-1} + C_{i-1} + c_{i+1} + C_{i+1})}{h^2}, \quad (9)$$

где C_{i-1} , C_i , C_{i+1} – концентрации газа в соответствующих слоях в некоторый момент времени t ; c_{i-1} , c_i , c_{i+1} – концентрации газа в соответствующих слоях в момент времени $t + \Delta t$; D_0 – коэффициент диффузии газа; h – мощность слоя (Минько и соавт., 1987; Орлов и соавт., 1987); m – пористость. Необходимо отметить, что авторы метода пористость вообще не вводили, как бы допуская, что всегда $m = 1$, а это неприемлемо для подавляющего большинства почв. Кроме того, формула (9) даже с учетом m может использоваться только в том случае, когда коэффициенты диффузии в соседних слоях не сильно различаются.

Эта формула, фактически, представляет собой обращение схемы Кранка–Николсон решения уравнения диффузии. С данной схемой можно ознакомиться в литературе по численным методам (например, Вазов, Форсайт, 1963; Самарский, 1983; Shih, 1984). Очевидно, что с математической точки зрения суть предложенного метода состоит в следующем:

1. Движение газа в профиле почвы описывается уравнением диффузии – оно приведено ниже при изложении работ Глаголева (Glagolev, 1998) и Паникова и соавт. (Panikov et al., 2001) и обозначено (12).

2. Проводится конечно-разностная аппроксимация этого уравнения по схеме Кранка–Николсон (в предположении постоянства коэффициента диффузии во всей толще почвы).

3. Данная схема обращается, т.е. рассчитывается не концентрация газа, а, напротив, по известным концентрациям газа в соседних слоях вычисляется скорость продукции (V_i) в каждом слое.

В статье Орлова и соавт. (1987) приведены также особенности практической реализации этого метода (тип и расположение пробоотборников, исходная концентрация субстрата и т.д.).

Ограничением для применения послойно-балансового метода является интенсивный метаногенез, при котором диффузионный механизм не будет успевать отводить метан. В этом случае возникнет пузырьковый (конвективный) перенос газа, который формула (9) не учитывает. Если рассматривать “послойно-балансовый метод” с учетом не только диффузионного, но и конвективного переноса, то ограничений на его применимость нет.

Определение продукции метана в полевых условиях

Почвенно-градиентные методы. Существует несколько модификаций почвенно-градиентных методов, различающихся как техническими деталями, так и математическими расчетами. Здесь мы рассмотрим базовый вариант метода, описанный, в частности, в статье Алма и соавт. (Alm et al., 1999). Его принцип основан на уравнении (5), точнее говоря, на его интегральной форме (3). При этом делаются следующие допущения: во-первых, уравнение применяется к описанию стационарного профиля концентраций (т.е. $\partial C/\partial t = 0$) и, во-вторых, предполагается газообмен только за счет диффузии, описываемой законом Фика (обычно в почвенной газодинамике принимается, что ось z направлена вглубь почвы, но положительным считается поток, идущий в противоположном направлении):

$$j = D \frac{\partial C_i}{\partial z}, \quad (10)$$

где j ($\text{мг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$) – удельный поток метана из почвенного слоя; D ($\text{м}^2 \cdot \text{ч}^{-1}$) – коэффициент диффузии в пористой среде (формулы для расчета D см. в Alm et al., 1999). Продукция и потребление метана в простейшем варианте метода не разделяется, т.е. этот метод предназначен для определения не собственно продукции, а эмиссии. Однако в определенных условиях этим методом можно определить величину суммарной продукции во всем профиле. Например, при подавлении метанотрофии естественным образом (за счет высокого уровня воды) или с помощью искусственных ингибиторов (ацетилена, этилена, этана и ряда других, при этом необходимо учитывать, что эти соединения в определенных концентрациях ингибируют и метаногенез тоже, см. Chan and Parkin, 2000), а также, если потребление метана измерено отдельно в специальных экспериментах.

На практике для определения продукции вышеописанным методом используется следующая процедура: из толщи почвы или снега с постоянным шагом (h) по глубине берутся пробы газа, затем определяется его концентрация. В этом случае формула (10) может быть записана следующим образом (если приближенно аппроксимировать значение $\partial C_i/\partial z$ при помощи значений C на двух глубинах):

$$j \approx m D_0 (C_i - C_{i-1})/h, \quad (11)$$

где C_i – концентрация метана на соответствующей глубине, m – пористость аэрации, D_0 – коэффициент диффузии метана в воздухе. Конечно, существуют формулы, аппроксимирующие $\partial C_i/\partial z$ по значениям C на трех, четырех и большем числе глубин (Березин, Жидков, 1966; Пантелеев, Кудрявцева, 2017).

Недостатки почвенно-градиентного метода следуют из лежащих в его основе допущений. Если профиль концентраций не является стационарным или если перенос метана происходит не только диффузионным путем, то в методе будет возникать существенная погрешность. Например, Альм и соавт. (Alm et al., 1999) отмечали, что в их измерениях разница между результатами камерного метода и почвенно-градиентного составляла от 28 до 43%. Они считали, что камерный метод дает более реалистичные результаты. Строго говоря, почвенно-градиентные методы относятся к хорошо известным в математике алгоритмам, принадлежащим к так называемым “методам обращения”: либо обращения решения прямой задачи, либо обращения математической модели в зависимости от конкретной реализации почвенно-градиентного метода. Методы обращения описаны, например, в книге Мацевитого и Лушпенко (1990), где справедливо отмечается, что наличие в них операции дифференцирования является причиной существенных ошибок и неустойчивости, и, следовательно, некорректности решения. Что касается алгоритмов расчета продукции (и эмиссии) метана, относящихся к классу “методов обращения решения прямой задачи”, то их возможная некорректность детально рассматривается в статье Глаголева и Сабрекова (2016) на примере оценки погрешности для случаев, где не учитывается зависимость коэффициента диффузии от глубины и распределения метанотрофов и метаногенов по глубине.

Полевая модификация послойно-балансового метода (“deep soil chamber technique”). Данный метод разработан для болотных почв в таких условиях метаногенеза, когда отсутствует пузырьковый механизм транспорта газа (Glagolev, 1998; Panikov et al., 2001). Пузырьки не будут образовываться, например, при низких (положительных) температурах, обеспечивающих большую растворимость метана; также они не образуются при более высоких температурах, но относительно слабом метаногенезе. Принцип метода основан на уравнении (5) в модификации для i -го почвенного слоя и нескольких возможных механизмов транспорта газа в толще торфа:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = p_i^+ - p_i^- - V_i - F_i - D_i, \quad (12)$$

где слагаемые представляют собой скорости, соответственно, изменения концентрации ($\partial C_i / \partial t$), продукции (p_i^+), потребления (p_i^-), а также выноса метана растениями (V_i), диффузией (D_i) и пузырьками (F_i) (Glagolev, 1998; Panikov et al., 2001).

Выше уже было сказано, что рассматриваемый метод применяется только в тех условиях, когда пузырькового переноса нет, поэтому априори $F_i = 0$. Более того, после срезания растений и установки

специальной низкой (вровень с уровнем воды) камеры, $V_i = 0$. Наконец, растворенный кислород быстро потребляется, поскольку его поступление из атмосферы заблокировано камерой, в результате чего аэробное окисление метана метанотрофами прекращается (следовательно, $p_i^- = 0$). Авторы допускают, что в системе нет анаэробного окисления метана (или оно так мало, что им можно пренебречь). Описываемый метод был разработан еще до того, как стало известно о важности анаэробного окисления метана в различных экосистемах. Сейчас анаэробных метанотрофов детектируют повсеместно, и в современной литературе этому процессу уделяется много внимания. Если же анаэробным метанокислением пренебречь нельзя, то данным методом будет определена не собственно продукция, а разность между ней и интенсивностью анаэробного окисления CH_4 .

Итак, уравнение упрощается (Panikov et al., 2001):

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = p_i^+ - D_i. \quad (13)$$

Отсюда очевидно, что под C_i авторы понимают концентрацию метана, выраженную в единицах массы на единицу объема торфа. Поскольку концентрация определяется в единицах массы на единицу объема почвенной воды или воздуха, то левую часть уравнения следует домножить на пористость (m), что будет учтено в дальнейшем.

В соответствии с уравнением (13), скорость продукции CH_4 (p_i^+) может быть вычислена для каждого i -го почвенного слоя по экспериментально полученным величинам накопления в нем растворенного метана с учетом диффузии между соседними слоями (Panikov et al., 2001). Диффузия может быть описана на основе закона Фика. Обращение уравнения (13) показывает, что скорость продукции (p_i^+) является функцией 1-ой и 2-ой производных концентрации метана, соответственно, по времени и глубине:

$$p_i^+ = m \frac{\partial C_i}{\partial t} + D \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2}. \quad (14)$$

Обе производные оцениваются при помощи дифференцирования кубического сплайна, аппроксимирующего концентрационный профиль. Такой способ дает вполне реалистичные значения производных для очень широкого диапазона форм профилей (Alperin et al., 1988). В статье Паникова и соавт. (Panikov et al., 2001) приведены особенности практической реализации этого метода (тип и расположение пробоотборников, время отбора проб и т.д.).

Однако обнуление растительного и пузырькового транспорта ($V_i = 0$, $F_i = 0$), постулируемое в

данном методе, не вполне очевидно. Мнение авторов о том, что срезание растений приведет к прекращению транспорта через них метана, может быть как верным, так и ошибочным в зависимости от того, каков механизм выноса метана растениями. Однако, согласно экспериментальным данным, удаление растений уменьшает вынос метана через них (Sebacher et al., 1985; Waddington et al., 1996; Глаголев и соавт., 1999). В некоторых условиях пузырьки газа также будут образовываться и подниматься вверх. Повторим, что расчеты следует осуществлять только для тех условий, когда пузырьки не наблюдаются, т.е. при относительно невысоких температурах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭМИССИИ МЕТАНА

Эмиссия метана – показатель незамкнутости цикла Зенгена, в который объединены микроорганизмы, осуществляющие процессы продукции и потребления CH_4 (Заварзин, 1995), когда часть метана высвобождается из зоны микробного трофического взаимодействия и поступает в атмосферу, где далее участвует в различных фотохимических реакциях, внося вклад в парниковый эффект. Таким образом, измерение эмиссии необходимо для правильной оценки потенциала различных экосистем как источников/стоков метана. Именно почвенные экосистемы являются основными биогенными источниками метана, и наибольший вклад в атмосферную эмиссию вносят увлажненные почвы, представленные болотными торфяными экосистемами. Точность оценки эмиссии метана зависит от правильно выбранного метода измерения, как можно более полно учитывающего специфику конкретной метан-генерирующей почвенной системы.

“Сосредоточенные” (камерные) методы

Статический и динамический камерные методы. Традиционно в почвоведении с целью количественной оценки потоков газов на поверхности почвы используется “камерно-статический метод” (Орлов и соавт., 1987), называемый также “методом эмиссионных камер”. Принцип метода очень прост. На поверхность почвы устанавливается “камера”; в простейшем случае – это куб, нижняя грань которого отсутствует (в остальном камера герметична). Открытой частью камера ставится на специальное основание, которое позволяет обеспечить герметичный контакт с почвой, например, за счет того, что нижний край основания на несколько сантиметров погружен в почву, а верхний сочленяется с камерой посредством гидрозатвора. Если из почвы выделяются газы, они поступают не в атмосферу, а в камеру, при этом концентрация выходящего из почвы газа в камере будет расти. По кривой изменения

концентрации газа в камере можно рассчитать величину удельного потока.

Существует несколько количественных теорий, описывающих динамику концентрации газа в камере и позволяющих на основании этого рассчитывать удельный поток. В общем случае эти теории рассматривают нелинейную динамику, обусловленную тем, что скорость выхода газа из почвы будет тем меньше, чем больше его уже накопилось в камере (Hutchinson, Mosier, 1981; Орлов и соавт., 1987; Nakano et al., 2004; Kutzbach et al., 2007). Однако на практике для метана можно использовать линейное приближение, из которого для удельного потока (F) можно получить формулу:

$$F = \frac{2c_2 PMbV}{S(T + T_0)}, \quad (15)$$

где b ($\text{ppm} \cdot \text{ч}^{-1}$) – тангенс угла наклона прямой роста концентрации метана в камере в координатах время–концентрация; $c_2 = 0.12$ ($\text{мг} \cdot \text{моль} \cdot \text{К} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{Дж}^{-1} \cdot \text{ppm}^{-1}$); M ($\text{кг} \cdot \text{моль}^{-1}$) – молярная масса газа; P (Па) – давление в камере во время отбора проб (обычно принимается равным атмосферному давлению); S (м^2) – площадь основания камеры; T и T_0 (К) – конечная и начальная температуры в камере во время измерения; V (м^3) – объем камеры. Эта формула элементарным образом получается с использованием уравнения состояния идеального газа и применяется для расчета эмиссии различных газов, а не только CH_4 . Однако в работах разных исследователей, формула (15) может иметь несколько различных вид (Day et al., 2013; Yevdokimov et al., 2017; Berger et al., 2018; Erkkilä et al., 2018), в частности, обычно принимается упрощение, согласно которому температура в камере не меняется за время измерений, т.е. $T_0 = T$.

При измерении газообмена между почвой и атмосферой камерно-статический метод являлся наиболее часто используемым методом, вероятно, из-за его низкой стоимости и легкости применения. Он повсеместно применялся при измерениях эмиссии метана в лесных и болотных экосистемах, особенно там, где отсутствуют постоянные источники электроэнергии (Nakano et al., 2004). На протяжении последних 35 лет в таких экосистемах камерно-статическим методом выполнялась значительная часть измерений эмиссии CH_4 практически во всех регионах Земного шара: в Америке, Африке, Европе и Азии (Harriss et al., 1982; Tathy et al., 1992; Alm et al., 1999; Glagolev et al., 2012). Более того, данный метод используется для измерения газообмена с атмосферой не только лесных и болотных почв, но и почв рисовников, полигонов захоронения бытовых отходов (Cicerone, Shetter, 1981; Nozhevnikova et al., 2003; Sabrekov et al., 2013), а также измерения эмиссии метана из озер, грязевых микровулканов, метановых сипов и др.

(Banik et al., 1993; Etiope, 1999; Awasthi et al., 2005; Etiope, 2009; Belova et al., 2013; Campeau et al., 2014).

Как было отмечено выше, камера не обменивается воздухом с атмосферой. При этом существенное изменение концентрации газа в камере может сильно повлиять на условия его выделения (или поглощения) почвой, и результаты измерений удельных потоков будут искажаться. Чтобы избежать подобных артефактов, была разработана модификация (получившая название “динамического камерного метода”), в которой камера продувается воздухом в процессе измерений. Если в камеру все время достаточно интенсивно поступает атмосферный воздух, то концентрация метана не будет существенно изменяться, и система в течение всего периода измерения будет близка к естественным условиям *in situ*.

Если поток газа из почвы постоянен (а на больших интервалах времени это так), то в продуваемой воздухом камере достаточно быстро наступает стационарное состояние и справедливым оказывается следующее соотношение для вычисления удельного потока:

$$F \approx \frac{G(C - C_b)}{S}, \quad (16)$$

где C_b и C ($\text{мг} \cdot \text{м}^{-3}$) – концентрации CH_4 в потоке воздуха на входе в камеру и на выходе из нее соответственно; G ($\text{м}^3 \cdot \text{ч}^{-1}$) – скорость продувки.

Полуавтоматические и автоматические комплексы. Рутинные измерения камерами, осуществляемые вручную, стимулировали работы для автоматизации этого процесса. По-видимому, исторически первыми были попытки создания полуавтоматических камер, в которых автоматизации подверглась только какая-нибудь одна функция, а не весь процесс определения удельного потока. Например, в 1995 г. на Бакчарском болоте (Западная Сибирь, Томская обл.) была установлена полуавтоматическая камера, разработанная под руководством Иноэ (Inoue et al., 1997), в которой был автоматизирован процесс отбора проб, но не их анализ. В нерабочем состоянии камера висела примерно в полуметре над поверхностью болота в стороне от основания. По команде компьютера автоматическая подъемная система опускала камеру на основание в пазы гидрозатвора, после чего несколько мл воздуха из камеры отбирались последовательно через равные промежутки времени в три флакона. Затем камера опять поднималась для проветривания. Процедура опускания камеры, отбора трех проб и последующего проветривания автоматически выполнялась каждые два часа. В дальнейшем было необходимо все флаконы доставить в лабораторию и проанализировать концентрацию CH_4 в них, после чего по каждым трем последовательным концентрациям

можно было вычислить удельный поток (т.е. он измерялся каждые 2 ч, впрочем, камеру можно было перепрограммировать на любой другой интервал времени).

К полуавтоматическим комплексам мы отнесем и такую систему, в которой исследователь монтирует непосредственно в поле установку, состоящую из камеры (или нескольких камер) и газоанализатора. Подобные установки непрерывно отслеживают концентрации газов и накапливают данные в памяти в течение всего времени экспозиции (Nakano et al., 2004; Молчанов, 2017).

Существуют полностью автоматические системы, реализующие камерный метод измерения потока (см., например, Schütz et al., 1989; Marik et al., 2002; Butterbach-Bahl et al., 2004; Krasnov et al., 2015). Первая из цитированных работ, по-видимому, являлась одной из пионерских в области полностью автоматических реализаций камерного метода и была посвящена определению потока метана на рисовых полях (Schütz et al., 1989). В остальных работах описаны более современные системы, предназначенные для определения потока нескольких газов сразу – CO_2 , CH_4 , а в предпоследней еще и NO , NO_2 , N_2O .

“Распределенные” методы (микрометеорологические)

С середины XX века получили развитие так называемые микрометеорологические методы измерения эмиссии газов, принципиально отличающиеся от камерных методов. Главной идеей микрометеорологических методов является вычисление эмиссии интересующего газа по его концентрации в атмосфере (Aubinet et al., 2012). Микрометеорологические методы приобретали все большую популярность по мере осознания недостатков камерных методов, а именно изменения естественных условий при установке камеры и измерении эмиссии, возможности работы на пространственном масштабе до $\sim 1 \text{ м}^2$, проблематичности установки камеры в некоторых экосистемах (Baldocchi, 2003). К началу XXI в. они стали основным инструментом измерения эмиссии парниковых газов на масштабе $\sim 10^2 - 10^3 \text{ м}^2$ (Baldocchi, 2003; Aubinet et al., 2012; Бурба и соавт., 2016), т.е. на масштабе биогеоценоза. Главным общим достоинством всех микрометеорологических методов является то, что в отличие от камерных методов они позволяют получить репрезентативную и надежную оценку эмиссии даже для тех экосистем, выделение газа из которых неоднородно в пространстве и во времени, а также не воздействуют на почвенную систему при измерении.

Существует несколько микрометеорологических методов, каждый из которых имеет свои

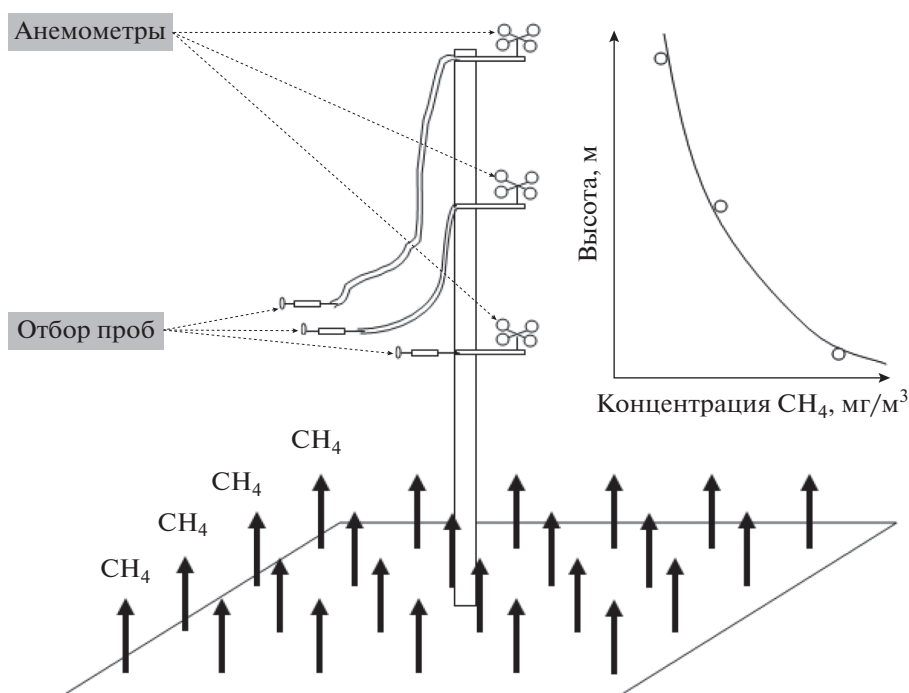


Рис. 2. Принцип измерений потока метана градиентным методом.

ограничения, преимущества и недостатки. Ниже кратко рассмотрены градиентный метод и метод турбулентных пульсаций, т.е. микрометеорологические методы, наиболее активно используемые в настоящее время. Также упомянуты микрометеорологические методы, которые применяются менее широко и/или продолжают развиваться. Применение микрометеорологических методов возможно для любых почвенных микробных систем, но их точность при этом ограничена развитостью турбулентности в атмосфере (при штиле точность падает многократно), сложностью рельефа, размерами интересующей экосистемы и величиной эмиссии из нее.

Градиентный метод. Этот метод основан на описании турбулентной диффузии в атмосфере по аналогии с молекулярной диффузией. Вертикальный турбулентный удельный поток инертной газовой примеси в атмосфере практически не изменяется с высотой в приземном слое (Baldocchi, 2003; Foken, Nappo, 2008). В силу этого для любой точки в пределах приземного слоя удельный поток газа можно записать как произведение коэффициента турбулентной диффузии на вертикальный градиент концентрации газа. Градиент оценивается по измерениям концентрации на двух и более высотах, а коэффициент турбулентной диффузии вычисляется по измерениям скорости ветра (рис. 2). Технические подробности градиентного метода представлены в других публикациях (Arya, 2001; Foken, Nappo, 2008).

Градиентный метод применим только в условиях развитой турбулентности, причем средняя вертикальная скорость ветра за период измерения должна быть близка к нулю. Типичный уровень погрешности градиентного метода составляет от 10–20% в условиях, близких к идеальным, и до 50% в экосистемах со сложным рельефом или при низких скоростях ветра (Baldocchi, 2003; Бурба и соавт., 2016). Типичным уровнем погрешности является величина в 20–30% (Foken, Nappo, 2008).

Метод турбулентных пульсаций (eddy covariance). В русскоязычной литературе также используются наименования “метод турбулентных ковариаций” и “метод микровихревых пульсаций”. Метод турбулентных пульсаций основан на высокочастотном (10–20 Гц) измерении вертикальной скорости ветра и концентрации газа на одной и той же высоте в приземном слое воздуха (рис. 3). Далее эти величины в каждый момент времени перемножаются и полученные произведения усредняются. В результате получают среднее значение удельного потока за тот отрезок времени, на котором производилось усреднение. Более подробные выкладки приведены в статье Бальдоччи (Baldocchi, 2003).

За последние два десятилетия разработаны алгоритмы работы метода турбулентных пульсаций, позволяющие применять его в неидеальных условиях. Так, для устранения ненулевого вертикального ветра применяются алгоритмы ротации координат.

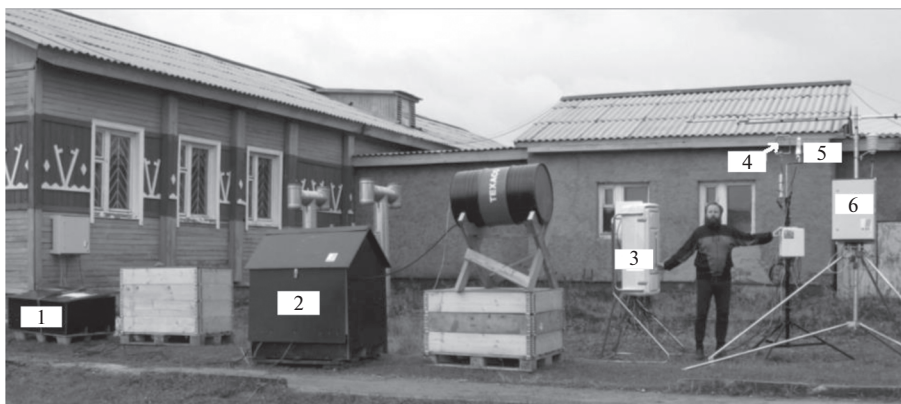


Рис. 3. Установка для измерений потоков тепла, паров воды и газов методом турбулентных пульсаций (Югорский госуниверситет, г. Ханты-Мансийск): 1 – аккумуляторный отсек; 2 – энергоустановка для обеспечения бесперебойного электропитания; 3 – блок управления и вывода данных; 4 – ультразвуковой анемометр; 5 – детектор анализатора концентрации газа; 6 – автоматическая метеостанция.

нат. Для работы в условиях нестационарности метеорологических полей применяются различные алгоритмы удаления тренда из наблюдений. Также разработаны поправки для различных частотных характеристик измерительных приборов, на флуктуации плотности воздуха, на нагревание приборов и т.д. Эти алгоритмы реализованы в виде как коммерческих, так и бесплатных программных продуктов, использование которых значительно упрощает расчеты и делает их широко доступными (Aubinet et al., 2012; Бурба и соавт., 2016). Крупные компании-производители поставляют адаптированный под метод турбулентных пульсаций готовый комплекс оборудования с такими программными продуктами. Существует также вариант метода турбулентных пульсаций, при котором газоанализатор и ультразвуковой анемометр устанавливаются на самолете или вертолете, что позволяет сильно увеличить пространственный охват исследования (Kohnert et al., 2018).

Принципиальным условием для успешной работы метода турбулентных пульсаций также является наличие развитой турбулентности. Те данные, которые получены при неразвитой турбулентности, отбрасываются, а для заполнения образовавшихся пропусков применяются различные алгоритмы: регрессия по метеорологическим параметрам, интерполяция, замена на среднее значение, расчет с помощью процессно-ориентированных моделей и нейронных сетей (Aubinet et al., 2012). Наличие вертикальной конвекции (например, над лесами или в ночное время) также приводит к некорректным величинам удельного потока. Для устранения этой проблемы необходимо проводить дополнительные измерения вертикального профиля концентрации газа (Baldocchi, 2003; Aubinet et al., 2012).

Сравнение метода турбулентных пульсаций с градиентным методом и краткий обзор других мето-

дов. Преимуществом метода турбулентных пульсаций является то, что это наиболее прямой метод измерения удельного потока, обладающий наименьшим количеством ограничений применимости. Недостатками метода являются высокая стоимость оборудования и большие издержки при организации его энергообеспечения и охраны (Baldocchi, 2003; Бурба и соавт., 2016).

Преимущество градиентного метода заключается в том, что с его помощью можно вести измерения удельного потока тех газов, для которых не существует приборов, способных измерять концентрацию с высокой частотой, что необходимо для метода турбулентных пульсаций. Его применение дешевле метода турбулентных пульсаций в 3–5 раз (Foken, Nappo, 2008). Основным недостатком градиентного метода является невозможность его использования в экосистемах, где удельный поток газа с поверхности неоднороден. Поскольку концентрация на разных высотах формируется разными участками экосистемы (чем больше высота, тем больше площадь, которая влияет на динамику концентрации на этой высоте), пространственная неоднородность удельного потока приводит к искажению градиента, и, как следствие, величины удельного потока. И градиентный метод, и метод турбулентных пульсаций некорректно работают при значимой вертикальной конвекции, которая обычно имеет место при существенных неровностях подстилающей поверхности, например, над лесами (Foken, Nappo, 2008), а также при слаборазвитой турбулентности (Aubinet et al., 2012).

Метод турбулентных пульсаций в настоящий момент является общепринятым стандартом измерения удельного потока газов из почв на масштабе экосистем (Baldocchi, 2014). Он широко используется для измерения эмиссии метана в различных экосистемах (Savi et al., 2016; Erkkilä et al., 2018; Deventer et al., 2019). Остальные микроме-

теорологические методы используются в ситуациях, когда реализация метода турбулентных пульсаций затруднена из-за небольшой площади экосистемы, слабых ветров, сложного рельефа, точечного характера источников, высокого отношения шума показаний газоанализатора к полезному сигналу, низкой (<10 Гц) частоты измерения газоанализатора и т.д. (Бурба и соавт., 2016). Среди них, помимо описанного выше градиентного метода, следует отметить метод накопления микровихрей (*relaxed eddy accumulation method*). Этот метод основан на отборе газа с постоянной скоростью в разные емкости при восходящих и нисходящих потоках воздуха. Для его реализации необходим ультразвуковой анемометр, интегрированный с системой отбора газа, закачивающей пробы в разные емкости в зависимости от направления потока воздуха, а также газоанализатор для измерения концентрации газа. Удельный поток j вычисляется следующим образом:

$$j = b\sigma_w(\overline{c_{up}} - \overline{c_{down}}), \quad (17)$$

где b – безразмерный эмпирический параметр, зависящий от свойств турбулентности, σ_w – стандартное отклонение вертикальной скорости ветра для текущего периода измерений (обычно его длительность – 30 мин), а в скобках – разница средних концентраций газа в восходящих и нисходящих потоках воздуха соответственно (Ueyama et al., 2013). Основным преимуществом метода по сравнению с методом турбулентных пульсаций является отсутствие необходимости в газоанализаторе с высокой частотой измерений и проведении многочисленных корректирующих расчетов (Ueyama et al., 2013). Благодаря этому методом накопления микровихрей можно измерять удельные потоки сравнительно малой величины, для которых отношение шума показаний газоанализатора к полезному сигналу в методе турбулентных пульсаций оказывается слишком высоким (Ueyama et al., 2018). К недостаткам метода, объясняющим его редкое использование, относится инженерная сложность конструирования системы отбора газа в зависимости от направления вертикального потока воздуха, а также необходимость дополнительных измерений для учета вертикальной конвекции.

Среди перспективных методов, которые еще не применялись для измерения эмиссии метана ввиду своей новизны, но теоретически пригодны для таких измерений, выделим метод обновления поверхности (*surface renewal method*). Этот метод основан на высокочастотном (≥ 10 Гц) измерении концентрации газа. Удельный поток вычисляется на временном промежутке 5–30 мин посредством определения характеристик пиков (длины, высоты и т.д.) на графике зависимости концентрации от времени с использованием эмпирических па-

раметров, зависящих от характеристик турбулентности (Castellví, 2018; Hu et al., 2019; Suvočarev et al., 2019). Основным преимуществом этого метода является его применимость при слабо развитой турбулентности в отсутствие ветра и, как следствие, в экосистемах небольшой площади (Castellví, 2018). К недостаткам метода относится сложность проводимых вычислений и высокая стоимость газоанализатора с требуемыми характеристиками.

Уникальным инструментом определения эмиссии газов, который применяется на всех пространственных масштабах (от масштаба биогеоценоза до глобального) является метод обратной задачи (*inverse modelling method*). Этот метод основан на той же идее, что и все микрометеорологические методы, а именно на определении величины эмиссии по концентрации газа в атмосфере. Однако, в отличие от рассмотренных выше микрометеорологических методов, метод обратной задачи предполагает рассмотрение всей совокупности процессов переноса и трансформации газа в атмосфере при минимальных допущениях или упрощениях. Такая общая постановка задачи позволяет использовать метод обратной задачи в тех ситуациях, когда прочие микрометеорологические не могут быть применены из-за своих ограничений. Для разных задач и объектов разработаны специальные вариации этого метода. В рамках настоящего обзора эти вариации не могут быть досконально описаны, поэтому лишь перечислим несколько сфер, где метод обратной задачи успешно применяется. Это глобальные и региональные инвентаризации эмиссии метана (Bergamaschi et al., 2007; Kim et al., 2011; Ware et al., 2019), измерение эмиссии из полигонов ТБО (Foster-Wittig et al., 2015; Терентьева и соавт., 2017; Mønster et al., 2019) и животноводческих ферм (Flesch et al., 2004; McGinn, Flesch, 2018; Prajapati, Santos, 2018) и ряд других областей: определение эмиссии из угольных шахт, газопроводов и даже района проведения пивного фестиваля Октоберфест (Chen et al., 2020). Основные принципы и обзор существующих вариаций метода обратной задачи заинтересованный читатель может найти в (Haas-Laursen et al., 1996; Глаголев, 2010; Mønster et al., 2019). Основным преимуществом метода обратной задачи является его универсальность, то есть применимость к самым разнообразным объектам при различных конфигурациях имеющегося оборудования. Недостатки этого метода в сложности используемых математических алгоритмов и высокой стоимости оборудования, необходимого для реализации метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методы измерения продукции и эмиссии метана в почвенных экосистемах харак-

Таблица 2. Сравнение методов измерения продукции и эмиссии метана в отношении их применимости в различных экосистемах

Метод	Преимущества	Недостатки и ограничения	Пространственный масштаб для применения
Определение продукции метана			
Определение потенциальной продукции “ <i>in vitro</i> ”	Возможность работы <i>in vitro</i> , контролируемые условия	Низкий коэффициент подобия к природной обстановке	5–10 см ²
Полевая модификация послонно-балансового метода (DSC-technique)	Определение актуальной продукции непосредственно в природных условиях	Базовый вариант метода не работает при наличии конвективного транспорта газа из почвы	~50–1000 см ²
Почвенно-градиентный метод		Если профиль концентраций не является стационарным или перенос CH ₄ происходит не только диффузионным путем, то будет возникать существенная погрешность	*
Статический камерный метод с ингибированием	Простота и экономичность отдельного измерения	Существенное изменение концентрации газа в камере может влиять на его выделение (или поглощение); еще более сильное изменение естественных условий происходит при установке камеры	0.01–1 м ²
Динамический камерный метод с ингибированием	Концентрация метана в камере близка к естественным природным условиям	Необходимость постоянной подачи в камеру газа-ингибитора метанотрофии приводит к существенному удорожанию метода	~1 м ²
Определение эмиссии			
Статический камерный метод	Простота и экономичность отдельного измерения	См. выше “Статический камерный метод с ингибированием”	0.01–1 м ²
Динамический камерный метод	Концентрация метана в камере близка к природным условиям	Сложность установки камеры в некоторых экосистемах	~1 м ²
Градиентный метод	Нет воздействия на почвенную систему, т.е. измерения проводятся в естественных условиях	Метод неприменим в экосистемах с большой пространственной неоднородностью эмиссии	10 ² –10 ³ м ²
Метод турбулентных пульсаций		Наличие вертикальной конвекции	10 ² –10 ³ м ²

* С теоретической точки зрения измерения проводятся в точке. Трудно сказать, насколько далеко в реальной почве могут быть экстраполированы результаты этих измерений от данной точки. Часто исследователи переносят полученные результаты на весь биогеоценоз. Например, если в точке, расположенной в ряме, получено некоторое значение, то оно приписывается вообще всему ряму (площадь которого может составлять, скажем, сотни кв. метров). Очевидно, что это совершенно неверно, хотя бы потому, что для разных элементов микрорельефа (повышений и понижений), расположенных на расстояниях порядка 1 м, могут быть характерны разные значения из-за различных гидротермических условий. Таким образом, необходимо в каждом биогеоценозе проводить многократные измерения в точках, расположенных друг от друга на различных расстояниях. Только благодаря этим многократным измерениям может стать ясно, до какой степени возможно экстраполировать результаты отдельных измерений.

теризуются разнообразием лежащих в их основе физических и физико-химических принципов, а также технических решений, каждое из которых имеет свои преимущества и недостатки (табл. 2). Целесообразность применения того или иного метода определяется поставленной задачей и свойствами метангенерирующей почвенной системы. Широко распространенный метод инкубации образцов почвы для определения продукции метана в лабораторных условиях позволяет оценить метаногенный потенциал микробного сообщества в строго контролируемых условиях. Изменяя условия лабораторных экспериментов можно получить результаты для последующего моделирования процесса метаногенеза. Однако результаты измерений в лабораторных условиях могут быть лишь условно экстраполированы на природную экосистему. Использование мезокосмов позволяет получить метангенерирующую систему в состоянии, максимально приближенном к условиям *in situ* при минимальном воздействии на структуру образца. Методы определения эмиссии метана потенциально могли бы применяться для определения продукции метана. Тем не менее, в реальных условиях практически невозможно исключить вклад процесса микробного окисления метана, кроме случая с использованием ингибиторов метанотрофии при измерении камерным методом.

Методы оценки эмиссии метана из экосистем различаются в зависимости от того, какую площадь они охватывают при измерении: камерные методы работают на масштабе $\sim 1 \text{ м}^2$, микрометеорологические методы способны оценить удельный поток с сотен и тысяч м^2 . Поэтому локальную эмиссию/поглощение метана изучают с помощью камерных методов, а оценку удельного потока в масштабе биогеоценоза проводят с использованием микрометеорологических методов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят искреннюю благодарность С.Ю. Мочёнову и А.В. Смагину, соответственно, за обсуждение классификации методов и необходимости учета пористости в формулах, а также А.А. Лебедеву за частичное техническое редактирование рукописи. Мы также выражаем признательность С.Н. Дедыш (ФИЦ Биотехнологии РАН) за критический анализ и важные рекомендации при подготовке рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была профинансирована в рамках выполнения проекта РФФИ 18-45-860015 р_а и частично – по теме госзадания АААА-А15-115122810146-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арсенин В.Я.* Методы математической физики и специальные функции. М.: Наука, 1984. 384 с.
- Березин И.С., Жидков Н.П.* Методы вычислений. Т. 1. М.: Наука, 1966. 632 с.
- Бурба Г.Г., Курбатова Ю.А., Куричева О.А., Авилон В.К., Мамкин В.В.* Метод турбулентных пульсаций. Краткое практическое руководство. М.: ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, 2016. 223 с.
- Вазов В., Форсайт Дж.* Разностные методы решения дифференциальных уравнений в частных производных. М.: Изд-во ИЛ, 1963. 486 с.
- Глаголев М.В.* К методу “обратной задачи” для определения поверхностной плотности потока газа из почвы // Динамика окружающей среды и глобальные изменения климата. 2010. Т. 1. № 1. С. 17–36.
- Глаголев М.В., Голышев С.А., Фирсов С.Ю.* Оценка переноса метана из почвы в атмосферу болотными растениями // Болота и заболоченные леса в свете задач устойчивого природопользования. Материалы конференции. / Ред. Вомперский С.Э., Сиринов А.А. М.: ГЕОС, 1999. С. 177–180.
- Глаголев М.В., Сабреков А.Ф.* О диссертации Н.А. Шнырева: II. Главные замечания // Динамика окружающей среды и глобальные изменения климата. 2016. Т. 7. № 2. С. 38–55.
- Гюнтер Э., Кемпфе Л., Либберт Э., Мюллер Х., Пенцилин Х.* Основы общей биологии. М.: Мир, 1982. 440 с.
- Заварзин Г.А.* Психрофильный цикл Зенгена // Экологическая химия. 1995. Т. 4. С. 3–12.
- Каллистова А.Ю., Глаголев М.В., Шнырев Н.А., Кевбрина М.В., Некрасова В.К., Чистотин М.В., Фаустова Е.В., Серебряная М.И., Ножевникова А.Н.* Эмиссия метана с поверхности полигона захоронения твердых бытовых отходов (ТБО) в зависимости от возраста полигона и от сезона // Экологическая химия. 2006. Т. 15. С. 13–21.
- Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Пименов Н.В.* Образование и окисление метана проکاریотами // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 661–683.
- Kallistova A. Yu., Merkel A. Yu., Tarnovetskii I. Yu., Pimenov N. V.* Methane formation and oxidation by prokaryotes // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 671–691.
- Каспаров С.В., Минько О.И., Аммосова Я.М., Ермакова С.О.* Газы анаэробного происхождения в затопленных почвах // Биологические науки. 1986. № 4. С. 99–103.
- Кондратьев К.Я., Крапивин В.Ф., Савиных В.П.* Перспективы развития цивилизации: многомерный анализ. М.: Логос, 2003. 576 с.
- Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М.* Теоретическая физика. Т. VI. Гидродинамика. М.: Наука, 1988. 736 с.

- Мацевитый Ю.М., Лушпенко С.Ф. Идентификация теплофизических свойств твердых тел. Киев: Наук. думка, 1990. 216 с.
- Минько О.И. Планетарная газовая функция почвенного покрова // Почвоведение. 1988. № 7. С. 59–75.
- Минько О.И., Каспаров С.В., Аммосова Я.М. Газообразные вещества – продукты метаболизма микробных ценозов переувлажненных почв // Журн. общей биологии. 1987. Т. 48. С. 182–193.
- Молчанов А.Г. Газообмен диоксида углерода с поверхности сфагнума в заболоченном сосняке южной тайги // Динамика окружающей среды и глобальные изменения климата. 2017. Т. 8. С. 43–54.
- Novikov V.V., Ruskov A.V. Release and absorption of greenhouse gases in ameliorated peat soils of the Rostov lowland // Euras. Soil Sci. 2005. V. 38. P. 745–751.
- Одум Ю. Экология. Т. 1. М.: Мир, 1986. 328 с.
- Орлов Д.С., Минько О.И., Аммосова Я.М., Каспаров С.В., Глаголев М.В. Современные физические и химические методы исследования почв. М.: Изд-во МГУ, 1987. 203 с.
- Пантелеев А.В., Кудрявцева И.А. Численные методы. Практикум. М.: ИНФРА-М, 2017. 512 с.
- Самарский А.А. Теория разностных схем. М.: Наука, 1983. 616 с.
- Терентьева И.Е., Сабреков А.Ф., Глаголев М.В., Коцюрбенко О.Р. Эмиссия метана из полигонов захоронения твердых бытовых отходов // Метеорология и гидрология. 2017. № 5. С. 80–90.
- Terentieva I.E., Sabrekov A.F., Glagolev M.V., Kotsyurbenko O.R. Methane emission from municipal solid waste landfills // Russ. Meteorol. Hydrol. 2017. V. 42. P. 327–334.
- Федоров В.Д., Гильманов Т.Г. Экология. М.: Изд-во МГУ, 1980. 464 с.
- Филиппов Л.П. Явления переноса. М.: Изд-во МГУ, 1986. 120 с.
- Шнырев Н.А. Режимные наблюдения и оценка газообмена на границе почвы и атмосферы (на примере потоков метана болотного стационара средне-таежной зоны Западной Сибири “Мухрино”). Дис. ... канд. биол. наук. М.: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ), 2016.
- Alm J., Saarnio S., Nykänen H., Silvola J., Martikainen P.J. Winter CO₂, CH₄ and N₂O fluxes on some natural and drained boreal peatlands // Biogeochemistry. 1999. V. 44. P. 163–186.
- Alperin M.J., Reeburg W.S., Whiticar M.J. Carbon and hydrogen isotope fractionation resulting from anaerobic methane oxidation // Glob. Biogeochem. Cycles. 1988. V. 2. P. 279–288.
- Aronson E.L., Vann D.R., Helliker B.R. Methane flux response to nitrogen amendment in an upland pine forest soil and riparian zone // J. Geophys. Res. 2012. V. 117. G03012.
- Arya P.S. Introduction to Micrometeorology. N.Y.: Academic press, 2001. 447 p.
- Aubinet M., Vesala T., Papale D. Eddy Covariance: a Practical Guide to Measurement and Data Analysis. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012. 438 p.
- Awasthi K.D., Sitaula B.K., Singh B.R., Bajracharya R.M. Fluxes of methane and carbon dioxide from soil under forest, grazing land, irrigated rice and rainfed field crops in a watershed of Nepal // Biol. Fertil. Soils. 2005. V. 41. P. 163–172.
- Baldocchi D.D. Assessing the eddy covariance technique for evaluating carbon dioxide exchange rates of ecosystems: past, present and future // Glob. Change Biol. 2003. V. 9. P. 479–492.
- Baldocchi D. Measuring fluxes of trace gases and energy between ecosystems and the atmosphere – the state and future of the eddy covariance method // Glob. Change Biol. 2014. V. 20. P. 3600–3609.
- Banik A., Sen M., Sen S.P. Methane emission from jute-retting tanks // Ecol. Engin. 1993. V. 2. P. 73–79.
- Bartlett K.B., Crill P.M., Bonassi J.A., Richey J.E., Harriss R.C. Methane flux from the Amazon river floodplain: emissions during rising water // J. Geophys. Res. 1990. V. 95. P. 16773–16788.
- Belova S.E., Oshkin I.Yu., Glagolev M.V., Lapshina E.D., Maksyutov Sh.Sh., Dedysh S.N. Methanotrophic bacteria in cold seeps of the floodplains of Northern rivers // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 743–750.
- Bergamaschi P., Frankenberg C., Meirink J.F., Krol M., Dentener F., Wagner T., Platt U., Kaplan J.O., Körner S., Heilmann M., Dlugokencky E.J., Goede A. Satellite cartography of atmospheric methane from SCIAMACHY on board ENVISAT: 2. Evaluation based on inverse model simulations // J. Geophys. Res. 2007. V. 112. D02304. P. 1–26.
- Berger S., Praetzel L.S.E., Goebel M., Blodau C., Knorr K.-H. Differential response of carbon cycling to long-term nutrient input and altered hydrological conditions in a continental Canadian peatland // Biogeosciences. 2018. V. 15. P. 885–903.
- Bižić-Ionescu M., Ionescu D., Günthel M., Tang K.W., Grosart H.-P. Oxidic methane cycling: New evidence for methane formation in oxic lake water // Biogenesis of Hydrocarbons. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Eds. Stams A., Sousa D. Cham: Springer, 2018. P. 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53114-4_10-1
- Blodau C., Basiliko N., Moore T.R. Carbon turnover in peatland mesocosms exposed to different water table levels // Biogeochemistry. 2004. V. 67. P. 331–351.
- Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jørgensen B.B., Witte U., Pfannkuche O. Microscopic identification of a microbial consortium apparently mediating anaerobic methane oxidation above marine gas hydrate // Nature. 2000. V. 407. P. 623–626.
- Bridgman S.D., Cadillo-Quiroz H., Keller J.K., Zhuang Q. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales // Glob. Change Biol. 2013. V. 19. P. 1325–1346.
- Butterbach-Bahl K., Kock M., Willibald G., Hewett B., Buchhagiar S., Papen H., Kiese R. Temporal variations of fluxes of NO, NO₂, N₂O, CO₂, and CH₄ in a tropical rain forest ecosystem // Global Biogeochem. Cycles. 2004. V. 18. P. 1–11.
- Campeau A., Lapierre J.F., Vachon D., del Giorgio P.A. Regional contribution of CO₂ and CH₄ fluxes from the fluvial network in a lowland boreal landscape of Quebec // Global Biogeochem. Cycles. 2014. V. 28. P. 57–69.
- Castellví F. An advanced method based on surface renewal theory to estimate the friction velocity and the surface heat flux // Water Resour. Res. 2018. V. 54. P. 10134–10154.

- Chan A.S.K., Parkin T.B.* Evaluation of potential inhibitors of methanogenesis and methane oxidation in a landfill cover soil // *Soil Biol. Biochem.* 2000. V. 32. P. 1581–1590.
- Chen J., Dietrich F., Maazallahi H., Forstmaier A., Winkler D., Hofmann M.E., van der Gon H.D., Röckmann T.* Methane emissions from the Munich Oktoberfest // *Atmospheric Chemistry & Physics.* 2020. V. 20. P. 3683–3696.
- Chin K.-J., Conrad R.* Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1995. V. 18. P. 85–102. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00166.x>
- Christiansen J.R., Vesterdal L., Gundersen P.* Nitrous oxide and methane exchange in two small temperate forest catchments – effects of hydrological gradients and implications for global warming potentials of forest soils // *Biogeochemistry.* 2012. V. 107. P. 437–454.
- Cicerone R.J., Shetter J.D.* Sources of atmospheric methane: Measurements in rice paddies and a discussion // *J. Geophys. Res.* 1981. V. 86. C8. P. 7203–7209.
- Conrad R.* Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal // *Org. Geochem.* 2005. V. 36. P. 739–752. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.09.006>
- Conrad R., Klose M.* Anaerobic conversion of carbon dioxide to methane, acetate and propionate on washed rice roots // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1999. V. 30. P. 147–155.
- Conrad R., Klose M.* Selective inhibition of reactions involved in methanogenesis and fatty acid production on rice roots // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000. V. 34. P. 27–34.
- Conrad R., Mayer H.-P., Wüst M.* Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil // *FEMS Microbiol. Lett.* 1989. V. 62. P. 265–273. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03701.x>
- Conrad R., Noll M., Claus P., Klose M., Bastos W.R., Enrich-Prast A.* Stable carbon isotope discrimination and microbiology of methane formation in tropical anoxic lake sediments // *Biogeosciences.* 2011. V. 8. P. 795–814. <https://doi.org/10.5194/bg-8-795-2011>
- Day S., Dell'Amico M., Etheridge D., Ong C., Rodger A., Sherman B., Barrett D.J.* Characterisation of Regional Fluxes of Methane in the Surat Basin. Queensland: CSIRO, 2013.
- Deventer M.J., Griffis T.J., Roman D.T., Kolka R.K., Wood J.D., Erickson M., Baker J.M., Millet D.B.* Error characterization of methane fluxes and budgets derived from a long-term comparison of open-and closed-path eddy covariance systems // *Agric. Forest Meteorol.* 2019. V. 278. P. 107638.
- Ehhalt D.H., Schmidt U.* Sources and sinks of atmospheric methane // *Pageoph.* 1978. V. 116. P. 452–464.
- Eller G., Kanel L., Kruger M.* Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of Lake Plußsee // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 8925–8928.
- Erkkilä K.-M., Ojala A., Bastviken D., Biermann T., Heiskanen J.J., Lindroth A., Peltola O., Rantakari M., Vesala T., Mammarella I.* Methane and carbon dioxide fluxes over a lake: comparison between eddy covariance, floating chambers and boundary layer method // *Biogeosciences.* 2018. V. 15. P. 429–445.
- Etiop G.* Subsoil CO₂ and CH₄ and their advective transfer from faulted grassland to the atmosphere // *Journal of Geophysical Research.* 1999. V. 104. № D14. P. 16889–16894.
- Etiop G.* Natural emissions of methane from geological seepage in Europe // *Atmospheric Environment.* 2009. V. 43. № 7. P. 1430–1443.
- Flesch T.K., Wilson J.D., Harper L.A., Crenna B.P., Sharpe R.R.* Deducing ground-to-air emissions from observed trace gas concentrations: a field trial // *J. Appl. Meteorol.* 2004. V. 43. P. 487–502.
- Foken T., Nappo C.J.* *Micrometeorology.* Berlin: Springer Science & Business Media, 2008. 306 p.
- Foster-Wittig T.A., Thoma E.D., Green R.B., Hater G.R., Swan N.D., Chanton J.P.* Development of a mobile tracer correlation method for assessment of air emissions from landfills and other area sources // *Atmosph. Environ.* 2015. V. 102. P. 323–330.
- Galand P.E., Yrjölä K., Conrad R.* Stable carbon isotope fractionation during methanogenesis in three boreal peatland ecosystems // *Biogeosciences.* 2010. V. 7. P. 3893–3900. <https://doi.org/10.5194/bg-7-3893-2010>
- Ganzert L., Jurgens G., Münster U., Wagmer D.* Methanogenic communities in permafrost affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprint // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. V. 59. P. 476–488.
- Glagolev M.V.* Modeling of production, oxidation and transportation processes of methane // *Global Environment Research Fund: Eco-Frontier Fellowship (EFF) in 1997.* Tokyo: Environment Agency. Global Environment Department. Research & Information Office, 1998. P. 79–111.
- Glagolev M.V., Ilyasov D.V., Terentjeva I.E., Sabrekov A.F., Mochenov S.Yu., Maksutov S.S.* Methane and carbon dioxide fluxes in the waterlogged forests of south and middle taiga of Western Siberia // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 2018. V. 138. 012005. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/138/1/012005>
- Glagolev M.V., Sabrekov A.F.* Reply to A.V. Smagin: V. What is wrong with an “abiotic paper” and do we always need to take into account the abiotic gas absorption by soil? // *Environmental Dynamics and Global Climate Change.* 2019. V. 10. P. 48–63. <https://doi.org/10.17816/edgcc16144>
- Glagolev M.V., Sabrekov A.F., Kleptsova I.E., Filippov I.V., Lapshina E.D., Machida T., Maksyutov Sh.Sh.* Methane emission from bogs in the subtaiga of Western Siberia: The development of standard model // *Euras. Soil Sci.* 2012. V. 45. P. 947–957.
- Goldsmith C.D., Chanton J., Abichou T., Swan N., Green R., Hater G.* Methane emissions from 20 landfills across the United States using vertical radial plume mapping // *J. Air & Waste Manag. Assoc.* 2012. V. 62. P. 183–197.
- Grossart H.-P., Frindte K., Dziallas C., Eckert W., Tang K.W.* Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 19657–19661. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110716108>
- Haas-Laursen D.E., Harley D.E., Prinn R.C.* Optimizing an inverse method to deduce time-varying emissions of trace gases // *J. Geophys. Res.* 1996. V. 101. D17. P. 22823–22831.

- Harriss R.C., Sebacher D.I., Day F.P. Methane flux in the Great Dismal Swamp // *Nature*. 1982. V. 297. P. 673–674.
- Hu Y., Buttar N.A., Tanny J., Snyder R.L., Savage M.J., Lakhari I.A. Surface renewal application for estimating evapotranspiration: a review // *Adv. Meteorol.* 2018. V. 2018. P. 1690714.
<https://doi.org/10.1155/2018/1690714>
- Hutchinson G.L., Mosier A.R. Improved soil cover method for field measurement of nitrous oxide fluxes // *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 1981. V. 45. P. 311–316.
- Inoue G., Takahashi Y., Maksyutov S., Sorokin M., Panikov N. Methane emission rate from the wetland in West Siberia and its controlling factors // *Proc. Fifth Symp. on the Joint Siberian Permafrost Studies between Japan and Russia in 1996*. Tsukuba: Isebu, 1997. P. 34–39.
- Kamat S.S., Williams H.J., Dangott L.J., Chakrabarti M., Raushel F.M. The catalytic mechanism for aerobic formation of methane by bacteria // *Nature*. 2013. V. 497. P. 132–136.
- Kelley C.A., Chynoweth D.P. Comparison of *in situ* and *in vitro* rates of methane release in freshwater sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 1980. V. 40. P. 287–293.
- Kim H.S., Maksyutov S., Glagolev M.V., Machida T., Patra P.K., Sudo K., Inoue G. Evaluation of methane emissions from West Siberian wetlands based on inverse modeling // *Environ. Res. Lett.* 2011. V. 6. P. 035201.
- King G.M., Berman T., Wiebe W.J. Methane formation in the acidic peats of Okefenokee swamp, Georgia // *Amer. Midland Naturalist*. 1981. V. 105. P. 386–389.
- Kobabe S., Wagner D., Pfeiffer E.M. Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence *in situ* hybridization // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004. V. 50. P. 13–23.
- Kohnert K., Juhls B., Muster S., Antonova S., Serafimovich A., Metzger S., Hartmann J., Sachs T. Toward understanding the contribution of waterbodies to the methane emissions of a permafrost landscape on a regional scale – A case study from the Mackenzie Delta, Canada // *Glob. Change Biol.* 2018. V. 24. P. 3976–3989.
- Kotsyurbenko O.R., Glagolev M.V. Protocols for measuring methanogenesis // *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols (Springer Protocols Handbooks)* / Eds. McGeSney T.J., Timmis K.N., Nogales B. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2015.
https://doi.org/10.1007/8623_2015_89
- Kotsyurbenko O.R., Glagolev M.V., Sabrekov A.F., Terentjeva I.E. Systems approach to the study of microbial methanogenesis in West-Siberian wetlands // *Environmental Dynamics and Global Climate Change*. 2020. V. 11. P. 1–19.
- Krasnov O.A., Maksyutov S.S., Davydov D.K., Fofonov A.V., Glagolev M.V. Measurements of methane and carbon dioxide fluxes on the Bakchar bog in warm season // *Proc. SPIE*. 2015. V. 9680. P. 968066–968070.
- Kutzbach L., Schneider J., Sachs T., Giebels M., Nykänen H., Shurpali N.J., Martikainen P.J., Alm J., Wilmking M. CO₂ flux determination by closed-chamber methods can be seriously biased by inappropriate application of linear regression // *Biogeosciences*. 2007. V. 4. P. 1005–1025.
- Lohila A., Aalto T., Aurela M., Hatakka J., Tuovinen J.P., Kilkki J., Penttilä T., Vuorenmaa J., Hänninen P., Sutinen R., Viisanen Y., Laurila T. Large contribution of boreal upland forest soils to a catchment-scale CH₄ balance in a wet year // *Geophys. Res. Lett.* 2016. V. 43. P. 2946–2953.
- Mah R.A., Ward D.M., Baresi L., Glass T.L. Biogenesis of methane // *Annu. Rev. Microbiol.* 1977. V. 31. P. 309–341.
- Marik T., Fischer H., Conen F., Smith K. Seasonal variations in stable carbon and hydrogen isotope ratios in methane from rice fields // *Global Biogeochem. Cycles*. 2002. V. 16. P. 41–1–41–11.
- McGinn S.M., Flesch T.K. Ammonia and greenhouse gas emissions at beef cattle feedlots in Alberta Canada // *Agric. Forest Meteorol.* 2018. V. 258. P. 43–49.
- Mochenov S.Yu., Churkina A.I., Sabrekov S.F., Glagolev M.V., Il'yasov D.V., Terentjeva I.E., Maksyutov S.S. Soils in seasonally flooded forests as methane sources: A case study of West Siberian South taiga // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2018. V. 138. 012012.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/138/1/012012>
- Monster J., Kjeldsen P., Scheutz C. Methodologies for measuring fugitive methane emissions from landfills – a review // *Waste Manag.* 2019. V. 87. P. 835–859.
- Moran J.J., House C.H., Freeman K.H., Ferry J.G. Trace methane oxidation studied in several *Euryarchaeota* under diverse conditions // *Archaea*. 2005. V. 1. P. 303–309.
- Nakano T., Sawamoto T., Morishita T., Inoue G., Hatano R. A comparison of regression methods for estimating soil-atmosphere diffusion gas fluxes by a closed-chamber technique // *Soil Biol. Biochem.* 2004. V. 36. P. 107–113.
- Nozhevnikova A., Glagolev M., Nekrasova V., Einola J., Sormunen K., Rintala J. The analysis of methods for measurement of methane oxidation in landfills // *Water Sci. Technol.* 2003. V. 48. P. 45–52.
- Nozhevnikova A.N., Ljshitz A.B., Lebedev V.S., Zavarzin G.A. Emission of methane into the atmosphere from landfills in the former USSR // *Chemosphere*. 1993. V. 26. P. 401–417.
- Orphan V.J., House C.H., Hinrichs K.-U., McKeegan K.D., DeLong E.F. Methane-consuming Archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic Analysis // *Science*. 2001. V. 293. P. 484–487.
- 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.
- Panikov N.S., Dedysh S.N., Kolesnikov O.M., Mardini A.I., Sizova M.V. Metabolic and environmental control on methane emission from soils: mechanistic studies of mesotrophic fen in West Siberia // *Water Air Soil Pollut. Focus*. 2001. V. 1. P. 415–428.
- Prajapati P., Santos E.A. Comparing methane emissions estimated using a backward-Lagrangian stochastic model and the eddy covariance technique in a beef cattle feedlot // *Agric. Forest Meteorol.* 2018. V. 256. P. 482–491.
- Raghoebarsing A.A., Pol A., van de Pas-Schoonen K.T., Smolders A.J., Ettwig K.F., Rijpstra W.I., Schouten S., Damsté J.S., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Strous M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification // *Nature*. 2006. V. 440. P. 918–921.
- Repeta D.J., Ferrón S., Sosa O.A., Johnson C.G., Repeta L.D., Acker M., DeLong E.F., Karl D.M. Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter // *Nature Geosci.* 2016. V. 9. P. 884–887.

- Sabrekov A.F., Glagolev M.V., Kleptsova I.E., Machida T., Maksyutov S.S.* Methane emission from bog complexes of the West Siberian taiga // *Euras. Soil Sci.* 2013. V. 46. P. 1182–1193.
- Savi F., Di Bene C., Canfora L., Mondini C., Fares S.* Environmental and biological controls on CH₄ exchange over an evergreen Mediterranean forest // *Agric. Forest Meteorol.* 2016. V. 226. P. 67–79.
https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.05.014
- Schütz H., Holzapfel-Pschorn A., Conrad R., Rennenberg H., Seiler W.* A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy // *J. Geophys. Res.* 1989. V. 94. D3. P. 16405–16416.
- Sebacher D.I., Harriss R.C., Bartlett K.B.* Methane emissions to the atmosphere through aquatic plants // *J. Environ. Qual.* 1985. V. 14. P. 40–46.
- Shih T.M.* Numerical Heat Transfer. N.Y.: CRC Press, 1984. 563 p.
- Suvočarev K., Castellví F., Reba M.L., Runkle B.R.K.* Surface renewal measurements of H, λE and CO₂ fluxes over two different agricultural systems // *Agric. Forest Meteorol.* 2019. V. 279. P. 107763.
- Tathy J.P., Cros B., Delmas R.A., Marengo A., Servant J., Labat M.* Methane emission from flooded forest in Central Africa // *J. Geophys. Res.* 1992. V. 97. D6. P. 6159–6168.
- Torres-Alvarado R., Ramirez-Vives F., Fernandez F.J., Barriaga-Sosa I.* Methanogenesis and methane oxidation in wetlands. Implications in the global carbon cycle // *Hidrobiologica.* 2005. V. 15. P. 327–349.
- Ueyama M., Takai Y., Takahashi Y., Ide R., Hamotani K., Kosugi Y., Takahashi K., Saigusa N.* High-precision measurements of the methane flux over a larch forest based on a hyperbolic relaxed eddy accumulation method using a laser spectrometer // *Agric. Forest Meteorol.* 2013. V. 178. P. 183–193.
- Ueyama M., Yoshikawa K., Takagi K.* A cool-temperate young larch plantation as a net methane source – A 4-year continuous hyperbolic relaxed eddy accumulation and chamber measurements // *Atmosph. Environ.* 2018. V. 184. P. 110–120.
- Ullah S., Frasier R., Pelletier L., Moore T.R.* Greenhouse gas fluxes from boreal forest soils during the snow-free period in Quebec, Canada // *Can. J. For. Res.* 2009. V. 39. P. 666–680.
- Van Huissteden J., Maximov T.C., Dolman A.J.* High methane flux from an arctic floodplain (Indigirka lowlands, eastern Siberia) // *J. Geophys. Res.* 2005. V. 110. G02002.
- Waddington J.M., Roulet N.T., Swanson R.V.* Water table control of CH₄ emission enhancement by vascular plants in boreal peatlands // *J. Geophys. Res.* 1996. V. 101. D17. P. 22775–22785.
- Ware J., Kort E.A., Duren R., Mueller K.L., Verhulst K., Yadav V.* Detecting urban emissions changes and events with a near-real-time-capable inversion system // *J. Geophys. Res.: Atmospheres.* 2019. V. 124. P. 5117–5130.
- Whiticar M.J.* Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // *Chem. Geology.* 1999. V. 161. P. 291–314.
- Yevdokimov I.V., Yusupov I.A., Larionova A.A., Bykhovets S.S., Glagolev M.V., Shavnin S.A.* Thermal impact of gas flares on the biological activity of soils // *Euras. Soil Sci.* 2017. V. 50. P. 1455–1462.
- Zeikus J.G., Winfrey M.R.* Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 1976. V. 31. P. 99–107.

Methodologies for Measuring Microbial Methane Production and Emission from Soils—A Review

M. V. Glagolev^{1,2,3,4,*}, O. R. Kotsyurbenko², A. F. Sabrekov^{2,3}, Yu. V. Litt⁵, and I. E. Terentieva³

¹Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Yugra State University, Khanty-Mansiysk, 628011 Russia

³Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

⁴Institute of Forest Science, Russian Academy of Sciences, Moscow region, 143030 Russia

⁵Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: m_glagolev@mail.ru

Received May 13, 2020; revised July 16, 2020; accepted August 7, 2020

Abstract—Methane is an important greenhouse gas. Prediction of its long-term effect on climate changes requires understanding of the sources of its release into the atmosphere. The present work aimed to review the most widely used modern methods for measuring microbial production and emission of methane in soils, and to assess their applicability to various microbial ecosystems. A classification of methods for measuring methane production in microbial soil ecosystems is proposed, based on the basic physical and mathematical approaches to data processing for each method. Under laboratory conditions, methane production is determined by soil samples incubation and layered mass balance methods, which make it possible to investigate the methanogenic potential of a microbial community for subsequent simulation of microbial processes; these methods, however, can not be directly extrapolated to natural ecosystems. To determine methane production in field experiments, gradient methods are used, as well as a “deep soil chamber technique” developed for wetlands. Methods for measuring methane emission are described, as well as their advantages and limitations. While traditional chamber techniques are simple and therefore widely used, their implementation is limited by such factors as changes in environmental conditions caused by using the chamber, small spatial scales, and difficulties in chamber installation in some ecosystems. More recently developed micrometeoro-

logical methods are free of these limitations and provide for proper estimations of gas emissions for a biogeocenosis even if these emissions are heterogeneous in space and time. To estimate emissions from such specific objects as landfills and livestock complexes or from large-scale areas (regional or even global), the “inverse modeling method” is used.

Keywords: methanogenesis, potential methane production, methane emission, chamber technique, micro-meteorological methods, inverse modeling method

БИСТАБИЛЬНОСТЬ И ФОРМИРОВАНИЕ МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ КАК МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ *BACILLUS SUBTILIS* В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ

© 2020 г. М. Р. Шарипова^{а, *}, А. М. Марданова^а, Н. Л. Рудакова^а, Д. С. Пудова^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: marsharipova@gmail.com

Поступила в редакцию 25.02.2020 г.

После доработки 01.07.2020 г.

Принята к публикации 07.07.2020 г.

Бациллы контролируют поведенческие реакции, такие как подвижность, формирование биопленок, биосинтез ферментов и метаболитов, дифференцировка и другие путем интеграции разнообразных экологических сигналов через сложную регуляторную сеть. Преобладающим образом жизни *Bacillus subtilis* в естественной среде является биопленка, будучи идеальной моделью для изучения молекулярной стратегии ее формирования. В обзоре систематизированы сведения об основных системах регуляции, ответственных за потерю подвижности и формирование биопленок *B. subtilis*, анализируется поведение бактерий внутри биопленочной популяции, приводящее к состоянию бистабильности и дифференцировке на разные типы субпопуляций, оценивается регуляторная взаимосвязь между системами контроля, ответственными за синтез структурных компонентов матрикса биопленки. Особый акцент сделан на данных о сигнальных механизмах, запускающих образование биопленки и ее дисперсию. Представлены обобщенные сведения о последних открытиях в этой области и их интеграции в общее представление об этих сложных микробных сообществах.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, биопленка, бистабильность, транскрипционные регуляторы, репрессоры, антирепрессоры, метаболическая регуляция, сигнальные механизмы

DOI: 10.31857/S0026365620060178

ВВЕДЕНИЕ

В стационарной фазе бациллы способны к формированию разных адаптационных ответов, сопровождающихся изменениями в регуляции экспрессии множества генов, направленных на выживание. В естественной среде биопленки являются преобладающим образом жизни бактерий, образование которых в лимитированных условиях представляет сложный и строго регулируемый процесс. Способность синтезировать биопленки является частью жизненного цикла большинства микроорганизмов и успешной стратегией защиты бактерий от неблагоприятных факторов окружающей среды, поэтому молекулярные основы формирования биопленок остаются темой возрастающего интереса в микробиологии. В настоящее время используют различные бактериальные модели для выяснения молекулярных механизмов образования и функционирования биопленок. Для этой цели идеальной моделью считают биопленки обитающих в почве бактерий *Bacillus subtilis*, которые характеризуются уникальными архитектурными особенностями как следствие сложных программ клеточной специализации и межклеточной

точной коммуникации в сообществе (Ryan-Payseur, Freitag, 2018; Kovacs, Dragos, 2019). Эти исследования нацелены на выяснение эволюции, биологической роли, морфологических особенностей и структуры биопленок, а также молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе клеточной дифференцировки внутри микробного сообщества. Особый интерес представляет регуляторная и метаболическая взаимосвязь между процессом образования биопленки у бацилл и другими клеточными событиями стационарной фазы, такими как споруляция, подвижность, секреция вторичных метаболитов и белков, включая липопептиды и внеклеточные ферменты, в том числе протеиназы (Актуганов и соавт., 2019; Pisithkul et al., 2019). Установлено, что биопленка *B. subtilis* содержит протеиназо-продуцирующие клетки и их количество возрастает по мере развития биопленки (Kobayashi, Ikemoto, 2019). Кроме того, гены, продукты которых участвуют в формировании биопленок, регуляторно взаимосвязаны с синтезом и секрецией различных внеклеточных метаболитов и сигнальных молекул для кооперативного взаимодействия в микробном

сообществе (Martin et al., 2020). На основе новых знаний разрабатывается платформа для создания искусственных биопленок методами 3D-печати для целевого практического использования (Huang et al., 2018; Balasubramanian et al., 2019). Мы делаем акцент на обобщении новых данных, полученных для формирования, развития и рассеивания биопленок *B. subtilis*.

Целью работы является систематизация данных о регуляции образования и дисперсии биопленки *B. subtilis* во взаимосвязи с другими физиологическими процессами стационарной фазы у этих бактерий.

СТРУКТУРА БИОПЛЕНКИ

B. subtilis являются подвижными грамположительными почвенными бактериями, способными формировать устойчивые биопленки, в том числе, в симбиозе с корнями растений. Образование биопленки является одним из ответов клеток *B. subtilis* на неблагоприятные факторы среды, в результате формируется структурированное многоклеточное сообщество бактерий, в котором клетки сцеплены друг с другом и заключены в полимерный матрикс собственного производства (Hobley et al., 2015). Матрикс включает экзополисахариды (EPS), белки, нуклеиновые кислоты и содержит каналы, через которые транспортируются питательные вещества и кислород и выводятся продукты бактериального метаболизма (Hobley et al., 2015). Матрикс обеспечивает стабильность биопленки, защиту содержащихся в нем бактерий от бактериофагов, неблагоприятных воздействий (осмотический шок, УФ-облучение, высушивание, изменение pH среды и др.) и антибактериальных препаратов (Стрелкова и соавт., 2013; Dragos et al., 2017; Vidakovic et al., 2018; Пономарева и соавт., 2018). Описан механизм “взаимопомощи” между клетками бактерий, способными и неспособными формировать матрикс, последние получают выгоду от кооперативного взаимодействия с клетками, синтезирующими экзополисахариды (Martin et al., 2020). Тесное связывание клеток бактерий через нанотрубки для совместного использования метаболитов и передачу сигналов на большие расстояния для соединения метаболических процессов направлено на создание единого микробного сообщества с рациональным распределением внеклеточных “общественных благ”. Отношения между бактериями основаны на активации сложных механизмов межклеточной коммуникации, в этих процессах решающую роль играют системы глобальной регуляции метаболизма: “кворум-сенсинг” и циклического ди-ГМФ, вследствие чего активируются процессы секреции ферментов и вторичных метаболитов, сидерофоров и противомикробных соединений (Vareia et al., 2018; Kalamara et al., 2018; Fu et al.,

2019; Kovacs, Dragos, 2019). Биопленка является основой для метаболической кооперации клеток в сообществе, а также создает условия, благоприятные для симбиотических взаимоотношений между бактериями и макроорганизмами, например, между почвенными бациллами и корнями растений (Townsend et al., 2018).

Природные биопленки имеют сложную структуру и состоят из множества видов микроорганизмов, которые взаимодействуют между собой, либо конкурируют за питательные вещества и пространство для жизнедеятельности. Поскольку природные биопленки являются смесью видов, что затрудняет исследования, их часто проводят на биопленках одного вида в лабораторных условиях, которые можно контролировать. Наиболее распространенный способ получения биопленок в лабораториях – это формирование ассоциаций микроорганизмов на погруженных твердых поверхностях, которые визуализируют с помощью красителя кристаллического фиолетового, другой способ – формирование биопленки на границе раздела воздух–жидкость (Vlamakis et al., 2013; Hollenbeck et al., 2016). Плакунов и соавт. разработали альтернативный планшетному универсальный метод одновременного анализа планктонной и биопленочной культур для характеристики роста биопленки, синтеза внеклеточного матрикса, метаболической активности и минимального числа жизнеспособных клеток в биопленке на основе использования политетрафторэтилена, фильтров из стекловолокна в качестве поверхности для формирования биопленок (Плакунов и соавт., 2016). Метод пригоден для грамотрицательных и грамположительных бактерий. Кроме того, в настоящее время колонии, которые растут на поверхности чашек с агаром, также рассматривают как форму биопленки, поскольку они представляют собой устойчивые микробные сообщества клеток во внеклеточном матриксе (Branda et al., 2001; Gallegos-Monterrosa et al., 2016).

Отличительным признаком биопленок *B. subtilis* является множество архитектурных особенностей; их сложность обусловлена высокой степенью клеточной специализации и характером межклеточных коммуникаций субпопуляций, которые в совокупности образуют сообщество, по строению аналогичное многоклеточным организмам (Schafer, Turgay, 2019). Для формирования биопленки клетки *B. subtilis* переходят из планктонного в неподвижное состояние, при этом подавляется экспрессия жгутиковых генов и индуцируется экспрессия генов, необходимых для синтеза внеклеточного матрикса, обусловленных внешними сигналами (поверхностное сцепление, истощение питательных веществ, низкий уровень кислорода и др.) (Gingichashvili et al., 2019). Первоначально клетки бацилл представляют собой короткие подвижные палочки, которые по мере развития биопленки

прилипают друг к другу и к поверхности и образуют длинные цепочки из неподвижных клеток, выделяющих внеклеточный матрикс. Матрикс биопленки *B. subtilis* характеризуется гидрофобностью и является источником механической жесткости (Dragos, Kovacs, 2017). Разработана инновационная технология оптической визуализации для пространственного и временного слежения за динамикой развития биопленки *B. subtilis* в различных условиях для определения неровностей и толщины биопленки, распределения в ней клеток с различным фенотипом (подвижность, продукция матрикса и споруляция) с применением метода меченой тройной флуоресценции (Wang et al., 2017).

Обширные складки или морщины на поверхности биопленки бацилл рассматривают как результат механической нестабильности в связи с передвижением клеток внутри биопленки или локализованной гибели клеток. Преимущество в образовании складок приводит к увеличению отношения поверхности биопленки к ее объему для обеспечения лучшего доступа клеток к кислороду (Asally et al., 2012; Trejo et al., 2013; Kolodkin-Gal et al., 2013). Морщины способствуют формированию сложной сети каналов внутри биопленки, облегчая циркуляцию жидкости и распределение питательных веществ в тех частях биопленки, которые недоступны диффузионным процессам; каналы внутри биопленки взаимосвязаны и их морфология и количество зависит от возраста биопленки и условий питания бактерий (Gingichashvili et al., 2019). Установлено, что каналы выполняют важную функциональную роль в транспорте молекул через структуры биопленки, что позволяет жидкости эффективно проходить в более глубокие слои периферии зрелой биопленки (Gingichashvili et al., 2019). На поверхности биопленки *B. subtilis* идентифицированы воздушные домены, представляющие участки для споруляции и распространения бактериальных спор (Branda et al., 2001). Такая трехмерная архитектура обеспечивает целостность биопленки *B. subtilis* и важна для адаптации и выживания микробных клеток.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ

Гены, ответственные за образование экзополисахаридов матрикса, входят в состав *eps*-оперона (Nagorska et al., 2010; Marvasi et al., 2010; Roux et al., 2015). Дефектные по экзополисахаридам *eps*-мутанты бацилл образуют плоские и чрезвычайно хрупкие колонии, способные расти и формировать цепочки из клеток, частично содержащих внеклеточный материал благодаря синтезу дополнительных компонентов матрикса белковой природы (Branda et al., 2006). Мутации в генах ферментов, участвующих в биосинтезе матрикса, *pgcA* (ранее *uhxB*), кодирующий α -фосфоглюко-

мутазу, и *gtaB*, кодирующий УТФ-глюкозо-1-фосфат-уридилтрансферазу, приводят к нарушениям в образовании биопленки (Lazarevic et al., 2005). Мутанты, дефектные по синтезу уридиндифосфат-галактозы (UDP-Gal), который в качестве предшественника необходим для биосинтеза экзополисахарида, не формируют биопленку (Chai et al., 2012). UDP-Gal является токсичным промежуточным продуктом в метаболизме галактозы, который преобразуется в нетоксичную UDP-глюкозу с помощью УДФ-глюкоза-4-эпимеразы (GalE); при мутации в гене *galE*, в присутствии галактозы в результате накопления UDP-Gal прекращается рост клеток. Наиболее изученным продуктом генов *eps*-оперона является белок EpsE. Это бифункциональный белок, который участвует в контроле биосинтеза компонентов EPS. Белок EpsE ингибирует вращение жгутиков, взаимодействуя с белком ротора жгутиков, FliG, и обладает активностью гликозилтрансферазы, которая необходима для биосинтеза EPS (Guttenplan, Kearns, 2013). При этом ингибирование движения происходит независимо от гликозилтрансферазной активности белка EpsE. Такой механизм регуляции способствует активному формированию матрикса биопленки при выключении подвижности клеток. У некоторых штаммов *B. subtilis* активно синтезируется и способствует усилению образования полимерного матрикса другой внеклеточный полимер, гамма-полиглутаминовая кислота (PGA) (Morikawa et al., 2006; Wu et al., 2008). Спектр экзополисахаридов *B. subtilis*, которые входят в матрикс биопленки, варьирует в зависимости от условий роста (Roux et al., 2015). Когда штамм *B. subtilis* NCIB3610 выращивали в среде, содержащей глютаминовую кислоту и глицерин, в углеводной биомассе присутствовали такие моносахариды как галактоза, глюкоза и N-ацетилгалактоза (GalNAc); распространенность каждого сахара зависела от целостности генов *eps*-оперона (Chai et al., 2012). В соответствии с этими данными, гены, участвующие в метаболизме галактозы, важны для формирования биопленки.

Анализ полисахаридов штамма *B. subtilis* NCIB3610, выращенного в бульоне TY (LB с добавлением сульфата марганца и сульфата магния), выявил манноза-доминирующий профиль моносахаридов, зависимый от *eps*-оперона (Jones et al., 2014). По-видимому, природа полисахарида, продуцируемого компонентами *eps*-оперона, зависит от доступных субстратов. В дополнение к экзополисахаридам, синтезированным под контролем *eps*-оперона, штаммы *B. subtilis* для образования матрикса синтезируют экзогенный полисахарид леван (гомополимер фруктозы), биосинтез которого зависит от левансахаразы, кодируемой геном *sacB* (Benigar et al., 2014; Raga-Carbajal et al., 2016). При росте бактерий в присутствии в среде сахарозы леван включается в матрикс биопленки,

что частично компенсирует отсутствие продуктов *eps*-оперона (Dogsa et al., 2013). Включение бактериями левана в матрикс биопленки, при условии, что сахароза продуцируется растениями, может быть актуальным для формирования биопленки *B. subtilis* в ризосфере в естественной среде.

Целостность структуры биопленки обуславливают 2 секретируемых белка *B. subtilis*, TasA и TapA, оба кодируются геном кластером, состоящим из трех генов *tapA–sipW–tasA* (*tapA*-оперон) (Branda et al., 2006). Гомологи TasA широко распространены среди бацилл (Dragos, 2017). Белок TasA рассматривался как функциональный амилоидоподобный белок, который синтезируется как мономер, собирается в длинные волокна (фибриллы) и транслоцируется через мембрану с участием сигнальной пептидазы SipW; снаружи с помощью белка-помощника TapA волокна прикрепляются к клеточной стенке (Romero et al., 2014). Белок TasA является функциональным гомологом амилоидных белков курли *E. coli*, он полимеризуется *in vitro* и способен взаимодействовать с антителами, специфичными для амилоидных полимеров (Huang et al., 2018). Очищенный белок TasA находится в растворе в олигомерном состоянии, волокнообразование из олигомеров TasA стимулируется в кислой среде, либо в присутствии гидрофобной поверхности (Chai et al., 2013). Изучение *in vitro* различных олигомерных форм секретируемого белка TasA с помощью ЯМР, ЭМ, рентгеновской дифракции и аналитического ультрацентрифугирования показало конформационные изменения TasA от глобулярного состояния до протеиназо-устойчивой фибриллярной структуры, что не наблюдается для других биопленкообразующих белков (Diehl et al., 2018). На основе метода твердотельного ЯМР установлено, что основной амилоидный компонент TasA содержит β -листы и α -спирали во вторичной структуре, что свидетельствует о нетипичной амилоидной архитектуре у *B. subtilis* (Mammeri et al., 2019).

Мутанты по гену *tasA* биопленку не образуют, но этот дефект не такой существенный, как у мутантов по *eps*-генному кластеру (Branda et al., 2006). *tasA*-Мутанты продуцируют клеточные цепи, которые не способны удерживаться вместе, инактивация гена *tasA* также связана с отсутствием формирования морщинистой биопленки. Белок TasA участвует в упорядоченном созревании биопленки *Bacillus*. Его отсутствие приводит к ряду физиологических изменений, вызванных изменениями стабильности и динамики мембран, снижает жизнеспособность клеток при взаимодействии за счет отсутствия структурированного матрикса, что, в свою очередь, ограничивает возможность адаптации клеток к стрессам (Samaga-Almiron et al., 2020). TasA проявляет антимикробные свойства; экспрессия *tasA* в биопленках *B. subtilis* усиливается в присутствии патогена *Fu-*

sarium culmorum (Khezri et al., 2016). Интересно, что TasA также играет важную роль в распознавании родственных связей между близкородственными штаммами *B. subtilis*, что опосредуется различными ингибирующими молекулами (Lyons et al., 2016). Наконец, *tasA*-мутантные штаммы дефектны в формировании связанных с корнем биопленок (Dragos et al., 2017). Поскольку ризосфера растений представляет естественную среду обитания *B. subtilis*, TasA может быть одним из ключевых секретируемых соединений, определяющих экологию и эволюцию этого вида.

Белок TapA образует минорный компонент волокон из TasA белка, связывается с TasA и участвует в прикреплении волокон TasA к клеточной стенке, играет важную роль в его локализации, а также в полимеризации и сборке волокон TasA из мономеров (Romero et al., 2014). В отсутствие гена *tapA* не образуются TasA-волокна дикого типа, и уменьшается общий уровень TasA-белка в экзогенном матриксе. Данные свидетельствуют, что белок TapA обеспечивает стабилизацию белка TasA, в связи с чем фибриллярная форма белка TasA более устойчива к расщеплению протеиназами, по сравнению с олигомерной формой. Согласно этим выводам, делеция гена *tapA* также является критичной для образования биопленок *B. subtilis*.

Сигнальная пептидаза SipW расщепляет предшественник белка TapA, распознавая N-концевую сигнальную последовательность, чтобы белок высвобождался из мембраны и формировал фибриллярные волокна, связанные с клеточной стенкой (Stover, Driks, 1999). Мутации в гене *sipW* у штаммов *B. subtilis* приводили к нарушениям в прикреплении к поливинилхлоридным или стеклянным поверхностям в условиях лаборатории (Hamon et al., 2004). Это связано с тем, что пептидаза SipW является бифункциональным белком, которая работает как сигнальная пептидаза в процессинге белков TasA и TapA и функционирует для активации экспрессии *eps*-оперона при участии C-концевого домена белка. Такая активация необходима для инициации образования матрикса биопленки в результате прикрепления клеток к поверхности.

На заключительных этапах созревания биопленки синтезируется бактериальный гидрофобин BslA, который работает вместе с белком TasA (Hobley et al., 2015). Белок BslA (ранее YuaB) необходим для поверхностной гидрофобности биопленки *B. subtilis* и формирования ее сложной морфологии и архитектуры (Arnaouteli et al., 2017). Биопленка *B. subtilis* с дефектным фенотипом *bslA*⁻ обладает амфифильными свойствами и напоминает мутанты с делецией генов *eps* и *tasA* (Ostrowski et al., 2011). Белок BslA является поверхностно-активным и состоит из двух доменов –

иммуноглобулин-подобного домена и уникального высоко гидрофобного домена (Hobley et al., 2015). Белок BslA имеет две структурные конформации, которым соответствуют две функциональные формы: мономерный BslA необходим для создания сложной структуры биопленки, тогда как для гидрофобности поверхности биопленки требуется димерный белок (Amaouteli et al., 2017). Димеризация BslA опосредуется образованием дисульфидной связи и зависит от двух консервативных остатков цистеина, расположенных в С-концевой области молекулы белка. Конформационный переход регулируется окислительно-восстановительным статусом среды: в нативной биопленке доступность акцептора электронов влияет на олигомеризацию BslA, и в обогащенной кислородом области с открытой поверхностью преобладающей формой является димер.

Таким образом, все компоненты матрикса биопленки, экзополисахариды (EPS, PGA) и белки (TasA, TasA и BslA), необходимы для формирования внеклеточного матрикса *B. subtilis* и влияют на рост и конечные размеры биопленки. На основе методов интервальной микроскопии и световой профилометрии установлено, что два матричных компонента, экзополисахарид, продуцируемый геном *epsA*-O оперона, и белок поверхностного слоя BslA контролируют область покрытия биопленкой, причем высота зрелой биопленки зависит от белка BslA (Kesel et al., 2017). Взаимодействия между компонентами матрикса в биопленках ответственны за создание адаптируемой структуры в процессе развития биопленки. Показано, что на ранних этапах развития биопленки при формировании ее 3D-структуры с компонентами матрикса взаимодействует экзогенная ДНК, которая также вносит определенный вклад в созревание биопленки *B. subtilis* (Peng et al., 2020).

БИСТАБИЛЬНОСТЬ БИОПЛЕНКИ

Формирование и развитие биопленки, синтез компонентов внеклеточного матрикса строго регулируются на уровне транскрипции, посттранскрипционных и посттрансляционных модификаций (Reverdy et al., 2018). В планктонной популяции все клетки подвижны, экспрессия генов, необходимых для подвижности, обеспечивается, когда транскрипционные регуляторы Spo0A, DegU, ComA находятся в нефосфорилированном состоянии; их активация в ответ на присутствие разнообразных внеклеточных сигналов приводит к уменьшению популяции подвижных клеток (Matakis et al., 2013). В процессе созревания биопленки клетки бактерий дифференцируются на несколько типов, образуя субпопуляции генетически идентичных, но по фенотипу отличных клеток, которые реагируют на различные сигналы и выполняют разные функции для всего сообщества, чтобы

минимизировать затраты энергии, например, предотвращая тотальный переход клеток в энергоемкий процесс споруляции (Lopez, Kolter, 2010). За активацию специфических генных каскадов, которые приводят к дифференцировке всех сосуществующих типов клеток в биопленках *B. subtilis*, ответственна сложная регуляторная сеть.

Впервые дифференциация клеток в биопленке установлена путем микроскопического исследования, в результате которого в воздушных доменах биопленки обнаружен специфичный для споруляции репортер (Branda et al., 2001). Впоследствии эти данные подтвердили эксперименты, полученные с помощью фьюжн-векторов с флуоресцентными репортерами (Veening et al., 2006). Внутри биопленки идентифицированы клетки, специализирующиеся на подвижности, формировании полимерного матрикса, споруляции, секреции экзопротеиназ. С помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии установлено, что количество клеток, продуцирующих экзопротеиназы, увеличивается по мере созревания биопленки и обусловлено увеличением транскрипции генов экзопротеиназ, а также увеличением активности экзопротеиназ во времени (Marlow et al., 2014a). Протеиназы синтезируются клетками, продуцирующими матрикс, так и клетками, не продуцирующими матрикс, что указывает на значимость этих ферментов на разных стадиях развития биопленки. Данные этих экспериментов увеличили разнообразие типов специализированных клеток биопленки и свидетельствовали о регуляторной пластичности сообщества.

Активация Spo0A-транскрипционного фактора путем фосфорилирования запускает образование спор только в определенной субпопуляции клеток *B. subtilis* (Fujita et al., 2005). Существует два различных уровня активации транскрипционного фактора Spo0A-P: низкий уровень активации (клетки Spo0A-ON) приводит к образованию матрикса, а более высокий уровень – к споруляции (рис. 16). Клетки Spo0A-ON становятся продуцентами матрикса, они теряют подвижность путем активации сцепления (белок EpsE) (Guttenplan, Kearns, 2013). Кроме того, клетки Spo0A-ON являются каннибалами, они невосприимчивы к действию двух самосекретируемых пептидных токсинов (пептиды Skf и Sdp), которые убивают их чувствительных к токсинам собратьев (Höfler et al., 2016). Этот процесс рассматривают как каннибализм: когда питательных веществ недостаточно, мертвые клетки служат пищей для оставшихся клеток популяции и задержки процесса спорообразования; этот процесс опосредуют секретиремые протеиназы (Kobayashi, 2019).

Активация фактора ComA (ComA-P) приводит к дифференцировке и образованию в сообществе

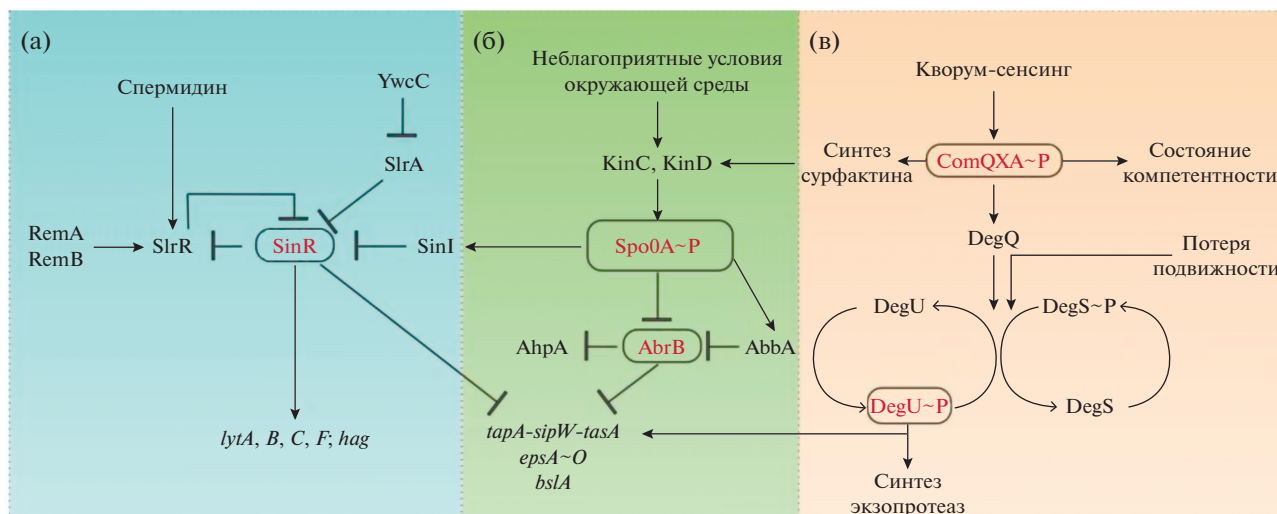


Рис. 1. Регуляторные пути, контролирующие формирование биопленки у *B. subtilis*: а – схема действия SinR репрессора; б – механизм образования биопленки *B. subtilis* под контролем транскрипционного регулятора Spo0A-P; в – схема участия транскрипционных факторов DegU-P и ComA-P в контроле образования биопленки *B. subtilis*. Т-образная прямая обозначает ингибирование, а стрелками указаны пути активации. Описание схемы в тексте.

субфракции компетентных клеток, которые способны поглощать экзогенную ДНК, чтобы увеличить генетическую изменчивость в популяции. Активация ComA-P регулируется механизмом кворум-сенсинга и запускается при достижении определенной плотности клеток (Zerrouh et al., 2014). Кроме того, клетки ComA-P экспрессируют паракринный сигнал сурфактин, который запускает экспрессию генов и оперонов для образования матрикса (рис. 1в) (Aleti et al., 2016). Активность пары регуляторов ответа ComA/ComP модулируется сигнальным пептидом ComX, который контролирует в качестве аутоиндуцирующего сигнала процессы компетентности, продукции сурфактанта и, косвенно, синтез внеклеточных протеиназ в *B. subtilis* (Šrascapan et al., 2018). Эти процессы регулируются в соответствии с размером бактериальной популяции, классифицируя ComX как сигнал кворум-сенсинга, контролирующий продукцию экзопроотеиназ через промежуточный регулятор транскрипции DegQ.

Активация транскрипционного фактора DegU (DegU-P) приводит к образованию в сообществе субпопуляции клеток, называемых “майнеры”, которые специализируются на секреции внеклеточных протеиназ (рис. 1в) (Veening et al., 2008). Продукты этих клеток способствуют расщеплению крупных биополимеров на более мелкие олигопептиды. Показано, что пептид ComX индуцирует экспрессию гена субтилизина *aprE* и стимулирует секрецию экзопроотеиназа в биопленках *B. subtilis*. В свою очередь, экзопроотеиназы способны разрушать аутоиндуцирующий сигнальный пептид ComX. Снижение биологической активности ComX может быть восстановлено добавлением

субтилизина, ингибирование металлопротеиназ ЭДТА снижает биологическую активность ComX, указывая на то, что сериновые и металлопротеиназы способны расщеплять пептид ComX (Šrascapan et al., 2018). Эти данные свидетельствуют, что секретируемые протеолитические ферменты выполняют регуляторные функции и разрушают сигнальный аутоиндуцируемый пептид ComX, который является важным детерминантом их экспрессии в биопленках. Субпопуляция клеток с активными экзопроотеиназами отличается от подвижных клеток или клеток, продуцирующих матрикс, и расположена ближе к поверхности биопленки (Marlow et al., 2014b). Это согласуется с фактом, что клетки DegU-ON активно экспрессируют водоотталкивающий белок BslA, который необходим для сохранения целостности биопленки *B. subtilis* (Hobley et al., 2015; Arnaouteli et al., 2017).

Анализ пространственной локализации отдельных субпопуляций в зрелых биопленках, проведенный с помощью флуоресцентных репортеров, показал, что подвижные клетки в нижнем слое биопленки способствуют ее пространственному расширению, а клетки, локализованные в ядре биопленки, специализируются на продукции внеклеточного матрикса и поддерживают его жесткость (Vlamakis et al., 2013). Разработаны новые методы визуализации внутренней структуры биопленки *B. subtilis* с сохранением архитектуры и ультраструктуры (Fuchs et al., 2018). Споры присутствуют в верхней части биопленки на воздушных структурах, которые облегчают их рассеивание. Пространственно-временное распределение компетентных клеток и клеток-продуцентов сур-

фактина как отдельные субпопуляции сложно выделить в общем микробном сообществе. Биостабильность внутри биопленки является способом адаптации всего сообщества к переменчивым условиям окружающей среды, когда генетически идентичная популяция способна образовывать отдельные субпопуляции с различными физиологическими свойствами, чтобы обеспечить необходимыми метаболитами все сообщество клеток. Эту стратегию назвали стратегией хеджирования роста (Veening et al., 2008).

РЕГУЛЯТОРНЫЙ ПУТЬ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ

Генетическая схема регуляции образования биопленок в *B. subtilis* изучена лучше, чем передача сигналов, которые запускают этот процесс (Mielich-Süss, Lopez, 2015). Роль центрального регулятора транскрипции в клетках стационарной фазы у *B. subtilis* выполняет фактор Spo0A, который контролирует экспрессию более ста генов, необходимых для споруляции и формирования биопленки (рис. 16) (Chastanet et al., 2011). Активность этого белка регулируется фосфорилированием: внеклеточные сигналы активируют сенсорные гистидинкиназы, которые запускают фосфореле, что приводит к фосфорилированию Spo0A. Содержание фосфорилированного Spo0A в клетках определяет профиль экспрессии генов (Schultz et al., 2016). Когда Spo0A фосфорилируется, происходит индукция образования биопленки, по мере созревания которой регулятор Spo0A-P накапливается в определенных клетках и активирует в них споробразование. При пороговых уровнях фосфорилирования Spo0A запускаются два пути антирепрессии, чтобы активировать транскрипцию оперонов, критичных для синтеза матрикса биопленки.

Первый путь нацелен на подавление репрессора AbrB, который блокирует транскрипцию генов, участвующих во многих процессах, включая формирование биопленки (Chumsakul et al., 2011). Установлено, что от регулятора переходного состояния AbrB и фактора транскрипции Spo0A зависит экспрессия гена *ahpA*, кодирующего пероксидазу AhpA, которая специфически экспрессируется во время формирования биопленки, но не экспрессируется в стационарной фазе или при споруляции. Это позволило предположить, что для дерепрессии гена пероксидазы *ahpA* под действием регулятора AbrB требуется сигнал, отличающийся от сигналов при переходе клеток в стационарную фазу (рис. 16) (Zwick et al., 2017). Регулятор AbrB контролируется посредством фактора Spo0A двумя различными путями: 1) Spo0A-P репрессирует транскрипцию гена *abrB* и 2) Spo0A-P способствует экспрессии фактора AbbA, AbrB-антирепрессора, который связывает AbrB и изолирует

его от взаимодействия с целевой ДНК (Tucker et al., 2014).

Второй путь связан с небольшим ДНК-связывающим белком SinR, который ингибирует формирование биопленки и является центральным для определения судьбы клеток (рис. 1а) (Kampf et al., 2018). Белок SinR образует тетрамеры и связывается с сайтами в промоторных областях оперонов *epsA-O* и *tapA-sipW-tasA*, необходимых для синтеза внеклеточного полисахарида и амилоидных волокон во внеклеточном матриксе соответственно (Cairns et al., 2014; Stowe et al., 2014). Активность SinR контролируется антагонистическими белками, SinI и SlrR. Связывание SinI или SlrR с SinR ингибирует ДНК-связывающую способность последнего и освобождает опероны биопленки от репрессии (рис. 1а) (Newman et al., 2013). Более того, небольшие изменения в уровнях экспрессии белка SinR оказывают существенное влияние на экспрессию генов матрикса, главным образом, из-за сверхчувствительности регуляторных модулей SinI-SinR и SlrR-SinR, что указывает на строгую регуляцию их образования, в том числе метаболическую (Chai et al., 2011; Greenwich et al., 2019).

Один из них, антирепрессорный белок SinI, активируется после фосфорилирования Spo0A и связывается с SinR, образуя гетеродимерный комплекс, изолирует SinR от ДНК-мишеней, что приводит к экспрессии SinR-репрессированных генов (рис. 1а) (Newman et al., 2013; Stowe et al., 2014). Фенотипический переход из планктонного в биопленочное состояние регулируется активностью репрессора транскрипции SinR и его инактивацией первичным антагонистом, SinI. Установлен механизм разрушения тетрамера SinR с помощью белка SinI, который регулирует экспрессию SinR-репрессируемых генов (Milton et al., 2020). Если уровни SinR превышают уровни его антагонистов, то экспрессия генов матрикса подавлена, в то же время показано, что SinR экспрессируется в большинстве клеток, а SinI — только частью популяции. Функции белков SinI и SinR чувствительны к дозе гена: удвоение копий генов *sinI* и *sinR* приводило к подавлению синтеза полимеров матрикса (Chai et al., 2011; Ogura et al., 2016). В совокупности за счет сродства Spo0A-P к промотору гена *sinI* и числа копий генов *sinI* и *sinR* экспрессия генов матрикса является временной, и спорующие клетки не расходуют энергию на продукцию внеклеточного матрикса.

Другой антирепрессор SlrR белка SinR необходим для контроля образования биопленки двумя способами (Chai et al., 2010). Во-первых, он связывается с репрессором SinR с образованием комплекса SinR-SlrR, предотвращая связывание SinR с промоторами генов матрикса (рис. 1а). Так как регулятор SinR репрессирует ген антирепрессора

сора *slrR*, который, в свою очередь, связывает регулятор SinR, это приводит к регуляции комплекса SinR–SlrR по механизму двойной петли отрицательной обратной связи. В результате ген *slrR* остается дерепрессированным при условии, что SlrR предотвращает репрессию со стороны регуляторного белка SinR. Когда уровень SlrR-белка в клетках высокий, происходит экспрессия генов оперонов матрикса, потому что в этих условиях уровень свободного репрессора SinR низкий. Когда уровень SlrR-белка в клетках низкий, регулятор SinR не ингибируется и блокирует опероны для синтеза матрикса биопленки. Во-вторых, комплекс SinR–SlrR участвует в контроле экспрессии гена *hag*, кодирующего флагеллин, необходимый для подвижности, а также генов аутолизина, кодирующих белки для разделения клеток (гены *lytABC* и *lytF*) (рис. 1а). Идентифицирован новый регуляторный механизм взаимодействия SinR с промотором гена *degU*, после чего репрессор SlrR образует комплекс с SinR на промоторе *degU*. Таким образом, SlrR по-видимому, играет активную роль в экспрессии *degU* (Ogura et al., 2014).

Сцепление клеток имеет большое значение в начале формирования биопленки у *B. subtilis*. Регуляторный белок SlrR нестабилен и относится к суперсемейству LexA-пептидаз, в клетках он подвергается расщеплению, в том числе с помощью протеиназы ClpCP. Нестабильность белка SlrR приводит к дерепрессии генов, кодирующих аутолизина, активация которых приводит к разделению цепей на отдельные клетки (Chai et al., 2010). Таким образом, переключатель SlrR–SinR может существовать в двух состояниях: при низком уровне SlrR, что соответствует одиночным подвижным клеткам, и при высоком SlrR, что соответствует цепочкам матрикс-продуцирующих клеток. Переключение с низкого в высокое состояние достигается с помощью белка SinI, который синтезируется под контролем фактора Spo0A-P в ответ на активирующиеся гистидинкиназы. Накопление белка SinI ингибирует репрессор SinR, приводя к депрессии гена для продукции белка SlrR. Это приводит к накоплению SlrR, приводя переключатель SlrR–SinR в состояние высокого уровня SlrR, благоприятное для формирования биопленки.

Сложные взаимодействия между SinR и его родственными антагонистами приводят к бистабильности. На эти взаимодействия влияет фосфодиэстераза YmdB, которая участвует в контроле активности репрессора SinR: клетки, дефектные по гену *ymdB*, характеризуются гиперактивностью SinR и неспособны формировать биопленки (Kampf et al., 2018). У *ymdB*-мутанта большинство клеток экспрессируют гены, необходимые для подвижности и хемотаксиса. Супрессорный анализ показал, что мутанты *ymdB* легко приобрета-

ют мутации, влияющие на SinR, восстанавливая образование биопленки (Kampf et al., 2018). Эти данные свидетельствуют, что фосфодиэстераза YmdB необходима для гомеостаза SinR и/или его антагонистов. Показано, что на посттранскрипционном уровне транскрипты *sinI*–*sinR* и *sinR* контролируются путем их деградации с помощью РНКазы Y-содержащих белковых комплексов (DeLoughery et al., 2016). Важную роль в регуляции активности белков в клетках бацилл выполняют АТФ-зависимые протеиназы. Результаты глобального протеомного анализа и вестерн-иммуоблоттинга показали, что уровни SinR снижаются у мутанта с дефектом по высококонсервативной ClpYQ-протеиназе с изменениями в регуляции образования биопленки (Yu et al., 2018).

Для формирования биопленки также необходимы регуляторные белки RemA и RemB (рис. 1а) (Cairns et al., 2014). Регулятор RemA является ДНК-связывающим белком, который активирует транскрипцию *eps*- и *tapA*-оперонов, а также контролирует транскрипцию гена антирепрессора *slrR*. Установлено, что для регуляции экспрессии гена *slrR* требуются оба регуляторных белка, RemA и RemB (Winkelman et al., 2013). Дополнительно, по результатам генетического анализа регуляторы RemA и RemB контролируют экспрессию оперонов матрикса способом, независимым от антирепрессора SlrR и действуют параллельно с другими регуляторами (DegU, AbrB и SinR). RemA связывается с ДНК выше промотора *eps*-оперона и перекрывается с сайтом для взаимодействия с репрессором SinR, в этом случае белок SinR препятствует связыванию белка RemA с промотором (рис. 1а) (Winkelman et al., 2013). Аналогично, RemA связывается выше промотора *tapA*-оперона, но в этом случае SinR и RemA способны одновременно связываться с ДНК. Эти данные указывают на дополнительный путь для контроля экспрессии генов матрикса биопленки. На хромосомной ДНК *B. subtilis* ген *remA* расположен рядом с генами, продукты которых связаны со строгим ответом; этот факт может указывать на регуляторную взаимосвязь между экспрессией гена *remA* и метаболическим статусом клетки (Winkelman et al., 2013).

Установлено, что компоненты эпигенетического переключателя могут подвергаться дополнительной регуляции с участием регуляторных белков YwcC и SlrA, из которых белок SlrA является одним из антирепрессоров регулятора SinR, а белок YwcC является репрессором транскрипции TetR-типа и репрессирует ген *slrA* (рис. 1а) (Chai et al., 2009). Когда регулятор YwcC отвечает на неустановленный сигнал и его экспрессия подавляется, гены матрикса биопленки индуцируются SlrA-опосредованной инактивацией репрессора SinR. В отличие от SinI, белок SlrA продуцируется почти во всех клетках. В этом случае такой путь

регуляции посредством YwcC—SlrA обеспечивает клеткам *B. subtilis* быструю реакцию для защиты бактериального сообщества на стрессовые изменения среды путем образования биопленки.

Регуляция экспрессии генов *bslA* и *pgs* у *B. subtilis* осуществляется системой трансдукции сигнала DegS—DegU, в которой DegU является транскрипционным регулятором. Он фосфорилируется родственной гистидинкиназой DegS и управляет многими клеточными процессами: плавательной и роящей моторикой, формированием биопленки, синтезом экзопротеиназ, производством гамма-полиглутаминовой кислоты (PGA) и споруляцией (Gabdrahmanova et al., 2005; Каюмов и соавт., 2006; Sharipova et al., 2008; Cheremin et al., 2014). Установлено, что мутант по *degU* не способен к формированию погруженной биопленки, для которой требуется полимер PGA, продукт *pgs*-оперона (Stanley et al., 2005). Образование биопленки у мутанта *degU* нарушается из-за потери гидрофобности матрикса за счет нарушения в экспрессии гена гидрофобина BslA (Kobayashi, Iwano, 2012). Степень фосфорилирования фактора транскрипции DegU (DegU-P) определяет поведение клеток бактерий, при этом инициация образования биопленки нуждается в промежуточных уровнях активации фактора транскрипции DegU. При высоких уровнях фосфорилирования фактора DegU в клетках, наоборот, наблюдается опосредованное ингибирование биопленки (рис. 1в) (Marlow et al., 2014b). Активация образования биопленки начинается, когда фосфорилированный DegU-P запускает транскрипцию гена *bslA*, кодирующего гидрофобный белок (Hobley et al., 2015). Путь DegS—DegU активируется при ингибировании вращения жгутиков, что может произойти, когда клетка связывается с поверхностью и теряет подвижность (рис. 1в). Понижение вращения жгутика вызывало увеличение уровня фосфорилированного DegU-P, что запускало транскрипцию генов-мишеней, в том числе гена *bslA* (Chan et al., 2014; Cairns et al., 2014). Таким образом, остановка вращения жгутиков служит дополнительным сигналом для формирования полимерного матрикса.

Особенно важна в биопленках, где плотность клеток очень высока, автоиндуцирующая сигнальная система (Šrascaran et al., 2018). Сигнальные молекулы связываются со специфическими рецепторами, вызывая транскрипцию и синтез необходимых секретлируемых продуктов, называемых общественными благами (например, протеиназами). У *B. subtilis* автоиндуцирующая сигнальная система основана на пептидах как сигнальных молекулах, которые контролируют многие адаптационные процессы, включая синтез экзопротеиназ. Сигнальный аутоиндуцируемый пептид ComX участвует в регуляции бактериальной компетентности и продукции сурфактанта в *B. subtilis* (Aleti et al.,

2016; Pollak et al., 2016). Оба признака регулируются в соответствии с размером бактериальной популяции, таким образом, классифицируя ComX как сигнал кворум-сенсинга. У *B. subtilis* основной системой на основе пептида аутоиндукции является кластер генов *comQXPA*, известный как система определения кворума. ComX регулирует экспрессию *srf*-оперона, ответственного за синтез сурфактина, и участвует в развитии генетической компетентности (Aleti et al., 2016). В системе ComQXPA активность пары регуляторов ответа ComP—ComA модулируется сигнальным пептидом ComX. ComX модифицируется изопренилтрансферазой ComQ (Okada et al., 2005). Внеклеточное накопление модифицированного ComX приводит к фосфорилированию ComA и последующей индукции регулона ComA. Ген *degQ* также является частью этого регулона. Высокий уровень DegU-P положительно регулирует синтез внеклеточных ферментов, включая *aprE*, кодирующий сериновую экзопротеиназу *B. subtilis* (Veenig et al., 2008). Таким образом, ComX и система ComQXPA положительно контролирует транскрипцию гена субтилизина *aprE* и продукцию экзопротеиназ во время роста биопленки. В свою очередь, экзопротеиназы способны деградировать сигнальный пептид ComX (Šrascaran et al., 2018). Фактически описаны два типа регуляции с участием ComX: положительная генетическая регуляция и отрицательная биохимическая регуляция. Такая обратная связь балансирует спрос и предложение бактерий на полезные общественные блага через сигнальную молекулу ComX.

В дополнение к сложной регуляции транскрипционными факторами, экспрессия *eps*-оперона контролируется посредством *цис*-элемента РНК, который кодируется участком ДНК между вторым и третьим генами *eps*-оперона. *Цис*-элемент РНК обозначили как EAR-элемент (элемент, ассоциированный с РНК); он идентифицирован в подавляющем большинстве геномов у представителей семейства *Bacillaceae*. EAR-элемент действует как антитерминатор и увеличивает экспрессию *eps*-оперона путем взаимодействия с РНК (Irnov et al., 2010).

Если основная генетическая схема регуляции образования биопленки на уровне транскрипции охарактеризована, то о роли метаболизма (метаболизм углерода, пути биосинтеза, пути ферментации и вторичный метаболизм) в этом процессе сведений мало (Pisithkul et al., 2019). Вторичный мессенджер с-di-AMP играет важную роль в формировании биопленки *B. subtilis* и в прикреплении ее к корням растений (Townsend et al., 2018). В клетках *B. subtilis*, в отличие от большинства других генов биосинтеза аминокислот, экспрессия генов биосинтеза серина снижается при переходе в стационарную фазу, что является критическим внутриклеточным сигналом для активации био-

синтеза матрикса биопленки (Greenwich et al., 2019). Была изучена связь между метаболизмом углерода и образованием биопленки (Chen et al., 2015). Анализ лизин-ацетилованных белков или ацетилома *B. subtilis* показал, что такая модификация белков играет важную регуляторную функцию в развитии биопленки (Reverdy et al., 2018). Установлена связь пути биосинтеза цистеина и образованием биопленки (Kobayashi, 2019). Формирование биопленки запускается, когда клетки испытывают недостаток глюкозы и зависят от контроля катоболита (Chen et al., 2015). Удаление гена *csrA* стимулирует формирование биопленки и указывает, что белок CsrA негативно регулирует образование биопленки у *B. subtilis*. Другой глобальный регулятор метаболизма CodY также участвует в формировании биопленки у *B. subtilis* (Brinsmade et al., 2014). Бактерии способны синтезировать полиамины, и с помощью транскриптомного анализа спермидин-истощенных мутантов *B. subtilis* показано, что спермидин необходим для образования биопленки. Он активирует транскрипцию генов синтеза экзополисахаридов матрикса и *tasA*-оперона через регулятор SlrR (рис. 1a) (Hobley et al., 2017).

Рассмотренные пути регуляции указывают на сложную и многослойную регуляторную сеть, контролирующую дифференцировку на субпопуляции и образование биопленки у *B. subtilis*. Большинство регуляторов специфичны только для этого организма, их функциональные гомологи не обнаружены у других видов бактерий. Регуляторная сеть эволюционировала, чтобы бациллы адекватно реагировали на изменения метаболизма и окружающей среды путем формирования единого сообщества генетически идентичных, но отличающихся по физиологическим функциям микроорганизмов, заключенных в биопленку.

СИГНАЛЫ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ

Сведения о сигналах, ведущих к формированию биопленки и дифференцировке микроорганизмов в сообществе на субпопуляции, малочисленны. Описаны многочисленные рецепторы сигналов для регуляторных систем, которые свидетельствуют, что существует много условий, способных вызвать формирование биопленки. Концентрация Spo0A-P в клетке определяется активностью семейства гистидинкиназ (KinA, KinB, KinC, KinD), которые воспринимают сигналы и передают через фосфотрансферазы на белок Spo0A (Jiang et al., 2000; Grau et al., 2015). Фосфореле включает Spo0F-фосфотрансферазу, которая фосфорилируется киназой и передает фосфатную группу фосфотрансферазе Spo0B, в свою очередь фосфорилирующей фактор Spo0A. Пятая киназа, KinE может участвовать в этом пути и, по-видимому,

влияет на экспрессию матричных генов (McLoon et al., 2011). Ни одна из идентифицированных киназ не отвечает полностью только за экспрессию генов полимерного матрикса; это скорее результат действия различных киназ в зависимости от разнообразия поступающих сигналов из среды.

Аутофосфорилирование гистидинкиназ происходит по *цис*-механизму, одна субъединица киназы фосфорилирует себя внутри мультимера, или *транс*-способом, одна субъединица мультимера фосфорилирует другую субъединицу. Установлено *in vivo* и *in vitro*, что аутофосфорилирование основной гистидинкиназы KinA при споруляции может происходить по *транс*-механизму и запускается в условиях истощения питательных веществ (Devi et al., 2015).

Первой сигнальной молекулой, идентифицированной в качестве индуктора генов биопленки, является секретрируемый антибиотик сурфактин (Aleti et al., 2016). Сурфактин как сигнальная молекула через сенсорную киназу KinC инициирует фосфорилирование фактора Spo0A и способствует активации экспрессии генов полимерного матрикса биопленки (Mielich-Suss et al., 2015). Клетки, синтезирующие и секретрирующие сурфактин, не являются клетками, которые реагируют на эту молекулу (Aleti et al., 2016). Эта концепция рассматривается как паракринная передача сигналов, когда продуцент сигнала не отвечает на свой сигнал. Это отличается от систем измерения кворума, в которой каждая клетка популяции продуцирует и реагирует на сигнальную молекулу (Aleti et al., 2016). Активация экспрессии генов в ответ на сигнальную молекулу сурфактин не происходит по традиционному механизму, включающему связывание сенсорного белка с лигандом. Сурфактин является липопептидом, молекула которого способна встраиваться в цитоплазматическую мембрану, вследствие чего происходит утечка ионов калия, обуславливающая активацию гистидинкиназы KinC, передачу сигнала на Spo0A и индукцию экспрессии генов матрикса биопленки (Grau et al., 2015).

Бактерии рода *Bacillus* обладают большим сельскохозяйственным потенциалом, продуцируя липопептиды с высокой антимикробной активностью (Velmoougouane et al., 2017; Актуганов и соавт., 2019). Рассматривают три семейства липопептидов *Bacillus*: сурфактин, итурин и фенгицин, молекулы которых имеют амфифильную природу, эффективно взаимодействуя с биологическими мембранными структурами. Их антимикробные свойства направлены против бактерий, грибов, оомицетов и вирусов. Установлено, что эти соединения стимулируют образование биопленок, что является ключевым фактором для успешной колонизации организмов биоконтроля (Penha et al., 2020). Другие соединения, которые вызывают

утечку калия, фунгицид нистатин и антибиотик валиномицин, также вызывают экспрессию генов матрикса биопленки через гистидинкиназу KinC. Сурфактин, нистатин и валиномицин являются природными продуктами почвенных микроорганизмов, и бактерии *B. subtilis* встречаются с этими соединениями в природных условиях. Нистатин индуцирует передачу сигналов у *B. subtilis* путем связывания эргостерина мембраны; в совокупности полученные данные позволили предположить, что мембраны *B. subtilis* содержат микродомены по аналогии с липидными рафтами в плазматических мембранах эукариотических организмов (Lopez, 2015). Диоксид хлора также индуцирует экспрессию генов матрикса биопленки зависимым от гистидинкиназы KinC способом (Shemesh et al., 2010). Диоксид хлора, в отличие от сурфактина, запускает активацию гистидинкиназы KinC путем нарушения мембранного потенциала клетки. Увеличение синтеза компонентов матрикса в присутствии ингибиторов, нарушающих структуру мембраны, необходимо для выживания *B. subtilis*, когда экзополисахарид обеспечивает защиту от летальных последствий воздействия этих соединений.

Циклические липопептиды и особенно сурфактины, продуцируемые *Bacillus* sp., запускают формирование биопленки и колонизацию корней и имеют решающее значение для активности биоконтроля и системной устойчивости растений (Aletí et al., 2016). Важная функция сурфактина заключается в его способности разрушать мембранные везикулы у бацилл (Brown et al., 2014). Везикулы образуются клетками биопленки *B. subtilis*. Кодированный профагом эндолизин может генерировать отверстия в клеточной стенке, через которые материал цитоплазматической мембраны выступает и выделяется в виде везикул (Brown et al., 2015; Toyofuku et al., 2017). Везикулы могут инкапсулировать важные для сообщества факторы и быть необходимыми для его выживания. Сурфактин лизирует внеклеточные везикулы с высвобождением содержимого у грамположительных бактерий.

У мутантов *B. subtilis* с нарушениями в синтезе матрикса с помощью транскрипционных репортеров наблюдали пролонгированную экспрессию *eps*- и *tasA*-оперонов и замедленную споруляцию в биопленке (Aguilar et al., 2010). Это связано с функционированием киназы KinD *B. subtilis*, обладающей киназной и фосфатазной активностями. В качестве фосфатазы KinD участвует в сохранении низкого уровня фосфорилированного Spo0A-P, что сопровождается формированием матрикса биопленки, и в качестве киназы KinD способствует развитию процесса спорообразования. Транскрипция основных оперонов, ответственных за образование матрикса, значительно усиливалась в ответ на присутствие в среде глицери-

на и марганца путем активации гистидинкиназы KinD, ответственной за восприятие присутствия этих соединений вне клетки (Shemesh et al., 2013). Есть данные, что KinD активируется в ответ на соединения, продуцируемые почвенными микроорганизмами и экссудатом корней растений (Chen et al., 2012).

Все генетические каскады контролируются семейством Rap фосфатаз, которые специфически взаимодействуют с экзогенными родственными пептидами (Phr-пептиды) (Veening et al., 2005). Известно, что фосфатаза RapGH дефосфорилирует DegU-P, в то время как фосфатаза RapABEJ действует на передачу фосфата в Spo0A-фосфореле, а фосфатаза RapCFGHK – на ComA-P. Вместе они могут представлять альтернативную систему передачи сигналов между клетками, нацеленную на реализацию программы бистабильности у *B. subtilis*, участвуют в регуляции процессов специализации и коллективного поведения, что обеспечивает взаимодействие и выживание вида (Verdugo-Fuentes et al., 2020).

Полная сеть регуляции Phr–Rap у *B. subtilis* далека от понимания из-за сложности регуляторных каскадов. Идентифицирован дополнительный уровень сложности в контроле сетей сигнализации у *B. subtilis*. Мембрана бацилл организована в микродомены, целостность которых важна для активации гистидинкиназы KinC и, следовательно, для дифференцировки клеток Spo0A-ON (Lopez, 2015). Показано, что для мембраны бацилл характерна компарментализация путей передачи сигнала через функциональные мембранные микродомены, которые играют важную роль в активации каскадов сигнальной трансдукции (Wagner et al., 2017). В составе микродоменов идентифицирована мембраносвязанная протеиназа FtsH, избирательно гидролизующая специфические Rap фосфатазы (Mielich-Suss et al., 2013). Поэтому целостность микродоменов цитоплазматической мембраны *B. subtilis* необходима для индукции формирования биопленки путем сохранения и стабилизации белков FtsH и KinC. Нарушения мембранных микродоменов (сарагозиновой кислотой) приводят к ингибированию сигнальных каскадов, ведущих к образованию биопленки у *B. subtilis* (Lopez, 2015; Wagner et al., 2017). Точно так же, протеиназная активность белка FtsH ингибируется пептидом SpoVM, который может использоваться в качестве ингибитора биопленки (Yepes et al., 2012). Причем микродомены ограничены набором белков, участвующих в специфических клеточных процессах, таких как секреция протеиназ и трансдукция сигнала (Lopez, Koch, 2017).

У *B. subtilis* для запуска генов, кодирующих компоненты матрикса, могут быть использованы не сигнальные механизмы. Так, в дополнение к

механизмам активации транскрипции генов для синтеза матриксного полимера при низком уровне содержания в клетках фосфорилированного Spo0A-P у *B. subtilis* происходит экспрессия двух генных кластеров “каннибализма”, в результате часть клеток популяции синтезирует и секретирует токсичные пептиды SDP и SKF. Бактерии, которые синтезируют токсины, сами являются устойчивыми к этим токсичным пептидам (Höfler et al., 2016). Для транспорта пептида SKF во внеклеточное пространство необходим ABC-транспортер, который удаляет этот токсин из клетки (Gonzalez-Pastor, 2011). Устойчивость бактерий к другому пептиду SDP обусловлена наличием в мембране специфического белка SdpI, синтез которого индуцируется в присутствии токсичного SDP в клетках с высокой концентрацией фосфорилированного регуляторного белка Spo0A-P (Ellermeier et al., 2006; Kobayashi, Ikemoto, 2019). Клетки-каннибалы выделяют токсичные пептиды, которые целенаправленно убивают клетки *B. subtilis*, не экспрессирующие гены токсинов. Поскольку гены, кодирующие токсины, и гены, кодирующие полимер матрикса, активируются при низком уровне фосфорилированного регуляторного белка Spo0A-P, популяции клеток, формирующих биопленку, и клеток, синтезирующих токсичные пептиды, перекрываются (Lopez et al., 2009). В результате клетки, которые инициировали синтез полимера матрикса, выделяют также токсичные пептиды, направленные на уменьшение популяции клеток, не продуцирующих матрикс биопленки. Это приводит к формированию популяции, состоящей из увеличенного количества клеток, продуцирующих матрикс. Токсины каннибализма не только убивают клетки *B. subtilis*, но и клетки других видов, когда *B. subtilis* выращивается в смешанных культурах (Liu et al., 2010). При совместном культивировании *B. subtilis* (опыты проводились с использованием флуоресцентных репортеров для матричных генов) с другими почвенными микроорганизмами в присутствии индукторов для образования биопленки было обнаружено, что подавляющее большинство составляли представители рода *Bacillus*, несмотря на разнообразие бактерий в образцах почвы.

Таким образом, разнообразные сигнальные молекулы, от сурфактина до токсинов каннибализма, могут способствовать росту числа клеток для стимуляции образования биопленки в популяции. Это происходит с помощью передачи сигналов, приводящих к дифференциальной экспрессии генов, или путем избирательного уничтожения клеток *B. subtilis*, не синтезирующих полимерный матрикс биопленки.

РАССЕИВАНИЕ И ДИССОЦИАЦИЯ БИОПЛЕНКИ

Бактериальные биопленки важны в естественных условиях, для биотехнологии и медицины. Однако понимание регуляции развития биопленки и ее сохранения в разных нишах является далеко не полным. Важной стадией в течение жизненного цикла биопленки является рассеивание, когда подвижные клетки покидают зрелую биопленку, чтобы распространиться и колонизировать новые ниши (Плакунов и соавт., 2017). Триггерами выступают различные экзо- и эндогенные факторы: изменение доступности питательных веществ, бактериальные аутоиндукторы, жирные кислоты, пептидные сигналы, оксид азота, стресс-сигналы (голод, избыток железа, фосфатов и др.). Такие сигналы приводят к изменению концентрации вторичных мессенджеров – циклического дигуанозинмонофосфата (c-di-GMP) и циклического диаденилатмонофосфата (c-di-AMP), гуанозинтетрафосфата (ppGpp), гуанозинпентафосфата (pppGpp) и малых регуляторных РНК, которые изменяют активность экспрессии бактериальных генов (Romling, Galperin, 2017; Townsley et al., 2018). Процесс рассеивания биопленки контролируется путем регуляции на уровне транскрипции оперонов, кодирующих матрикс биопленки. Установлено, что в определенных клетках бактерий *B. subtilis* запускается механизм ингибирования экспрессии генов матрикса, и они возвращаются в состояние планктонных клеток (Vlamakis et al., 2013; Norgman et al., 2013). На уровне экспрессии генов это происходит в результате снижения уровня антирепрессора SlrR по мере созревания биопленки, что связано с его нестабильностью в результате расщепления протеиназой ClpCP и как результат ауторазаживания (Chai et al., 2010). Расщепление регулятора SlrR позволяет репрессору SinR взаимодействовать с областями промоторов оперонов матрикса, ингибируя биосинтез компонентов матрикса (Ogura, 2016; Milton et al., 2020).

Установлено, что у *B. subtilis* транскрипционный фактор SigB, активирующийся на общий стресс, необходим для остановки разрастания зрелой биопленки и запуска механизма рассеивания, когда питательные вещества становятся ограниченными (Bartolini et al., 2018). В частности, биопленки с дефектным геном *sigB* были больше, чем биопленки дикого типа, но демонстрировали ускоренную гибель клеток, большую чувствительность к стрессам и снижению дисперсии. Причем обнаружена регуляторная взаимосвязь между фактором SigB и экспрессией репрессора SinR. Эта новая регуляторная схема SigB–SinR важна для контроля пригодности биопленок в различных средах, в которой регуляторный статус факторов SigB и SinR определяет, остаются клетки в биопленке или по-

кидают ее, если условия становятся неблагоприятными.

Диссоциация биопленки основана на контролируемом расщеплении макромолекул ее матрикса во внеклеточной среде (Плакунов и соавт., 2017). В этом процессе могут участвовать внеклеточные протеиназы (Marlow et al., 2014a). Имеются данные, что субтилизиноподобная протеиназа наттокиназа *B. subtilis* (Dabbagh et al., 2014) и субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* способны разрушать амилоидный пептид (Danilova et al., 2014). Можно предположить, что внеклеточные протеиназы бацилл участвуют в разборке волокон TasA матрикса биопленки (Mitrofanova et al., 2017). Поиск путей для изучения диссоциации биопленок является важной социальной проблемой. Эти данные полезны при искоренении хронических инфекций, для предотвращения закупорки трубопроводов и др. (Hobley et al., 2015; Velmourougane et al., 2017; Vaccari et al., 2017). D-аминокислоты, добавленные к биопленочным культурам, вызывали диссоциацию биопленок *B. subtilis* путем включения в пептидогликан и блокирования встраивания TapA белка в клеточную стенку, что приводило к деградации волокон TasA (Romero et al., 2014; Yu et al., 2016). Инкорпорация D-аминокислот в белки может быть предотвращена в присутствии D-аминоацил-тРНК-деацилазы, которая удаляет D-аминокислоты из неправильно заряженных тРНК, штамм *B. subtilis* с мутацией в гене D-аминоацил-тРНК-деацилазы (ген *did*) характеризовался подавлением биопленки, когда мутация была устранена, ингибирование биопленки не наблюдалось (Leiman et al., 2013). Молекулярная основа токсичности D-аминокислот зависит от способности замещать соответствующие L-изомеры во время синтеза белка и вызывать нарушение в функционировании белков.

Другое соединение, способное участвовать в диссоциации биопленок, представляет собой полиамин норспермидин (Si et al., 2015; Wu et al., 2016). Норспермидин может специфически взаимодействовать с экзополисахаридом матрикса и вызывать нарушения в структуре биопленок, при этом мутанты *B. subtilis*, неспособные продуцировать норспермидин, формировали долгоживущие биопленки (Kolodkin-Gal et al., 2012). Биоинформатический поиск генов-гомологов пути биосинтеза норспермидина *E. coli* в геноме *B. subtilis* не выявил гомологичных генов (Hobley et al., 2014). Тем не менее, эти исследования показали, что такие специфические триггеры биопленки, как D-аминокислоты и норспермидин, способны дестабилизировать матриксный полимер зрелой биопленки *B. subtilis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

B. subtilis является исключительно удобным модельным организмом для исследований многообразия регуляторных путей стационарной фазы этих бактерий, поскольку они способны к выживанию в широком диапазоне физико-химических условий, включая экстремальные. В геноме этих бактерий наряду с генетической информацией о спорообразовании заложена информация о механизмах биосинтеза и дисперсии биопленок, основанная на сложных генетических программах, ответственных за создание единого сообщества субпопуляций генетически идентичных, но фенотипически различных клеток, которое является формальным аналогом сложных многоклеточных организмов (Kovacs, Dragos, 2019). Для биопленок *B. subtilis* выявлен эффект, сходный с так называемым “родственным отбором” (kin-selection), характерным для высших организмов и приводящим к обеспечению жизнеспособности дочерних клеточных поколений. Бистабильность, выраженная в фенотипическом изменении клеток, способствует приспособляемости вида, поскольку субпопуляции взаимовыгодно взаимодействуют внутри сообщества, а гетерогенная популяция способна быстро реагировать на любые изменения окружающей среды. Для *B. subtilis* идентифицирована развитая сеть регуляторных систем, участвующих в образовании гетерогенного микробного сообщества, установлены сигнальные и регуляторные пути, которые запускают формирование биопленки. Среди них одним из центральных событий является активация транскрипционного фактора Spo0A, запускающего экспрессию генных кластеров, кодирующих матрикс биопленки, в ответ на широкий спектр внеклеточных сигналов. Одной из особенностей клеток *B. subtilis*, формирующих биопленку, является синтез и секреция токсичных пептидов каннибализма для подавления клеток, не синтезирующих внеклеточные полимеры матрикса. Реальные механизмы регуляции могут быть более многообразными, поскольку бактерии *B. subtilis* в природе обитают в сообществе с корнями растений или в присутствии других организмов (Бузолева и соавт., 2016; Yannarell et al., 2019; Hashem et al., 2019; Vbka et al., 2019). В связи с этим, многие проблемы в развитии биопленок *B. subtilis* остаются нерешенными. Комплексный анализ регуляторных схем привел к открытию новых способов регуляции для бактерий, включая впервые описанное глобальное ацетилирование белков (Reverdy et al., 2018) или открытие особых участков, мембранных функциональных микродоменов, эквивалентных липидным рафтам в плазматических мембранах эукариотических клеток (Lopez, 2015; Bramkamp et al., 2015; Lopez, Koch, 2017; Wagner et al., 2017). Процесс передачи сигналов через регуляторные каскады сигналь-

ной трансдукции у бацилл происходит при участии мембранных микродоменов в соответствии с набором окружающих факторов. Структурная организация микродоменов показала неожиданный уровень сложности, что стало беспрецедентным для бактерий, поскольку бактерии являются более сложными организмами, чем считалось ранее. Более того, данные свидетельствуют о том, что мембранные микродомены широко распространены среди бактерий. В отличие от информации о регуляции механизмов образования биопленки, изучение путей контроля за рассеиванием и диссоциацией биопленки у *B. subtilis* находится в начальном состоянии. Вопросы, которые предстоит решить, связаны с синтезом специфических пептидов и D-аминокислот, участвующих в разборке биопленки в разных условиях, кроме того, предстоит определить внешние и внутренние стимулы, запускающие эти процессы. Такие исследования имеют не только фундаментальную, но и практическую значимость и нацелены, в том числе, на борьбу с биопленками, формируемыми патогенными организмами, для разработки эффективных способов новой комбинированной терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантами РФФИ 16-16-04062 и РФФИ 19-08-00853.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Гильванова Е.А., Рябова А.С., Сафина В.Р., Пудова Е.А., Кузьмина Л.Ю., Бойко Т.Ф., Мелентьев А.И. Влияние источников углерода и минеральных солей на формирование биопленок и синтез циклических липопептидов RGPB-штаммами *Bacillus* и *Paenibacillus* // Экобиотех. 2019. Т. 2. С. 468–481.
- Бузолева Л.С., Цветкова Н.Б., Богатыренко Е.А. Формирование биопленок бактериями *Listeria monocytogenes* разных серовариантов в ассоциации с *Bacillus pumilus* // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 293–299.
- Buzoleva L.S., Bogatyrenko E.A., Tsvetkova N.B. Biofilm formation by different serological variants of *Listeria monocytogenes* in association with *Bacillus pumilus* // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 311–316.
- Каюмов А.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Костров С.В., Шарипова М.Р. Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* в условиях солевого стресса // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 557–563.
- Kayumov A.R., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Kostrov S.V. Biosynthesis of the subtilisin-like serine proteinase of *Bacillus intermedius* under salt stress conditions // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 557–562.
- Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 484–489.
- Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. A universal method for quantitative characterization of growth and metabolic activity of microbial biofilms in static models // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 509–513.
- Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиотические агенты // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 402–420.
- Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. Controlling of microbial biofilms formation: anti- and probiofilm agents // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 423–438.
- Пономарева А.Л., Бузолева Л.С., Богатыренко Е.А. Абиотические факторы внешней среды, влияющие на формирование биопленок микроорганизмов // Известия РАН. Сер. биол. 2018. Т. 45. С. 549–556.
- Ponomareva A.L., Buzoleva L.S., Bogatyrenko E.A. Abiotic environmental factors affecting the formation of microbial biofilms // Biol. Bull. 2018. V. 45. P. 490–496.
- Стрелкова Е.А., Позднякова Н.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 131–138.
- Strelkova E.A., Pozdnyakova N.V., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Role of the extracellular polymer matrix in resistance of bacterial biofilms to extreme environmental factors // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 119–125.
- Aguilar C., Vlamakis H., Guzman A., Losick R., Kolter R. *KinD* is a checkpoint protein linking spore formation to extracellular-matrix production in *Bacillus subtilis* biofilms // MBio. 2010. V. 1. P. e00035-10.
- Aleti G., Lehner S., Bacher M., Compant S., Nikolic B., Pleško M., Schuhmacher R., Sessitsch A., Brader G. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus* // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 2634–2645.
- Arnaouteli S., Ferreira A.S., Schor M., Morris R.J., Bromley K.M., Jo J. Bifunctionality of a biofilm matrix protein controlled by redox state // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 6184–6191.
- Asally M., Kittisopikul M., Rue P., Du Y., Hu Z., Cagatay T. Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 18891–18896.

- Balasubramanian S., Aubin-Tam M.E., Meyer A.S. 3D Printing for the fabrication of biofilm-based functional living materials // ACS Synth. Biol. 2019. V. 8. P. 1564–1567.
- Bareia T., Pollak S., Eldar A. Self-sensing in *Bacillus subtilis* quorum-sensing systems // Nat. Microbiol. 2018. V. 3. P. 83–89.
- Bartolini M., Cogliati S., Vileta D., Bauman C., Rateni L., Leñini C., Argañaraz F., Francisco M., Villalba J.M., Steil L., Völker U., Grau R. Regulation of biofilm aging and dispersal in *Bacillus subtilis* by the alternative sigma factor SigB // J. Bacteriol. 2018. V. 201. P. e00473-18.
- Benigar E., Dogsa I., Stopar D., Jamnik A., Kralj Cigic I., Tomsic M. Structure and dynamics of a polysaccharide matrix: aqueous solutions of bacterial levan // Langmuir. 2014. V. 30. P. 4172–4182.
- Bóka B., Manczinger L., Kocsubé S., Shine K., Alharbi N.S., Khaled J.M., Münsterkötter M., Vágvölgyi C., Kredics L. Genome analysis of a *Bacillus subtilis* strain reveals genetic mutations determining biocontrol properties // World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35. P. 52.
- Bramkamp M., Lopez D. Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. Version 2 // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015. V. 79. P. 81–100.
- Branda S.S., Chu F., Kearns D.B., Losick R., Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix // Mol. Microbiol. 2006. V. 59. P. 1229–1238.
- Branda S.S., Gonzalez-Pastor J.E., Ben-Yehuda S., Losick R., Kolter R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 11621–11626.
- Brinsmade S.R., Alexander E.L., Livny J., Stettner A.I., Segre D., Rhee K.Y., Sonenshein A.L. Hierarchical expression of genes controlled by the *Bacillus subtilis* global regulatory protein CodY // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 8227–8232.
- Brown L., Kessler A., Cabezas-Sanchez P., Luque-Garcia J.L., Casadevall A. Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin // Mol. Microbiol. 2014. V. 93. P. 183–198.
- Brown L., Kessler A., Casadevall A. Vesicle isolation from *Bacillus subtilis* biofilm // Bio Protoc. 2015. V. 5. P. e1409.
- Cairns L.S., Hobbey L., Stanley-Wall N.R. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms // Mol. Microbiol. 2014. V. 93. P. 587–598.
- Cámara-Almirón J., Navarro Y., Díaz-Martínez L., Magno-Pérez-Bryan M.C., Molina-Santiago C., Pearson J.R., Vicente A., Pérez-García A., Romero D. Dual functionality of the amyloid protein TasA in *Bacillus* physiology and fitness on the phylloplane // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 1859.
- Chai L., Romero D., Kayatekin C., Akabayov B., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Isolation, characterization, and aggregation of a structured bacterial matrix precursor // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 17559–17568.
- Chai Y., Beauregard P.B., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis* // MBio. 2012. V. 3. P. e00184-12.
- Chai Y., Kolter R., Losick R. Paralogous antirepressors acting on the master regulator for biofilm formation in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. 2009. V. 74. P. 876–887.
- Chai Y., Kolter R., Losick R. Reversal of an epigenetic switch governing cell chaining in *Bacillus subtilis* by protein instability // Mol. Microbiol. 2010. V. 78. P. 218–229.
- Chai Y., Norman T., Kolter R., Losick R. Evidence that metabolism and chromosome copy number control mutually exclusive cell fates in *Bacillus subtilis* // EMBO J. 2011. V. 30. P. 1402–1413.
- Chan J.M., Guttenplan S.B., Kearns D.B. Defects in the flagellar motor increase synthesis of polygamma-glutamate in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 2014. V. 196. P. 740–753.
- Chastanet A., Losick R. Just-in-time control of Spo0A synthesis in *Bacillus subtilis* by multiple regulatory mechanisms // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 6366–6374.
- Chen Y., Cao S., Chai Y., Clardy J., Kolter R., Guo J.H., Losick R. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants // Mol. Microbiol. 2012. V. 85. P. 418–430.
- Chen Y., Gozzi K., Yan F., Chai Y. Acetic acid acts as a volatile signal to stimulate bacterial biofilm formation // mBio. 2015. V. 6. P. e00392.
- Cheremin M., Nyamsuren Ch., Toimentseva A.A., Sharipova M.R. Optimization of the expression of the subtilisin-like protease from *Bacillus pumilus* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. V. 40. P. 694–698.
- Chumsakul O., Takahashi H., Oshima T., Hishimoto T., Kanaya S., Ogasawara N., Ishikawa S. Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation // Nucl. Acids. Res. 2011. V. 39. P. 414–428.
- Dabbagh F., Negahdaripour M., Berenjian A., Behfar A., Mohammadi F., Zamani M., Irajie C., Ghasemi Y. Nattokinase: production and application // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 9199–9206.
- Danilova Y.V., Shagimardanova E.I., Margulis A.B., Toymentseva A.A., Balaban N.P., Rudakova N.L., Rizvanov A.A., Sharipova M.R., Palotas A. Bacterial enzymes effectively digest Alzheimer's P-amyloid peptide // Brain. Res. Bull. 2014. V. 108. P. 113–117.
- DeLoughery A., Dengler V., Chai Y., Losick R. Biofilm formation by *Bacillus subtilis* requires an endoribonuclease-containing multisubunit complex that controls mRNA levels for the matrix gene repressor SinR // Mol. Microbiol. 2016. V. 99. P. 425–437.
- Devi S.N., Kiehler B., Hagggett L., Fujita M. Evidence that autophosphorylation of the major sporulation kinase in *Bacillus subtilis* is able to occur in trans // J. Bacteriol. 2015. V. 197. P. 2675–2684.
- Diehl A., Roske Y., Ball L., Chowdhury A., Hiller M., Molière N., Kramer R., Stöppler D., Worth C.L., Schlegel B., Leidert M., Cremer N., Erdmann N., Lopez D., Stephanowitz H., Krause E., van Rossum B.-J., Schmieder P., Heinemann U., Turgay K., Akbey Ü., Oschkinat H. Structural changes of TasA in biofilm formation of *Bacillus subtilis* // PNAS. 2018. V. 115. P. 3237–3242.
- Dogsa I., Brložnik M., Stopar D., Mandić-Mulec I. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms // PLoS One. 2013. V. 8. P. e62044.
- Dragos A., Kovacs A.T., Claessen D. The role of functional amyloids in multicellular growth and development of Gram-positive bacteria // Biomolecules. 2017. V. 7. P. 60.

- Dragos A., Kovacs B.T. The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix // Trends Microbiol. 2017. V. 25. P. 257–266.
- Ellermeier C.D., Hobbs E.C., Gonzalez-Pastor J.E., Losick R. A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin // Cell. 2006. V. 124. P. 549–559.
- Fu H., Elena R.C., Marquez P.H. The roles of small RNAs: insights from bacterial quorum sensing // ExRNA. 2019. V. 1. P. 32.
- Fuchs F.M., Holland G., Moeller R., Laue M. Directed freeze-fracturing of *Bacillus subtilis* biofilms for conventional scanning electron microscopy // J. Microbiol. Methods. 2018. V. 152. P. 165–172.
- Fujita M., Gonzalez-Pastor J.E., Losick R. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 1357–1368.
- Gabdrakhmanova L., Vishniakov I., Sharipova M., Balaban N., Kostrov S., Leshchinskaya I. Salt stress induction of glutamyl endopeptidase biosynthesis in *Bacillus intermedius* // Microbiol. Res. 2005. V. 160. P. 233–242.
- Gallegos-Monterrosa R., Mhatre E., Kovács A.T. Specific *Bacillus Subtilis* 168 variants form biofilms on nutrient-rich medium // Microbiology (SGM). 2016. V. 162. P. 1922–1932.
- Gingichashvili S., Duanis-Assaf D., Shemesh M., Featherstone J.D.B., Feuerstein O., Steinberg D. The adaptive morphology of *Bacillus subtilis* biofilms: a defense mechanism against bacterial starvation // Microorganisms. 2019. V. 8. P. 62.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8010062>
- Gonzalez-Pastor J.E. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Rev. 2011. V. 35. P. 415–424.
- Grau R.R., de Oña P., Kunert M., Leñini C., Gallegos-Monterrosa R., Mhatre E., Vileta D., Donato V., Hölscher T., Boland W., Kuipers O.P., Kovács A.T. A duo of potassium-responsive histidine kinases govern the multicellular destiny of *Bacillus subtilis* // mBio. 2015. V. 6. P. e00581.
- Greenwich J., Reverdy A., Gozji K., Di Cecco G., Tashjian T., Godoy-Carter V., Chai Y. A Decrease in serine levels during growth transition triggers biofilm formation in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 2019. V. 201. P. e00155-19.
- Guttenplan S.B., Kearns D.B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation // FEMS Microbiol. Rev. 2013. V. 37. P. 849–871.
- Hamon M.A., Stanley N.R., Britton R.A., Grossman A.D., Lazazzera B.A. Identification of *AbrB*-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. 2004. V. 52. P. 847–860.
- Hashem A., Tabassum B., Fathi Abd Allah E. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress // Saudi J. Biol. Sci. 2019. V. 26. P. 1291–1297.
- Hobley L., Harkins C., MacPhee C.E., Stanley-Wall N.R. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39. P. 649–669.
- Hobley L., Kim S.H., Maezato Y., Wylie S., Fairlamb A.H., Stanley-Wall N.R., Michael A.J. Norspermidine is not a self-produced trigger for biofilm disassembly // Cell. 2014. V. 156. P. 844–854.
- Hobley L., Li B., Wood J.L., Kim S.H., Naidoo J., Ferreira A.S., Khomutov M., Khomutov A., Stanley-Wall N.R., Michael A.J. Spermidine promotes *Bacillus subtilis* biofilm formation by activating expression of the matrix regulator *slrR* // J. Biol. Chem. 2017. V. 292. P. 12041–12053.
- Höfler C., Heckmann J., Fritsch A., Popp P., Gebhard S., Fritz G. Cannibalism stress response in *Bacillus subtilis* // Microbiology (SGM). 2016. V. 162. P. 164–176.
- Hollenbeck E.C., Douarache C., Allain J.M., Roger P., Regard C., Cegelski L., Fuller G.G., Raspaud E. Mechanical behavior of a *Bacillus subtilis* pellicle // J. Phys. Chem. B. 2016. V. 120. P. 6080–6088.
- Huang J., Liu S., Zhang C., Wang X., Pu J., Ba F., Xue S., Ye H., Zhao T., Li K., Wang Y., Zhang J., Wang L., Fan C., Lu T.K., Zhong C. Programmable and printable *Bacillus subtilis* biofilms as engineered living materials // Nat. Chem. Biol. 2018. V. 15. P. 34–41.
- Irnov I., Winkler W.C. A regulatory RNA required for anti-termination of biofilm and capsular polysaccharide operons in *Bacillales* // Mol. Microbiol. 2010. V. 76. P. 559–575.
- Jiang M., Shao W., Perego M., Hoch J.A. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. 2000. V. 38. P. 535–542.
- Jones S.E., Paynich M.L., Kearns D.B., Knight K.L. Protection from intestinal inflammation by bacterial exopolysaccharides // J. Immunol. 2014. V. 192. P. 4813–4820.
- Kalamara M., Spacapan M., Mandic-Mulec I., Stanley-Wall N.R. Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond // Mol. Microbiol. 2018. V. 110. P. 863–878.
- Kampf J., Gerwig J., Kruse K., Cleverley R., Dormeyer M., Grunberger A., Kohlheyer D., Commichau F.M., Lewis R.J., Stulke J. Selective pressure for biofilm formation in *Bacillus subtilis*: differential effect of mutations in the master regulator SinR on bistability // mBio. 2018. V. 9. P. e01464-18.
- Kesel S., Bronk B., García C.F., Götz A., Lieleg O., Opitz M. Matrix composition determines the dimensions of *Bacillus subtilis* NCIB 3610 biofilm colonies grown on LB agar // RSC Adv. 2017. V. 7. P. 31886–31898.
- Khezri M., Jouzani G.S., Ahmadzadeh M. *Fusarium culmorum* affects expression of biofilm formation key genes in *Bacillus subtilis* // Braz. J. Microbiol. 2016. V. 47. P. 47–54.
- Kobayashi K. Inactivation of *cysL* inhibits biofilm formation by activating the disulfide stress regulator Spx in *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 2019. V. 201.
<https://doi.org/10.1128/JB.00712-18>
- Kobayashi K., Ikemoto Y. Biofilm-associated toxin and extracellular protease cooperatively suppress competitors in *Bacillus subtilis* biofilms // PLoS Genet. 2019. V. 15. P. e1008232.
- Kobayashi K., Iwano M. BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms // Mol. Microbiol. 2012. V. 85. P. 51–66.
- Kolodkin-Gal I., Cao S., Chai L., Bottcher T., Kolter R., Clardy J., Losick R. A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide // Cell. 2012. V. 149. P. 684–692.
- Kolodkin-Gal I., Elsholz A.K., Muth C., Girguis P.R., Kolter R., Losick R. Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a mem-

- brane-embedded histidine kinase // *Genes Dev.* 2013. V. 27. P. 887–899.
- Kovacs A.T., Dragos A. Evolved biofilm: review on the experimental evolution studies of *Bacillus subtilis* pellicles // *J. Mol. Biol.* 2019. V. 431. P. 4749–4759.
- Lazarevic V., Soldo B., Medico N., Pooley H., Bron S., Karamata D. *Bacillus subtilis* α -phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 39–45.
- Leiman S.A., May J.M., Lebar M.D., Kahne D., Kolter R., Losick R. D-amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. P. 5391–5395.
- Liu W.T., Yang Y.L., Xu Y., Lamsa A., Haste N.M., Yang J.Y., Dorrestein P.C. Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 16286–16290.
- Lopez D. Molecular composition of functional microdomains in bacterial membranes // *Chem. Phys. Lipids.* 2015. V. 192. P. 3–11.
- Lopez D., Koch G. Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview // *Curr. Opin. Microbiol.* 2017. V. 36. P. 76–84.
- Lopez D., Kolter R. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. P. 134–149.
- Lopez D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 74. P. 609–618.
- Lyons N.A., Kraigher B., Stefanic P., Mandic-Mulec I., Kolter R. A Combinatorial kin discrimination system in *Bacillus subtilis* // *Curr. Biol.* 2016. V. 26. P. 733–742.
- Mammeri N.E., Hierrezuelo J., Tolchard J., Cámara-Almirón J., Caro-Astorga J., Álvarez-Mena A., Dutour A., Berbon M., Shenoy J., Morvan E., Grélard A., Kauffmann B., Lecomte S., de Vicente A., Habenstein B., Romero D., Loquet A. Molecular architecture of bacterial amyloids in *Bacillus* biofilms // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 12146–12163.
- Marlow V.L., Cianfanelli F.R., Porter M., Cairns L.S., Dale J.K., Stanley-Wall N.R. The prevalence and origin of exoprotease-producing cells in the *Bacillus subtilis* biofilm // *Microbiology (SGM).* 2014a. V. 160. P. 56–66.
- Marlow V.L., Porter M., Hopley L., Kiley T.B., Swedlow J.R., Davidson F.A., Stanley-Wall N.R. Phosphorylated DegU manipulates cell fate differentiation in the *Bacillus subtilis* biofilm // *J. Bacteriol.* 2014b. V. 196. P. 16–27.
- Martin M., Dragoš A., Otto S.B., Schäfer D., Brix S., Maróti G., Kovács Á.T. Cheaters shape the evolution of phenotypic heterogeneity in *Bacillus subtilis* biofilms // *ISME J.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0685-4>
- Marvasi M., Visscher P.T., Casillas Martinez L. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis // *FEMS Microbiol. Lett.* 2010. V. 313. P. 1–9.
- McLoon A.L., Kolodkin-Gal I., Rubinstein S.M., Kolter R., Losick R. Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 679–685.
- Mielich-Suss B., Lopez D. Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 555–565.
- Mielich-Suss B., Schneider J., Lopez D. Overproduction of flotillin influences cell differentiation and shape in *Bacillus subtilis* // *mBio.* 2013. V. 4. P. e00719-00713.
- Milton M.E., Draughn G.L., Bobay B.G., Stowe S.D., Olson A.L., Feldmann E.A., Thompson R.J., Myers K.H., Santoro M.T., Kearns D.B., Cavanagh J. The solution structures and interaction of SinR and SinI: elucidating the mechanism of action of the master regulator switch for biofilm formation in *Bacillus subtilis* // *J. Mol. Biol.* 2020. V. 432. P. 343–357.
- Mitrofanova O., Mardanov A., Evtugyn V., Bogomolnaya L., Sharipova M. Effects of *Bacillus* serine proteases on the bacterial biofilms // *Biomed. Res. Int.* 2017. V. 2017. P. 10.
- Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R., Kanaya S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces β -polyglutamate // *Microbiology (SGM).* 2006. V. 152. P. 2801–2807.
- Nagorska K., Ostrowski A., Hinc K., Holland I.B., Obuchowski M. Importance of eps genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming // *J. Appl. Genet.* 2010. V. 51. P. 369–381.
- Newman J.A., Lewis R.J. Exploring the role of SlrR and SlrA in the SinR epigenetic switch // *Commun. Integr. Biol.* 2013. V. 6. P. e25658.
- Norman T.M., Lord N.D., Paulsson J., Losick R. Memory and modularity in cell-fate decision making // *Nature.* 2013. V. 503. P. 481–486.
- Ogura M. Post-transcriptionally generated cell heterogeneity regulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* // *Genes Cells.* 2016. V. 21. P. 335–349.
- Ogura M., Yoshikawa H., Chibazakura T. Regulation of the response regulator gene *degU* through the binding of SinR/SlrR and exclusion of SinR/SlrR by DegU in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2014. V. 196. P. 873–881.
- Okada M., Sato I., Cho S.J., Iwata H., Nishio T., Dubnau D., Sakagami Y. Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX // *Nat. Chem. Biol.* 2005. V. 1. P. 23–24.
- Ostrowski A., Mehert A., Prescott A., Kiley T.B., Stanley-Wall N.R. YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 4821–4831.
- Peng N., Cai P., Mortimer M., Wu Y., Gao C., Huang Q. The exopolysaccharide–eDNA interaction modulates 3D architecture of *Bacillus subtilis* biofilm // *BMC Microbiol.* 2020. V. 20. P. 115.
- Penha R.O., Vandenberghe L., Faulds C., Socol V.T., Socol C.R. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations // *Planta.* 2020. V. 251. P. 70.
- Pisithkul T., Schroeder J.W., Trujillo E.A., Yeasin P., Stevenson D.M., Chaiamarit T., Coon J.J., Wang J.D., Amador-Noguez D. Metabolic remodeling during biofilm development of *Bacillus subtilis* // *mBio.* 2019. V. 10. P. e00623-19.
- Pollak S., Omer-Bendori S., Even-Tov E., Lipsman V., Bareia T., Ben-Zion I., Eldar A. Facultative cheating supports the coexistence of diverse quorum-sensing alleles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 2152–2157.
- Raga-Carbajal E., Carrillo-Nava E., Costas M., Porrás-Domínguez J., López-Munguía A., Olvera C. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct

- levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase // *Glycobiology*. 2016. V. 26. P. 377–385.
- Reverdy A., Chen Y., Hunter E., Gozzi K., Chai Y. Protein lysine acetylation plays a regulatory role in *Bacillus subtilis* multicellularity // *PLoS One*. 2018. V. 13. P. e0204687.
- Romero D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Functional analysis of the accessory protein TapA in *Bacillus subtilis* amyloid fiber assembly // *J. Bacteriol.* 2014. V. 196. P. 1505–1513.
- Römling U., Galperin M.Y. Discovery of the second messenger cyclic di-GMP // *Meth. Mol. Biol.* 2017. V. 1657. P. 1–8.
- Roux D., Cywes-Bentley C., Zhang Y.-F., Pons S., Konkol M., Kearns D.B. Identification of poly-N-acetylglucosamine as a major polysaccharide component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 19261–19272.
- Ryan-Payseur B.K., Freitag N.E. *Bacillus subtilis* biofilms: a matter of individual choice // *mBio*. 2018. V. 9. P. e02339-18.
- Schafer H., Turgay K. Spx, a versatile regulator of the *Bacillus subtilis* stress response // *Curr. Genet.* 2019. V. 65. P. 871–876.
- Schultz D. Coordination of cell decisions and promotion of phenotypic diversity in *B. subtilis* via pulsed behavior of the phosphorelay // *Bioessays*. 2016. V. 38. P. 440–445.
- Sharipova M., Balaban N., Kayumov A., Kirillova Y., Mardanova A., Gabdrakhmanova, Leshchinskaya I., Rudenskaya G., Akimkina T., Safina D., Demidyuk I., Kostrov S. The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* // *Microbiol. Res.* 2008. V. 163. P. 39–50.
- Shemesh M., Chai Y. A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. P. 2747–2754.
- Shemesh M., Kolter R., Losick R. The biocide chlorine dioxide stimulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* by activation of the histidine kinase KinC // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. P. 6352–6356.
- Si X., Quan X., Wu Y. A Small-molecule norspermidine and norspermidine-hosting polyelectrolyte coatings inhibit biofilm formation by multi-species wastewater culture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 10861–10870.
- Spacapan M., Danevič T., Mandić-Mulec I. ComX-induced exoproteases degrade ComX in *Bacillus subtilis* PS-216 // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 105.
- Stanley N.R., Lazazzera B.A. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- γ -DL-glutamic acid production and biofilm formation // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 57. P. 1143–1158.
- Stover A.G., Driks A. Secretion, localization and antibacterial activity of tasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 1664–1672.
- Stowe S.D., Olson A.L., Losick R. Chemical shift assignments and secondary structure prediction of the master biofilm regulator, SinR, from *Bacillus subtilis* // *J. Biomol. NMR Assign.* 2014. V. 8. P. 155–158.
- Townsley L., Yannarell S.M., Huynh T.N., Woodward J.J., Shank E.A. Cyclic di-AMP acts as an extracellular signal that impacts *Bacillus subtilis* biofilm formation and plant attachment // *mBio*. 2018. V. 9. P. e00341-18.
- Toyofuku M., Carcamo-Oyarce G., Yamamoto T., Eisenstein F., Hsiao C.C., Kurosawa M., Gademann K., Pilhofer M., Nomura N., Eberl L. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis* // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 481.
- Trejo M., Douarache C., Bailleux V., Poulard C., Mariot S., Regeard C., Raspaud E. Elasticity and wrinkled morphology of *Bacillus subtilis* pellicles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 2011–2016.
- Tucker A.T., Bobay B.G., Banse A.V., Olson A.L., Soderblom E.J., Moseley M.A. A DNA mimic: the structure and mechanism of action for the antirepressor protein AbbA // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. P. 1911–1924.
- Vaccari L., Molaei M., Niepa T.H.R., Lee D., Leheny R.L., Stebe K.J. Films of bacteria at interfaces // *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2017. V. 247. P. 561–572.
- Veening J.W., Hamoen L.W., Kuipers O.P. Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 56. P. 1481–1494.
- Veening J.W., Igoshin O.A., Eijlander R.T., Nijland R., Hamoen L.W., Kuipers O.P. Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis* // *Mol. Syst. Biol.* 2008. V. 4. P. 184.
- Veening J.W., Kuipers O.P., Brul S., Hellingwerf K.J., Kort R. Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 3099–3109.
- Velmourougane K., Prasanna R., Saxena A.K. Agriculturally important microbial biofilms: present status and future prospects // *J. Basic Microbiol.* 2017. V. 57. P. 548–573.
- Verdugo-Fuentes A., Gastélum G., Rocha J., Torre M. Multiple and overlapping functions of quorum sensing proteins for cell specialization in *Bacillus* species // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. P. e00721-19.
- Vidakovic L., Singh P.K., Hartmann R., Nadell C.D., Drescher K. Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection // *Nat. Microbiol.* 2018. V. 3. P. 26–31.
- Vlamakis H., Chai Y., Beauregard P., Losick R., Kolter R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way // *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. V. 11. P. 157–168.
- Wagner R.M., Krick L., Lopez D. Functional membrane microdomains organize signaling networks in bacteria // *J. Membr. Biol.* 2017. V. 250. P. 367–378.
- Wang X., Meng S., Han J. Morphologies and phenotypes in *Bacillus subtilis* biofilms // *J. Microbiol.* 2017. V. 55. P. 619–627.
- Winkelman J.T., Bree A.C., Bate A.R., Eichenberger P., Gourse R.L., Kearns D.B. RemA is a DNA-binding protein that activates biofilm matrix gene expression in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2013. V. 88. P. 984–997.
- Wu Y., Quan X., Si X., Wang X. A small molecule norspermidine in combination with silver ion enhances dispersal and disinfection of multi-species wastewater biofilms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 5619–5629.
- Wu Q., Xu H., Liang J., Yao J. Contribution of glycerol on production of poly(γ -glutamic acid) in *Bacillus subtilis* NX-2 // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 160. P. 386–392.
- Yannarell S.M., Grandchamp G.M., Chen S.Y., Daniels K.E., Shank E.A. A dual-species biofilm with emergent mechan-

ical and protective properties // *J. Bacteriol.* 2019. V. 201. P. e00670-18.

Yepes A., Schneider J., Mielich B., Koch G., Garcia-Betancur J.C., Ramamurthi K.S. The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin-defective mutant involves the protease FtsH // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 86. P. 457–471.

Yu C., Li X., Zhang N., Wen D., Liu C., Li Q. Inhibition of biofilm formation by D-tyrosine: effect of bacterial type and D-tyrosine concentration // *Water Res.* 2016. V. 92. P. 173–179.

Yu Y., Yan F., He Y., Qin Y., Chen Y., Chai Y., Guo J.H. The ClpY-ClpQ protease regulates multicellular development in *Bacillus subtilis* // *Microbiology (SGM)*. 2018. V. 164. P. 848–862.

Zerriouh H., de Vicente A., Perez-Garcia A., Romero D. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity // *Environ. Microbiol.* 2014. V. 16. P. 2196–2211.

Zwick J.V., Noble S., Ellaicy Y.K., Coe G.D., Hakey D.J., King A.N., Sadauskas A.J., Faulkner M.J. AhpA is a peroxidase expressed during biofilm formation in *Bacillus subtilis* // *MicrobiologyOpen*. 2017. V. 6. P. e00403.

Bistability and Formation of the Biofilm Matrix as Adaptive Mechanisms during the Stationary Phase of *Bacillus subtilis*

M. R. Sharipova^{1,*}, A. M. Mardanova¹, N. L. Rudakova¹, and D. S. Pudova¹

¹Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: marsharipova@gmail.com

Received February 25, 2020; revised July 1, 2020; accepted July 7, 2020

Abstract—*Bacilli* control behavioral reactions such as motility, biofilm formation, production of enzymes and metabolites, differentiation, and others by integrating a variety of environmental signals through a complex regulatory network. In the natural environment, *Bacillus subtilis* exists predominantly in the form of biofilms, which has made it an ideal model for studying the molecular strategy of biofilm formation. This paper systematizes information on the main regulatory systems responsible for the loss of mobility and the formation of *B. subtilis* biofilms, analyzes the behavior of bacteria within the biofilm population, leading to a state of bistability and differentiation into different types of subpopulations. It also evaluates the regulatory relationship between control systems responsible for the synthesis of structural components in biofilm matrices. Particular emphasis is placed on data concerning signaling mechanisms that trigger the formation of a biofilm and its dispersion. In general, we summarize information about the latest discoveries in this area and their integration into the general idea of these complex microbial communities.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biofilm, bistability, transcription regulators, repressors, antirepressors, metabolic regulation, signal mechanisms

ЛИПИДЫ МИКРОМИЦЕТОВ И СТРЕСС

© 2021 г. Е. В. Федосеева^{a, *}, О. А. Данилова^b, Е. А. Януцевич^b, В. А. Терехова^{c, d}, В. М. Терешина^b

^aРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

^bИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ

“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

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

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

*e-mail: elenfedoseeva@gmail.com

Поступила в редакцию 25.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 15.08.2020 г.

Микроскопические грибы, среди многообразия живых организмов, не имеют себе равных по способности осваивать различные экологические ниши благодаря эволюционно сформированным механизмам адаптации к широкому диапазону изменчивости природно-климатических и техногенных факторов. Один из подходов к пониманию механизмов адаптации к меняющимся условиям среды связан с липидным метаболизмом. В обзоре дан критический анализ публикаций и собственных экспериментальных данных относительно изменчивости липидов микромицетов под влиянием стресс-факторов и связанных с этим возможных механизмов адаптации. Проанализированы функциональные, структурные и количественные изменения грибных липидов в условиях осмотического, теплового и холодового воздействий, а также токсичности среды. Биохимические изменения состава фосфолипидов и других мембранных липидов охарактеризованы, в целом, как многообразные и неоднозначные, зависящие от степени воздействия, исходного состава липидов, генетической резистентности грибов и способности к адаптации к экстремальным условиям среды. В обзоре обсуждается роль липидного обмена в комплексном ответе грибной клетки на стрессовые воздействия.

Ключевые слова: грибы, мембрана, вязкость, фосфолипиды, стерин, сфинголипиды, степень насыщенности, осмотический шок, тепловой шок, холодовой шок, токсичность среды

DOI: 10.31857/S0026365621010043

ВВЕДЕНИЕ

Среди многообразия живых организмов микроскопические грибы (микромицеты) не имеют себе равных по способности осваивать различные экологические ниши (Goncalves et al., 2012; Grum-Grzhimaylo et al., 2016). Они развиваются в широком диапазоне изменчивости природно-климатических и техногенных факторов (Горбунова, Терехова, 1995; Терехова, 2007; Grum-Grzhimaylo et al., 2016; Sazanova et al., 2019). Низкие температуры арктических и антарктических местообитаний, высокая инсоляция горных биотопов, горячие источники, экстремальные условия при повышенных уровнях радиации, минерализации, концентрации токсинов являются стресс-факторами для подавляющего числа видов живых организмов. Среди микромицетов велика доля резистентных форм с эволюционно сформированными особыми механизмами адаптации к экстремальным условиям.

Один из подходов к пониманию механизмов адаптации к меняющимся условиям среды связан

с липидным обменом. В пуле липидных структур выделяют маркеры состояния стресса (Януцевич и соавт., 2016). Изучение структурных и функциональных изменений липидного метаболизма грибов представляет не только теоретический интерес. Потенциальная возможность управлять адаптационными механизмами делает привлекательными подобные исследования в различных направлениях биотехнологии, среди которых особой привлекательностью выделяется продукция биологически активных соединений экстремофилами и экстремотолерантами. Интерес к познанию механизмов адаптации микромицетов к стрессовым условиям связан также с внедрением в экологические исследования ОМИКС-технологий, представляющих новую возможность оценки биоразнообразия на основе молекулярно-генетических анализов, в том числе липидных профилей (Vaskovsky et al., 1991; Розенцвет и соавт., 2018).

В обзоре проанализированы функциональные, структурные и количественные изменения

липидов микромицетов в условиях осмотического, теплового и холодного воздействий. Отдельный раздел посвящен техногенному стрессу и воздействию загрязняющих веществ. Результаты такого анализа позволяют приблизиться к пониманию механизмов стрессоустойчивости и адаптации микромицетов, а также стабильности грибных липидных профилей в изменяющихся температурных, осмотических условиях и изменении токсичности среды обитания. В обзоре обсуждается роль липидного обмена в общем комплексном ответе грибной клетки на воздействия стрессорных факторов.

РАЗНООБРАЗИЕ ЛИПИДОВ МИКРОМИЦЕТОВ

Разнообразие липидов в клетках эукариотных организмов на порядок выше, чем у прокариотных. Число наименований липидных молекул у прокариотных организмов не превышает 100, тогда как у эукариотных их насчитывают около 1000 (Simons, Sampaio, 2011). Состав липидов микромицетов достаточно прост, по сравнению с более сложно устроенными эукариотами, однако его основные свойства сравнимы с липидомом любой эукариотической клетки. Триацилглицерины (ТАГ) и эфиры стерина (ЭС) служат запасными липидами, источниками свободных жирных кислот (СЖК), из которых клетка получает энергию в процессе β -окисления (Klose et al., 2012). Основу мембран составляют глицерофосфолипиды (ФЛ), сфинголипиды (СЛ) и стерин (Ст). Разнообразие липидов обусловлено различными комбинациями строительных блоков – полярных головок и ацильных цепей. В состав фосфолипидов (ФЛ) входят фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидные кислоты (ФК), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидил-инозиты (ФИ), лизофосфатидилэтаноламины (ЛФЭ) и лизофосфатидилхолины (ЛФХ), фосфатидилглицерины (ФГ) и кардиолипиды (КЛ) (рис. 1). Основными жирными кислотами (ЖК) в составе липидов грибов являются пальмитиновая ($C_{16:0}$), стеариновая ($C_{18:0}$), олеиновая ($C_{18:1n9c}$), линолевая ($C_{18:2n6c}$) и α -линоленовая ($C_{18:3n3}$) (Weete, 1974) (рис. 1). Некоторые ЖК, Ст, ФЛ и СЛ могут выполнять сигнальные функции в клетке (Pan et al., 2018).

Строение мембран микромицетов согласуется с жидкостно-мозаичной моделью. Согласно этой модели, основу мембраны представляет липидный бислой с интегрированными и периферическими мембранными белками и гликопротеинами, а также микродоменами (липидными рафтами) (Nicolson, 2014). У грибов содержание липидов в мембране колеблется от 30 до 50%, соотношение белков к липидам – от 0.95 до 2.1 (Weete, 1980).

В зависимости от относительного размера полярной головки и гидрофобных цепей ФЛ делят на бислоиные и небислоиные. Бислоиные липиды (ФХ, ФИ) имеют цилиндрическую форму и потому способны образовать бислой. Небислоиные липиды (ФЭ, ФК, КЛ) имеют коническую форму и образуют инвертированную гексагональную фазу (мицеллы). В присутствии бислоиных липидов небислоиные могут формировать бислой, образуя при этом изгибы мембран, что требуется в процессах слияния и деления клеток (van den Brink-van der Laan et al., 2004). Липидный бислой может находиться в двух фазах – жидко-кристаллической (менее вязкая и упорядоченная) и гелевой (более вязкая и упорядоченная). Температура фазового перехода (T_m) меняется в зависимости от состава ФЛ, а также увеличивается по мере удлинения ацильных цепей и уменьшается по мере введения ненасыщенных ЖК в молекулу ФЛ (Renne, Kroon de, 2018).

Липиды с длинными насыщенными ацильными цепями (например, СЛ) увеличивают вязкость мембран, за счет плотной упаковки молекул и липид-липидных взаимодействий. Ненасыщенные ЖК в составе липидов, наоборот, приводят к разрыхлению бислоя, поскольку изгибы ацильных цепей предотвращают плотную упаковку молекул, что способствует процессам эндоцитоза (Narayana, Riezman, 2018). Молекулы Ст оказывают двуправленное стабилизирующее действие на мембрану. Они препятствуют образованию геля, встраиваясь между ацильными цепями и раздвигая их, что способствует увеличению текучести, а в жидко-кристаллическом состоянии уменьшают подвижность ацильных цепей, способствуя уменьшению текучести (Holthuis, Menon, 2014). Высказана гипотеза компартиментализации мембран (Simons, Sampaio, 2011). В мембране могут образовываться динамичные наноразмерные микродомены, рафты – упорядоченные структуры, обогащенные Ст, СЛ и специфическими белками в метастабильном состоянии, которое может быть активировано липид-липидными, липид-белковыми или белок-белковыми взаимодействиями.

Контроль содержания различных липидов в клетке может осуществляться как непосредственно, так и косвенно. Так, фактор транскрипции Urc2, контролирующей экспрессию генов биосинтеза Ст, регулируется путем непосредственного связывания с молекулой эргостерина. Аналогично, ФС-синтаза-1 ингибируется молекулой ФС, обеспечивая поддержание количества ФС на нужном уровне (Narayana, Riezman, 2018). Уровень ФЛ контролируется их предшественниками (накопление ФК, ДАГ). Степень ненасыщенности ФЛ у дрожжей контролируется фактором транскрипции Mga2, который активируется в случае повышенного содержания насыщенных ЖК в составе

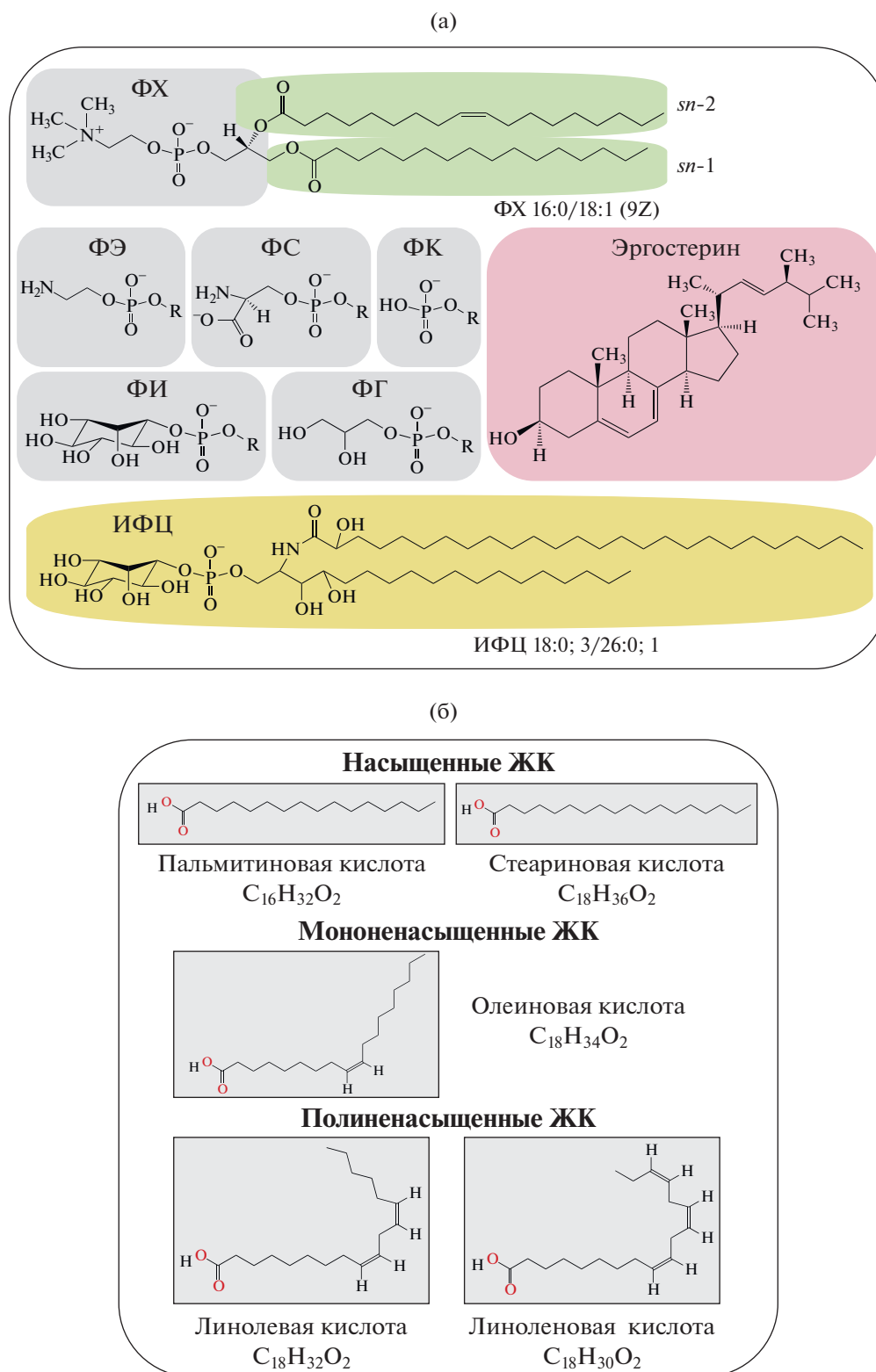


Рис. 1. Разнообразие грибных липидов: а – мембранные: глицерофосфолипиды (зеленый и серый) (модифиц. по Ernst et al., 2016); б – жирные кислоты (формулы взяты с <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Обозначения: ЖК – жирные кислоты; ФГ – фосфатидилглицерины; ФИ – фосфатидилинозиты; ФС – фосфатидилсерины; ФХ – фосфатидилхолины; ФЭ – фосфатидилэтаноламины; ФК – фосфатидные кислоты; ИФЦ –инозилфосфорил церамид.

мембранных липидов, приводя к ап-регуляции генов десатуразы *Ole1* (Covino et al., 2016).

Биосинтез мембранных липидов микроорганизмов можно разделить на 4 основные части: синтез ЖК, ФЛ, СЛ и Ст (Ernst et al., 2016). В основе синтеза мембранных липидов лежит пул свободных ЖК. Как правило, у эукариот их синтез *de novo* приводит к образованию пальмитиновой кислоты, которая подвергается дальнейшим модификациям ферментами элонгазами и десатуразами с образованием большого разнообразия молекул ЖК. Поддержание гомеостаза мембран требует постоянного образования ФЛ, которые синтезируются в ЭПР, аппарате Гольджи и митохондриях. Синтез ФЛ включает последовательное присоединение ацилтрансферазами ацильных цепей в положения *sn-1* и *sn-2* молекулы глицерол-3-фосфата с образованием ФК, из которой далее через цитидин дифосфат-диацилглицеринный путь синтезируется все разнообразие ФЛ. Однако существует и альтернативный путь синтеза ФХ и ФЭ путем включения холина и этаноламина в ФК через путь Кеннеди (Redón et al., 2012). Замена ацильных цепей ФЛ в положении *sn-2* осуществляется в цикле Ланда (Yamashita et al., 2014). Путь синтеза СЛ состоит из серии реакций, в которых первоначально образуются сфингоидные основания с разной длиной цепи, количеством гидроксильных групп, степенью ненасыщенности (СН), которые превращаются в церамиды – предшественники инозитол-содержащих СЛ у дрожжей (Ernst et al., 2016). Путь синтеза Ст у грибов включает около 30 реакций, конечным продуктом является эргостерин (Weete, Gandhi, 1996; Espenshade, Hughes, 2007). Нейтральные липиды (ТАГ, ЭС) являются источниками СЖК, Ст и ДАГ. ДАГ, образующиеся при распаде ФК, служат основными предшественниками ТАГ, тогда как эргостерин является предшественником ЭС (Pan et al., 2018).

ЛИПИДЫ МИКРОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Осмотический шок (ОШ) – это воздействие на организм гипер-/гипоосмотической среды, которое вызывает диффузию свободной воды из/в клетку через полупроницаемую цитоплазматическую мембрану, что приводит к изменению объема и формы клетки, снижению скорости роста и метаболизма, возникновению окислительного стресса (Ramos-Moreno et al., 2019).

Адаптационный ответ клетки на ОШ является комплексным. На морфологическом уровне он проявляется в изменении размера и пигментации колоний, утолщении клеточной стенки, изменении ее структуры и усилении меланизации (Abu-Seidah, 2007; Liu et al., 2017b; Ahumada-Rudolph et al., 2019). На биохимическом уровне происходит синтез

осмолитов (сахароспиртов и трегалозы), ферментов защиты от АФК, изменяется состав мембран.

Основным модельным объектом изучения механизмов резистентности к осмотическому фактору долгое время являлись дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, однако по степени устойчивости они значительно уступают выделенным относительно недавно галофильным (*Wallemia ichthyophaga*) и галотолерантным (*Hortaea werneckii*, *Debaryomyces hansenii*) дрожжам, механизмы осмоадаптации которых на настоящий момент интенсивно изучаются (Gunde-Cimerman et al., 2018).

В отличие от двуступенчатой сигнальной системы прокариот, для эукариот характерна многоступенчатая система фосфорилирования (МСФ), которая участвует в восприятии и трансдукции разнообразных сигналов, поступающих из внешней среды (Jacob, Thines, 2017). Многокомпонентность этой системы обеспечивает большее количество этапов регулирования, что облегчает задачу передачи сигналов в различные клеточные компартменты. Кроме участия в трансдукции внешних сигналов МСФ участвует в процессах цитодифференцировки, хемотаксиса, в первичном и вторичном метаболизме и необходима для вирулентности (Manfiolli et al., 2019; Román et al., 2020). Первой МСФ, идентифицированной у эукариот, был HOG путь (high osmolarity glycerol – HOG – pathway), который участвовал в адаптации к осмотическому стрессу у *S. cerevisiae* (Brewster et al., 1993). HOG-путь включает две цепи передачи сигнала через осмосенсорные белки гистидинкиназы SLN1 и SHO1, обладающие аутокиназной, фосфотрансферной и фосфатазной активностями (Tatebayashi et al., 2020). Показано, что SLN1 и SHO1 чувствительны к изменениям физико-химических свойств мембраны, однако тонкий механизм рецепции сигнала остается неясным. Показана чувствительность SLN1 и SHO1 к изменению вязкости мембраны (Hayashi, Maeda, 2006). Установлено, что в регуляции активности SLN1 и SHO1 участвуют рафты, и высказано предположение об их участии в регуляции осмосенсерных механизмов HOG-пути. Предполагают, что клетки дрожжей могут воспринимать осмотический стресс как изменения структурных и/или физических свойств рафтов (Tanigawa et al., 2012). В оптимальных условиях гистидин-киназный домен SLN1 автофосфорилирован, при участии фосфотрансферного белка YPD1 фосфат передается на регулятор ответа SSK1, что ингибирует каскад MAP-киназ.

При осмотическом воздействии происходит ингибирование фосфорилирования SLN1, в результате чего SSK1 оказывается нефосфорилированной и становится способной активировать каскад MAP-киназ, что приводит в итоге к активации MAP-киназы HOG1, которая переносится

в ядро и активирует экспрессию генов синтеза и обмена глицерина. В геномах мицелиальных грибов идентифицировано большое число генов гистидинкиназ: 10 у *Magnaporthe oryzae*, 11 у *Neurospora crassa*, 16 у *Fusarium verticillioides*, 17 у *Botrytis cinerea* и 21 у *Cochliobolus heterostrophus* (Catlett et al., 2003). В отличие от генов гистидинкиназ, для фосфотрансферного белка YPD1 известен только один ген, ортологи которого обнаружены в геномах различных в систематическом отношении грибов (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*) (Fassler, West, 2013).

В условиях осмотического стресса необходимым условием является поддержание стабильности и гибкости мембраны. При этом показано, что большие колебания текучести мембран связаны с низкой способностью к выживанию экстремофильных дрожжей в условиях осмотического стресса (Turk et al., 2011). На текучесть мембраны влияют такие параметры, как СН ЖК мембранных ФЛ и соотношение Ст и ФЛ. Увеличение СН способствует повышению текучести, а увеличение соотношения Ст и ФЛ — ее снижению. У галотолерантных дрожжей *D. hansenii* показано, что при повышении солёности оба механизма работают одновременно (Turk et al., 2007b), что, по видимому, способствует поддержанию вязкости мембраны. Также показано, что сильный галотолерант *H. werneckii* в оптимальном диапазоне концентраций NaCl 6–14% поддерживает текучесть и соотношение Ст и ФЛ на постоянном уровне (Turk et al., 2004).

Повышение СН мембранных ФЛ (увеличение в их составе долей ненасыщенных ЖК) является одним из наиболее распространенных ответов грибов на гиперосмотическое воздействие и характерно для дрожжей *Candida membranefaciens*, *H. werneckii*, *Aureobasidium pullulans*, *D. hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii* и мицелиального гриба *Aspergillus niger* (Khaware et al., 1995; Turk et al., 2004; Turk et al., 2007; Ianutsevich et al., 2016a; Wang et al., 2020). При этом у галотолерантных дрожжей *H. werneckii* и *A. pullulans* при повышении солёности в диапазоне концентраций NaCl, в котором наблюдается достаточно высокая скорость роста культур, показано повышение экспрессии генов ферментов синтеза ненасыщенных ЖК — десатураз Δ_9 -(*OLE1*), Δ_{12} -(*ODE12*) и элонгазы (*ELO1*) (Gostinčar et al., 2008, 2009), что согласуется с ранее полученными биохимическими данными. Повышение экспрессии генов Δ_9 -, Δ_{12} -десатураз в ответ на гиперосмотическое воздействие показано также у *Aspergillus oryzae* (He et al., 2018). Однако при повышении синтеза полиненасыщенных ЖК возрастает уровень окислительного стресса (Ruenwai et al., 2011), что является дополнительным стрессовым фактором. Падение экспрессии генов десатураз при дальнейшем повышении со-

лености, вероятно, связано со снижением скорости роста культур, а также с повышением уровня окислительного стресса (Gostinčar et al., 2009).

Кроме того, корреляция между повышением СН и ростом осмоустойчивости показана на примере мутантных штаммов *S. cerevisiae* (Rodríguez-Vargas et al., 2007). Установлено, что дикий штамм *S. cerevisiae*, содержащий только Δ_9 -десатуразу и поэтому способный синтезировать только мононенасыщенные ЖК, был менее устойчивым к гиперосмотическому воздействию, по сравнению с мутантными штаммами, содержащими дополнительно встроенные гены Δ_{12} -десатураз, экспрессия которых приводила к накоплению в составе мембранных липидов линолевой кислоты ($C_{18:2} \Delta_{9,12}$) и, как следствие, повышению их СН.

Напротив, у галофильного мицелиального гриба *Aspergillus montevicensis* ZYD4 под действием гиперосмотического шока наблюдалась обратная тенденция — повышалась экспрессия генов, отвечающих за синтез насыщенных ЖК и β -окисление (Ding et al., 2019), что говорит о том, что у данного гриба, возможно, задействованы другие механизмы защиты от гиперосмотического воздействия.

Другим важным компонентом мембран являются Ст, которые участвуют в поддержании стабильности/целостности мембраны, регулируют текучесть, способствуют снижению пассивной диффузии путем уменьшения проницаемости мембраны (Athanasopoulos et al., 2019). Наряду со СЛ и белками, Ст входят в состав рафтов, участвующих в везикулярном транспорте и сигналинге, в том числе, в восприятии сигнала об изменении осмотических условий среды (Golub et al., 2004; Lingwood, Simons, 2010; Tanigawa et al., 2012). В результате осмотического воздействия у *S. cerevisiae*, *D. hansenii*, *Z. rouxii* растёт количество Ст (Hosono, 1992; Turk et al., 2004; Turk et al., 2007a). Также показано, что мутанты *S. cerevisiae*, неспособные синтезировать эргостерин, более чувствительны к осмотическому стрессу (Kodedová, Sychrová, 2015). Однако в отдельных исследованиях на примере *S. cerevisiae* и *Candida glabrata* показана активация генов синтеза ФЛ под действием осмотического стресса (Rep et al., 2000; Wu et al., 2019).

Соотношение Ст и ФЛ в мембране оказывает влияние на ее текучесть. Высказано предположение о том, что относительно низкое соотношение Ст и ФЛ является важной характеристикой галотолерантных грибов, что показано на примере *H. werneckii*, *P. triangularis*, *Fusarium* sp., и *D. hansenii*, тогда как у осмочувствительных грибов, таких как *S. cerevisiae* и *Z. rouxii*, соотношение Ст и ФЛ более высокое и при увеличении солёности растёт (Hosono, 1992; Turk et al., 2004, 2007a; Smolyanyuk et al., 2013).

Таким образом, изменения состава липидов грибов в гиперосмотических условиях многообраз-

ны и связаны с регуляцией текучести мембран и модификацией структуры мембранных рафтов. Среди них сложно выделить универсальные реакции адаптации к данному виду стрессовых воздействий, что связано, возможно, с видовыми особенностями грибов, а также с методическими различиями в подходах к изучению этого явления. Тем не менее, наиболее распространенным ответом на осмотическое воздействие является повышение СН мембранных ФЛ, а общей чертой галофильных и галотолерантных грибов является поддержание соотношения Ст и ФЛ на относительно низком уровне.

ЛИПИДЫ МИКРОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Холодовой шок (ХШ) возникает, когда культуру гриба, растущего в оптимальных температурных условиях, помещают в условия, где наблюдается остановка ростовых процессов. Обычно такие условия соответствуют понижению температуры на 15–20°C относительно оптимальных условий, но в целом зависят от температурного диапазона роста гриба. Различают умеренный ХШ и холодное воздействие в области кристаллизации воды (0–4°C). В отличие от тепловых, холодные воздействия не приводят к деградации биополимеров, но значительно изменяют их свойства. Так, при ХШ наблюдается снижение активности мембраносвязанных ферментов и транспортеров, скорости трансляции и фолдинга, возникает стабилизация вторичных структур РНК и ДНК, повышается упорядоченность мембранных липидов, приводящая к снижению текучести, т.е. ригидификации мембран (Sahara et al., 2002; Redón et al., 2012).

В восприятии и трансдукции холодного сигнала у *S. cerevisiae* участвует HOG-путь, причем только ветвь SLN1 (Hayashi, Maeda, 2006). Но пока нет ясности в том, что “чувствует” сенсор гистидинкиназа SLN1, – ригидификацию мембраны под воздействием холода или фазовый переход мембранных липидов.

Ответ на ХШ является комплексным и включает синтез осмолитов (глицерина, трегалозы), белков ТШ, компонентов антиоксидантной системы, изменение состава мембранных липидов (Inouye, Phadtare, 2014).

На генетическом уровне при воздействии умеренного ХШ (10°C) на культуру *S. cerevisiae*, растущую в оптимальных условиях (30°C), наблюдается глубокая перестройка метаболизма, сопровождающаяся изменением экспрессии 25% генов, причем стимуляция экспрессии наблюдается в 536 генах, а снижение – в 488 генах (Sahara et al., 2002). При холодном воздействии наблюдается переход мембраны от жидкокристаллического к гелевому состоянию. Для жидкокристаллического состояния

характерно сочетание высокой упорядоченности с большой подвижностью молекулярных компонентов мембраны. В гелевом состоянии увеличивается плотность упаковки липидов, в результате чего существенно изменяются свойства ферментов, каналов, переносчиков и других функционально значимых компонентов мембраны. Это, в свою очередь, приводит к изменению проницаемости мембраны, нарушению биохимических реакций, рецепторных и других процессов. Текучесть мембраны зависит от свободного движения ацильных групп мембранных ФЛ, латеральной диффузии и колебательного движения ФЛ, а также взаимодействия между различными доменами в мембране (Hayashi, Maeda, 2006).

Одним из основных ответов на холодное воздействие является стимуляция экспрессии генов десатураз, действие которых приводит к появлению дополнительных двойных связей в ацильных цепях ФЛ, вследствие чего текучесть мембраны повышается. У *S. cerevisiae* за этот процесс отвечает единственная десатураза OLE1 (Δ_9 -десатураза), которая кодируется геном *OLE1* (Nakagawa et al., 2002). Этот связанный с мембраной ЭПР фермент катализирует внедрение двойной связи между 9-м и 10-м углеродными атомами пальмитоил-КоА и стеароил-КоА. У дрожжей при росте в холодных условиях (5°C) дополнительно наблюдается повышение активности синтазы ЖК, что приводит к усиленному образованию пальмитиновой кислоты, из которой с помощью Δ_9 -десатуразы образуется пальмитолеиновая кислота, т.е. происходит не только увеличение СН ацильных цепей мембранных липидов, но и их укорочение. У мицелиального мезофильного гриба *A. niger* (Ianutsevich et al., 2016a) и у термофила *Rhizomucor miehei* (Ianutsevich et al., 2020b) под действием ХШ обнаружено повышение СН мембранных липидов за счет увеличения доли линолевой кислоты.

Однако на текучесть мембран влияют не только СН ЖК, но и белки теплового шока (БТШ; heat shock proteins, HSP). Так, малый белок теплового шока HSP12 образуется в ответ на различные воздействия (тепловой, холодной, осмотический, окислительный шоки, высокие концентрации сахаров и этанола) (Inouye, Phadtare, 2014; Tiwari et al., 2015). У *S. cerevisiae* холодное воздействие (10°C) приводит к подавлению экспрессии большинства белков теплового шока и стимуляции экспрессии HSP12 и HSP26 (Sahara et al., 2002). Полагают, что эти белки могут влиять на текучесть мембран, а HSP12 необходим для криоустойчивости.

На текучесть мембран холодоустойчивых дрожжей влияет и состав мембранных липидов, в частности, соотношение Ст/ФЛ (Gostinčar, Gunde-Cimerman, 2018): снижение этого соотношения приводит к увеличению текучести мембран.

Однако исследование влияния экзогенных ЖК и Ст на адаптацию мезофильных дрожжей к холодным условиям (13°C) показало, что наибольшим эффектом обладали пальмитолеиновая кислота и эргостерин, при этом в клетках наблюдалось самое высокое соотношение Ст/ФЛ (Redón et al., 2009). У мезофильного гриба *A. niger* под воздействием умеренного ХШ (16°C, 6 ч) возрастали доли Ст и ФК на фоне снижения ФХ и ФЭ (Ianutsevich et al., 2016a). Тогда как у термофильного гриба *R. miehei* (оптимум роста 40°C) ХШ (20°C) в течение 6 ч приводил к повышению доли ФК, но снижению доли Ст и изменению их состава: существенно снижалась доля эргостерина на фоне увеличения 5-дигидроэргостерина (Ianutsevich et al., 2020). Поддержание гомеостаза мембран требует постоянного образования ФЛ, которые синтезируются в ЭПР, аппарате Гольджи и митохондриях. Делеция гена *HNM1*, кодирующего пермеазу, отвечающую за транспорт холина и этаноламина в клетку, показала, что центральную роль при адаптации к низким температурам играет путь синтеза ФЛ *de novo*. Мутант *S. cerevisiae opi3Δ* с низким содержанием ФХ, в отличие от мутанта *hnm1Δ*, не способен к росту при понижении температуры до 13°C (Redón et al., 2012).

Для понимания механизмов адаптации к холодным воздействиям важно исследовать не только ответ на ХШ у мезофильных грибов, но и особенности адаптации к низким температурам у холодоустойчивых грибов, которые колонизируют глубины океанов, ледники и полярные районы, выполняя важную роль в круговороте веществ. Земля – холодная планета, более 85% биосферы постоянно подвергается холодовому воздействию ниже 5°C (Margesin, Miteva, 2011). Облигатными психрофилами называют грибы, не способные к росту при температуре выше 20°C, но растущие при 0°C или ниже, при этом оптимальный температурный диапазон роста составляет 10–15°C (Rossi et al., 2009). В отличие от мезофила *S. cerevisiae*, имеющего одну Δ_9 -десатуразу, психрофильные дрожжи при росте в условиях 4°C значительно увеличивают количество полиненасыщенных ЖК общих липидов, особенно линолевой ($C_{18:2} \Delta_{9,12}$) и α -линоленовой ($C_{18:3} \Delta_{9,12,15}$). Например, у психрофильных дрожжей *Leucosporidium frigidum* и *L. nivalis*, которые растут при температуре –1°C, 80% ЖК представлены линоленовой (35–50%) и линолевой (25–30%) кислотами, что приводит к очень высокой СН (>2) (Watson et al., 1976).

Важное значение для криоустойчивости имеют осмолиты трегалоза и глицерин, синтез которых регулируется НОГ-путем. Делеция гена *HOG1* не влияет на рост дрожжей при 12°C, но снижает криоустойчивость при 4°C, поскольку не происходит индукции генов синтеза трегалозы и глицерина (Inouye, Phadtare, 2014). Нужно подчеркнуть, что

трегалоза является уникальным осмолитом, защищающим от окисления двойные связи ацильных цепей ФЛ путем образования многочисленных водородных связей с их головками, что в итоге оказывает протекторный эффект для макромолекул и мембран клетки (Sum et al., 2003; Rangel, 2011). Грибы вечно холодных мест обитания подвергаются жесткому действию ультрафиолетовых лучей (УФ), в основном УФ-А (315–400 нм) и УФ-В (280–315 нм), которые оказывают как прямое, так и опосредованное (путем образования АФК) повреждающее действие на клеточные макромолекулы и мембраны. Холодоустойчивые дрожжи синтезируют фотозащитные соединения – каротиноиды (торулародин, торулен, β -каротин и γ -каротин) и микоспорин глутаминол-глюкозид (Moliné et al., 2014). Полагают, что каротиноиды могут быть ассоциированы с мембранами, влиять на их проницаемость, защищать от АФК, возникающих при различных стрессорных воздействиях. Так, дрожжи рода *Dioszegia* являются рекордсменами по выживаемости в условиях УФ-облучения, образуя наибольшее количество каротиноидов и микоспорина. Роль повышенной меланизации у холодоустойчивых грибов связывают не только с защитой от УФ излучений, но и с термальным меланизмом – механизмом терморегуляции, обусловленным способностью меланина поглощать энергию и превращать ее в тепло (Cordero et al., 2018).

Защитным действием обладают антифризные белки, способные связываться с кристаллами льда и тормозить его рост. Например, у дрожжей рода *Glaciozyma* антифризный белок LeIBP секретируется клеткой и защищает цитоплазматическую мембрану от кристаллизации воды (Kim et al., 2014). Усиливают это действие соли и внеклеточные полисахариды, которые накапливаются в каналах льда и помогают сохранить воду в жидком состоянии.

Состав Ст у психрофильных грибов малоисследован, но обнаруженная взаимосвязь между устойчивостью к холоду и системой деградации неполноценных белков в ЭПР (Endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD) может быть связана с ферментами синтеза ЖК и Ст, которые локализованы в мембранах ЭПР. При увеличении количества неправильно свернутых белков, что наблюдается при всех стрессовых воздействиях, возникает ответ, приводящий к активации транскрипции шаперона Kar2 из семейства HSP70 (Haas, 2014) и ERAD пути. Показано, что 10-кратное увеличение количества связанного с мембраной ЭПР фермента 3-гидрокси-3-метил-глутарил-КоА редуктазы способствует биогенезу кармелл (*car-mellae*) – уникального участка гладкого ЭПР со складчатыми мембранами и ядром. Этот фермент контролирует ключевую реакцию пути синтеза Ст – образование мевалоновой кислоты. Было

установлено, что три гена (*UBC7*, *CUE1* и *DOA10*) необходимы как для биогенеза кармелл, так и для адаптации к низким температурам. Под воздействием умеренного холода (16°C) у *S. cerevisiae* происходит нарушение образования кармелл, и существенно снижается доля эргостерина на фоне повышения долей его предшественников в составе Ст (Loertscher et al., 2006). Кроме того, транскрипция гена *OLE1*, кодирующего единственную Δ_9 десатуразу у дрожжей *S. cerevisiae*, регулируется локализованным в мембране ЭПР транскрипционным фактором Mga2p (Nakagawa et al., 2002). Полагают, что неактивная форма Mga2p (120 кДа) действует как низкотемпературный сенсор, “чувствующий” повышенную плотность укладки ФЛ, в результате чего изменяется конформация фактора, что приводит к его убиквитинизации и протеасомному процессингу. Образующаяся активная форма Mga2p (90 кДа) переносится в ядро и активирует экспрессию гена *OLE1* (Ballweg et al., 2020).

Исследования состава мембранных липидов психрофильных грибов до настоящего времени фокусировались только на изучении их жирнокислотного состава, причем в общих липидах, а не в мембранных. Для понимания роли мембран в адаптации к холоду у психрофилов необходимы дальнейшие исследования состава ФЛ и Ст как основных компонентов мембран. Нужно подчеркнуть, что защита мембран в условиях холодových воздействий осуществляется не только с помощью изменения их состава, но и путем синтеза протекторных соединений – трегалозы, глицерина, малых белков теплового шока, каротиноидов и микоспоринов, антифризных белков. В результате сравнения ответа на ХШ у мезофильных грибов и механизмов адаптации психрофильных можно сделать вывод о том, что эти механизмы схожи в случае умеренных температур и заметно различаются в зоне кристаллизации воды, где возникают дополнительно специфические изменения.

ЛИПИДЫ МИКРОМИЦЕТОВ ПРИ ТЕПЛОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Тепловой шок (ТШ) возникает при повышении температуры на 8–12°C выше оптимальной (Singer, Lindquist, 1998), что приводит к остановке клеточного цикла, вызывает денатурацию белков и образование белковых агрегатов, повреждение клеточного цитоскелета, разрушение актиновых филаментов, нарушение транспортных процессов, снижение уровня АТФ, повреждение РНК (Verghese et al., 2012), а также сопровождается окислительным стрессом вследствие образования активных форм кислорода (Morano et al., 2012). Ответ на ТШ является комплексным и включает синтез БТШ, трегалозы, ферментов антиокси-

дантной защиты, изменение структуры воды и состава мембран (Piper, 1993).

Повышение температуры приводит к изменению конформации белков, молекул РНК, а также вызывает изменения структуры мембран (Balogh et al., 2013). Каждый из вышеуказанных компонентов может служить в качестве клеточного термосенсора. Хотя мембранные липиды сами не обладают каталитической активностью, функции ряда мембраносвязанных белков, отвечающих за термосенсинг и передачу сигналов, напрямую зависят от состава и структуры липидного бислоя (Escribá et al., 2008). Снижение вязкости мембран в результате повышения температуры играет ключевую роль в запуске ответа на ТШ (Balogh et al., 2013).

У *S. cerevisiae* индукция генов в ответ на ТШ может происходить по двум регуляторным путям, контролируемым факторами транскрипции Msn2/Msn4 (специфичны для грибов) и Hsf1 (консервативны у всех эукариот) (Kimata et al., 2018). Фактор Msn2/Msn4 отвечает за экспрессию генов ферментов антиоксидантной системы и метаболизма углеводов и может также участвовать в ответе на общий стресс окружающей среды (ESR – environmental stress response) (Leach et al., 2016). Фактор Hsf1 отвечает за экспрессию генов молекулярных шаперонов и их кофакторов, а также трегалозы при ТШ; играет роль в вирулентности *C. albicans* (Leach et al., 2016). ТШ также активирует HOG-путь у дрожжей через мембраносвязанный сенсор гистидинкиназу SHO1 (Winkler et al., 2002). У *Aspergillus fumigatus* в адаптации к ТШ участвуют гомологи HOG1 – MpkC и SakA (Bruder Nascimento et al., 2016). В результате воздействия ТШ начинается экспрессия особых белков теплового шока (БТШ), которые выполняют различные функции для защиты клетки от повышенных температур (Rangel, 2011). Малые БТШ способны повышать ригидность бислоя, стабилизируя его во время ТШ (Horváth et al., 2008). В стабилизации мембран на ранних стадиях ТШ участвуют малые БТШ Hsp16, Hsp15.8 у дрожжей *S. pombe* (Glatz et al., 2016) и Hsp12 у *S. cerevisiae* (Welker et al., 2010).

Для защиты макромолекул и мембран клетки от ТШ важно накопление нередуцирующего дисахарида трегалозы (Hong et al., 2015; Zhang, Xu, 2018). Высокие уровни трегалозы были зарегистрированы как у мезофильных микромицетов при ТШ (Терёшина и соавт., 2010; Morano et al., 2012), так и у термофилов при оптимальной температуре роста (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016b, 2020a). Помимо множества других функций (резервный углевод, использующийся в процессах прорастания и хранения спор грибов; протектор при различных стрессорных воздействиях; регулятор процесса гликолиза; стабилизатор концентрации глюкозы и АТФ в клетке; антиоксидант, снижающий скорость окисления нена-

сыщенных ЖК), трегалоза стабилизирует мембраны клетки, образуя многочисленные водородные связи с полярными головками ФЛ (Sum et al., 2003).

Снижение вязкости мембран при ТШ путем изменения СН мембранных ФЛ подразумевает увеличение доли насыщенных ЖК в составе мембранных липидов, что увеличивает температуру фазового перехода (Sinensky, 1974). Такая закономерность обычно наблюдается при длительном выращивании при повышенной температуре (Glatz et al., 2016; Péter et al., 2017; Renne, Kroon de, 2018). Известно, что у эукариот отсутствуют сатуразы, способные к быстрому превращению ненасыщенных ацильных цепей ФЛ в насыщенные (Valogh et al., 2013), поэтому накопление насыщенных ЖК возможно только путем их синтеза *de novo* (Weete, 1974; Péter et al., 2017), который в условиях ТШ затруднителен. Состав мембранных липидов мезофильных микромицетов при ТШ коррелирует с составом мембран термофильных грибов, приспособленных к жизни при высоких температурах. Жирнокислотный состав мембранных липидов термофилов и мезофилов схож: основными ЖК являются пальмитиновая (C_{16:0}), стеариновая (C_{18:0}), олеиновая (C_{18:1n9c}), линолевая (C_{18:2n6c}) и α -линоленовая (C_{18:3n3}) (Weete, 1974; Ianutsevich et al., 2016b; Salar, 2018). При этом, по сравнению с мезофилами, термофильные грибы содержат больше насыщенных ЖК в составе мембранных липидов (Satyanarayana, Johri, 1999; Salar, 2018). В то же время, при ТШ на примере трех мезофильных (*A. niger*, *Pleurotus ostreatus*, *Cunninghamella japonica*) (Терёшина et al., 2010, 2011) и трех термофильных (*R. miehei*, *Rhizomucor tauricus*, *Myceliophthora thermophila*) грибов различного систематического положения не было обнаружено снижения СН основных мембранных ФЛ (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016b). У дрожжей *S. cerevisiae* при ТШ был показан рост уровня мононенасыщенных ЖК (C_{16:1}, C_{18:1}), коррелирующий с повышением термостойчивости организма (Kim et al., 2006). На примере зигомицета *Cunninghamella echinulata* было показано, что длительная адаптация к повышенной температуре также вызывает увеличение содержания олеиновой кислоты (C_{18:1}) в составе ФЛ (Li et al., 2019). Интересным представляется возможный механизм регуляции СН мембранных липидов при ТШ у *Schizosaccharomyces pombe*: синтез ТАГ из ФЛ позволяет синтезированным *de novo* насыщенным ЖК присоединяться к полярным головкам структурных липидов (Péter et al., 2017).

Гомеовязкостная адаптация представляет собой комплексный механизм и осуществляется не только путем изменения СН ФЛ, но и за счет изменения соотношения различных ФЛ в мембране.

При тепловых воздействиях происходит рост уровня стабилизирующих мембрану компонен-

тов: молекул ФХ, образующих бислойные структуры, или молекул ФИ, способных образовывать водородные связи с соседними ФЛ, уплотняя структуру бислоя (Klose et al., 2012). На примере *S. echinulata* было показано, что продолжительное воздействие температур, на 8–10°C превышающих оптимальное значение (длительная адаптация), приводило к увеличению соотношения ФХ/ФЭ, что объясняется активацией ферментов синтеза ФХ из ФС и ФИ (Li et al., 2019). Снижение содержания небислойных ФЭ также наблюдалось при повышении температуры у *S. pombe* (Glatz et al., 2016). В клетках дрожжей, выращенных при повышенных температурах, наблюдалось снижение количества небислойных ФЭ, несмотря на их более высокую температуру фазового перехода по сравнению с бислойными ФХ (Renne, Kroon de, 2018). В то же время для ряда микромицетов было показано увеличение доли небислойных ФЛ, что может служить сигналом к запуску клеточного ответа. Так, у дрожжей при снижении соотношения ФХ/ФЭ происходит накопление стабилизирующего мембрану малого БТШ HSP12 и отвечающего за образование изгибов мембраны белка RTN2 (Thibault et al., 2012). Небислойные липиды отвечают за формирование Le участков мембран в гексагональной фазе, что облегчает связывание с ними G-белков и влияет на стабильность трансмембранных белковых комплексов путем изменения профиля латерального давления (Escribá et al., 2008; Renne, Kroon de, 2018). У ряда микромицетов при ТШ наблюдалось повышение доли небислойных ФК на фоне снижения долей ФХ и ФЭ. Эта закономерность была характерна для мезофильных грибов *A. niger*, *P. ostreatus* и *C. japonica* (Терёшина и соавт., 2010, 2011), а также для термофилов *R. miehei*, *R. tauricus* и *M. thermophila* (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016b). Накопление ФК было отмечено при ТШ у базидиомицета *Ganoderma lucidum* (Liu et al., 2017b), а также у дрожжей *Yarrowia lipolytica* при выращивании в условиях повышенной температуры (Sekova et al., 2019). С одной стороны, ФК можно рассматривать как соединение, с которого начинается синтез ФЛ. Тогда увеличение количества ФК может свидетельствовать о дегградации ФЛ в условиях ТШ в результате активизации мембраносвязанной фосфолипазы D (Liu et al., 2017b). С другой стороны, ФК является биологически активным соединением с сигнальной и регуляторной функциями (Shin, Loewen, 2011; Jang et al., 2012; Barman et al., 2018). Наиболее вероятной функцией ФК в условиях ТШ считают участие в процессах эндо- и экзоцитоза, что обусловлено способностью ФК образовывать мембраны и везикул (McMahon, Gallop, 2005; Cazzolli et al., 2006; Kooijman, Burger, 2009). Интересно, что для термофильных грибов характерно поддержание высокого уровня ФК (до 35% от

суммы мембранных липидов) при оптимальных условиях (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016b; Salar, 2018). То есть состав мембранных липидов у мезофилов в условиях ТШ приближен к термофилам.

Поддержание вязкости мембран может осуществляться при помощи стабилизирующих соединений – Ст и СЛ. Накопление Ст и СЛ в составе мембран микромицетов при ТШ связывают с образованием мембранных микродоменов, рафтов (Alvarez et al., 2007). Рост уровня Ст при ТШ наблюдался у микромицетов различного систематического положения, как мезофилов, так и термофилов (Терёшина и соавт., 2010; Ianutsevich et al., 2016b). Упорядочивая ацильные цепи в жидкокристаллической фазе, Ст повышают ригидность мембран при повышении температуры (Ernst et al., 2016). Стоит отметить, что для термофильных грибов характерно высокое содержание Ст в составе мембранных липидов на всех стадиях роста при оптимальных условиях (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016b).

Рост уровня СЛ при ТШ был показан для дрожжей и мицелиальных грибов (Chen et al., 2013; Ianutsevich et al., 2016b; Řezanka et al., 2018). Повышенный уровень СЛ необходим для активации процессов трансляции при ТШ (Meier et al., 2006). СЛ являются сигнальными молекулами (Epstein, 2013; Fernandes et al., 2018), регулируют начало процессов трансляции, формируя р-тельца (Coward et al., 2010).

Таким образом, липидный бислой играет важную роль в сенсинге и запуске ответа на ТШ. На ранних стадиях ТШ защита мембран осуществляется при помощи протекторных соединений – трегалозы и БТШ. Дальнейшая стабилизация бислоя осуществляется также путем изменения собственно состава мембранных липидов. Это может осуществляться за счет замещения ацильных цепей ФЛ, изменения соотношения бислойных и небислойных компонентов мембран, а также повышения содержания СЛ и Ст.

ЛИПИДЫ МИКРОМИЦЕТОВ И ТОКСИЧНОСТЬ СРЕДЫ

Грибы секвестрируют, разлагают и/или преобразуют широкий спектр загрязнителей: органических и неорганических веществ, как биотического происхождения, так и ксенобиотиков (Gadd, 2016). Грибные популяции и сообщества, будучи активно вовлеченными в круговорот веществ в локальном и глобальном масштабах, участвуют в ослаблении негативных эффектов загрязнителей и микоремедиации загрязненных сред. В целом грибы характеризуются устойчивостью к загрязняющим веществам, благодаря широкому набору адаптационных признаков, что делает их типичными обитателями загрязненных сред (Марфенина,

2005; Терехова, 2007). Механизмы резистентности к неблагоприятным условиям исследованы недостаточно. Устойчивые виды грибов обычно редко встречаются в незагрязненных почвах, однако могут стать доминирующими при стрессе (например, токсичных металлов) (Марфенина, 2005; Терехова, 2007). При этом загрязняющие вещества способны проявлять по отношению к грибам токсичность (pollutant toxicity), т.е. вызывать нарушение биохимических, морфологических, физиологических характеристик организмов, что в итоге приводит к изменениям на уровне популяций и сообществ (Терехова, Швед, 1994; Gadd, 2016; Терехова и соавт., 2017).

Органические и неорганические загрязнители оказывают разнообразные токсические воздействия на грибные клетки: 1) ингибируют ферментативную активность; 2) вызывают окислительный стресс или взаимодействуют с системами, которые обычно защищают от вредного воздействия свободных радикалов; 3) токсичные металлы вытесняют или заменяют незаменимые ионы металлов; 4) вызывают нарушение целостности мембран (Горбунова, Терехова, 1995; Baldrian, 2010; Calonne et al., 2014). Первым физико-химическим барьером, который встречают загрязняющие вещества на пути продвижения внутрь грибных клеток, являются клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана, которая отвечает за взаимодействие с окружающей средой (Mantil et al., 2019; Haç-Wydro et al., 2019). Воздействуя на мембраны грибов, загрязняющие вещества способны вызывать количественные и качественные изменения их липидного состава.

Органические загрязняющие вещества (ОЗВ) в большинстве своем подвержены грибной деградации, поэтому интерес к исследованиям различных аспектов их взаимодействия с грибами связан с перспективой внедрения микоремедиации природных сред. Преимущественно оценивают влияние ОЗВ на грибы, которые могут выступать в качестве их деструкторов. Спектр изучаемых ОЗВ гетерогенен и включает полициклические ароматические углеводороды – ПАУ (антрацен и бенз(а)пирен), бисфенолы (А, S и F), гербициды (хлорацетанилидные гербициды и гербицид 2,4-D), персистирующие загрязнители (трибутилтин и его хлорид).

ОЗВ способны проникать через клеточную мембрану, нарушая ее целостность. Эксперименты по измерению поверхностного давления в липидных монослоях показали, что бисфенолы активнее проникают через модельные грибные мембраны, чем через модельные бактериальные мембраны (Haç-Wydro et al., 2019). Такой механизм действия напрямую связывают со способностью бисфенолов образовывать водородные связи с молекулами ФЛ (Haç-Wydro et al., 2019). На примере мицелиальных грибов была подтверждена способность ОЗВ к

проникновению через плазматическую мембрану и нарушению ее целостности путем повышения проницаемости. В экспериментах по поглощению йодистого пропидия показано, что хлорид трибутиллина повышает проницаемость мембраны гриба *Metarhizium robertsii* (Siewiera et al., 2015), а гербицид 2,4-D – *Trichoderma harzianum* (Mironenka et al., 2020). Авторы (Nykiel-Szymańska et al., 2019) зафиксировали различную степень изменения проницаемости мембран (а значит нарушение их целостности) среди 34 видов *Trichoderma* spp., на которые воздействовали хлорацетанилидными гербицидами. Авторы отмечают, что оба механизма, как поддержание целостности, так и ее частичное нарушение, могут рассматриваться как адаптационные механизмы грибов, что будет обсуждено ниже. Изменение целостности мембран под действием ОЗВ происходит за счет качественной и количественной трансформации состава липидов (Li et al., 2006; Siewiera et al., 2015; Nykiel-Szymańska et al., 2019; Mironenka et al., 2020).

Под действием ОЗВ изменяется содержание и активность биосинтеза Ст, ФХ и ФЭ. Снижением количества Ст (в частности, 24-метилхолестерина) и ФХ, а также накоплением продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) объясняют угнетение роста арбускулярно-микоризного гриба *Glomus irregulare* при загрязнении ПАУ (концентрации антрацена – 25 и 50 мг/л; бенз(а)пирена – 35.3 и 70.6 мг/л) (Debiane et al., 2011). Воздействие бенз(а)пирена в наибольшей из исследованных концентраций (71 мг/л) способствовало уменьшению количества предшественников Ст и ФЛ (в основном за счет ФХ, ФС и ФГ) в мицелии другого микоризообразующего вида *Rhizophagus irregularis*, не угнетая при этом мицелиальный рост (Calonne et al., 2014). При индуцированном окислительном стрессе, вызванном обработкой бенз(а)пиреном, отмечено снижение количества ФХ (Debiane et al., 2011; Calonne et al., 2014). Интересно, что на фоне снижения уровня ФХ происходила активация их биосинтеза, что свидетельствует о регенерации основных ФЛ (Calonne et al., 2014). Снижение доли ФХ и, следовательно, снижение отношения ФХ/ФЭ происходили в составе ФЛ коллекционных культур: у *M. robertsii* под действием хлорида трибутиллина (при концентрации 2.5 мг/л) (Siewiera et al., 2015) и *T. harzianum* под действием гербицида 2,4-D (при концентрации 100 мг/л) (Mironenka et al., 2020). Однако после инкубации 34 видов *Trichoderma* spp. с хлорацетанилидными гербицидами (при концентрации 50 мг/л) в составе ФЛ регистрировали как снижение, так и увеличение отношения ФХ/ФЭ (Nykiel-Szymańska et al., 2019). У коллекционного штамма мицелиального гриба *Cunninghamella elegans* трибутиллин (при концентрации 5 мг/л) вызывал снижение долей ФЭ и ФС на фоне повышения долей ФК, ФИ и

ФХ, что приводило к росту отношения ФХ/ФЭ (Bernat et al., 2014).

Биосинтезы ФХ и ФЭ взаимосвязаны, и ФХ могут быть синтезированы из ФЭ (Xia et al., 2011). Соотношение между ФХ и ФЭ может характеризовать целостность мембраны. Повышение содержания ФХ стабилизирует липидный бислой, в то время как небислойный липид ФЭ имеет тенденцию образовывать гексагональную фазу, тем самым снижая текучесть мембраны и повышая проницаемость, что приводит к потере ее целостности (Li et al., 2006). Под действием ОЗВ адаптивные реакции липидного метаболизма у грибов могут выражаться как в снижении, так и в повышении отношения ФХ/ФЭ. Грибы, у которых в ответ на стресс этот показатель повышается, можно охарактеризовать как более устойчивые, способные к сохранению целостности бислоя (например, *S. elegans* и некоторые виды *Trichoderma* spp.). Снижение текучести мембран путем уменьшения соотношения ФХ/ФЭ запускает другой вид адаптивного механизма – компенсаторного. Такой механизм направлен на обеспечение постепенного поглощения ОЗВ и их деградации внутри клеток, что возможно при концентрациях, не вызывающих сильного токсического эффекта.

Помимо влияния на уровень ФХ и ФЭ, ОЗВ вызывают изменение содержания и активности биосинтеза других ФЛ, в частности ФК и КЛ, а также модификацию СН ФЛ. Включение [1-¹⁴C] ацетата в ФК усиливалось на фоне неизменности их количества в экстрацеллюлярном мицелии *R. irregularis* в присутствии бенз(а)пирена (Calonne et al., 2014). Авторы предполагают, что деградация ФК, являющихся предшественниками ФГ и ФС, компенсируется активацией их биосинтеза. Расходование ФК на передачу сигналов стресса может привести к замедлению биосинтеза ФГ, в котором участвуют ФК (Munnik, 2001; Nykiel-Szymańska et al., 2019). Увеличение доли ФК в составе ФЛ наблюдали у нескольких протестированных видов *Trichoderma* spp. при воздействии хлорацетанилидными гербицидами и у *S. elegans* при воздействии трибутилтином (Bernat et al., 2014; Nykiel-Szymańska et al., 2019). В липидном профиле обработанного гербицидом мицелия *T. harzianum* регистрировали более высокую долю молекулярных видов КЛ 72:7 и более низкую долю КЛ 72:8, что связывают со снижением соотношения между жирными кислотами C_{18:2} и C_{18:1} (Mironenka et al., 2020). Снижение степени ненасыщенности ФЛ отмечали в присутствии трибутиллина в мицелии *S. elegans* (Bernat et al., 2014). Из-за повышенного ПОЛ в обработанном гербицидом мицелии *T. harzianum* регистрировали еще и более высокое количество оксипинов (9-HODE и 13-HODE) (Mironenka et al., 2020).

Качественные и количественные изменения в составе запасных липидов под действием ОЗВ не так очевидны. В работе Calonne et al. (2014) авторы зафиксировали активизацию гидролиза ТАГ в мицелии арбускулярно-микоризных грибов в присутствии ПАУ, что связывают с усилением синтеза хитина для укрепления клеточной стенки и блокировки поступления ПАУ внутрь грибных клеток. Как известно из более ранних исследований (Debiane et al., 2011), в ответ на вызванный присутствием ПАУ стресс клеточные стенки арбускулярно-микоризных грибов утолщаются.

Из ряда неорганических загрязняющих веществ наиболее часто исследуемыми являются тяжелые металлы (ТМ) и металлоиды, по причине их широкой распространенности в почвах (Baldrian, 2010) и потенциальной фунгицидной активности (Vesentini et al., 2007). Катионы некоторых металлов участвуют в обеспечении процессов жизнедеятельности живых организмов, токсичные же элементы (Hg, Cd, Pb, As) оказывают, в основном, негативное воздействие, накапливаясь в клетках. По отношению к неразлагаемым соединениям ТМ грибы проявляют способность к аккумуляции. ТМ проявляют по отношению к грибам различную токсичность, которая зависит от степени индуцируемых количественных и качественных изменений в составе мембранных липидов.

Подробные исследования состава грибных липидов при действии ТМ проведены на двух видах микромицетов: выделенном из незагрязненной почвы *Curvularia lunata* (Paraszkiewicz et al., 2009, 2010) и выделенном из сильно загрязненной металлами почвы *Paecilomyces marquandii* (Słaba et al., 2013). В работе (Paraszkiewicz et al., 2009) изучен состав ЖК *C. lunata* при обработке ионами Ni, Cu, and Zn в концентрациях, которые не ингибировали грибной рост (0.06, 0.32 и 0.98 г/л соответственно). В работе других авторов (Słaba et al., 2013) изучены липидные профили, состав ЖК и целостность цитоплазматической мембраны гриба *P. marquandii* при воздействии Zn, Cu, Pb, Ni и Cd в концентрациях, ингибирующих мицелиальный рост на 50% – EC₅₀ (0.78, 0.29, 0.77, 0.18 и 0.28 г/л соответственно).

Под воздействием ионов Pb в составе ФЛ мицелия *P. marquandii* отмечено снижение доли ФХ и ненасыщенных ЖК, что приводило к существенным повреждениям цитоплазматической мембраны: авторы фиксировали почти 30-кратное увеличение поглощения йодистого пропидия относительно контроля (Słaba et al., 2013). По их мнению, сокращение доли ФХ, сопровождаемое значительным повышением доли ФК, возможно из-за активации фосфолипазы D, которая гидролизует ФХ до ФК.

Ответная реакция *P. marquandii* на воздействие Cd и Ni выражалась в увеличении доли ФХ в со-

ставе ФЛ мицелия (Słaba et al., 2013). Ионы Cd стимулировали возрастание степени насыщенности ФЛ в мицелии *P. marquandii* (Słaba et al., 2013), а ионы Ni – в мицелии как *P. marquandii* (Słaba et al., 2013), так и *C. lunata* (Paraszkiewicz et al., 2009, 2010). Изменение степени насыщенности в основном происходило за счет увеличения содержания стеариновой кислоты (C_{18:0}) и уменьшения содержания линолевой кислоты (C_{18:2}) (Paraszkiewicz et al., 2009, 2010; Słaba et al., 2013). По мнению авторов (Słaba et al., 2013), увеличение содержания ФХ в сочетании с возрастанием степени их насыщенности у *P. marquandii* способствовало поддержанию надлежащей текучести мембраны и приводило к снижению стресса, вызванного Cd и Ni. Интересно, что ионы Ni были более токсичными для *C. lunata*, вызывая заметные изменения ростовых и морфологических характеристик (Paraszkiewicz et al., 2009). Это может быть связано с тем, что выделенный из незагрязненной почвы гриб не имел резистентности к ТМ. Кроме этого *C. lunata*, способный в ответ на токсический стресс образовывать защитный внеклеточный полимер, под действием ионов Ni его не синтезировал (Paraszkiewicz et al., 2009).

Ионы Cu, одновременно с повышением доли ФХ и отношения ФХ/ФЭ в составе ФЛ, приводили к существенному повреждению мембран *P. marquandii* (Słaba et al., 2013). По мнению (Azevedo et al., 2007), высокая токсичность меди может быть связана с тем, что как переходный металл она вызывает повреждение мембран вследствие активации окислительного стресса. Аналогичные явления – окислительный стресс и ПОЛ – вызывает и никель (Paraszkiewicz et al., 2010).

Наименее токсичный из исследованного ряда металлов – цинк – не вызывал изменений состава ФЛ *P. marquandii*, а способствовал заметному увеличению доли ненасыщенных ЖК в составе ФЛ, в основном, за счет увеличения содержания линолевой кислоты (C_{18:2}) (Słaba et al., 2013). Цинк оказался наименее токсичным и для *C. lunata*: в его присутствии не отмечены изменения в составе ЖК ФЛ (Paraszkiewicz et al., 2009).

Таким образом, регулирование липидного профиля и степени насыщенности ФЛ может быть важным адаптационным механизмом грибов в ответ на токсическое воздействие загрязняющих веществ, способствуя выживанию грибов в неблагоприятных условиях. ФЛ и Ст составляют основу клеточных мембран и отвечают за целостность их структуры. Наиболее универсальными откликами микромицетов, способствующими их устойчивости к воздействию загрязняющих веществ, являются увеличение содержания ФХ и насыщенных ЖК в составе ФЛ, активация биосинтеза ФК. Токсиканты, вызывая снижение ко-

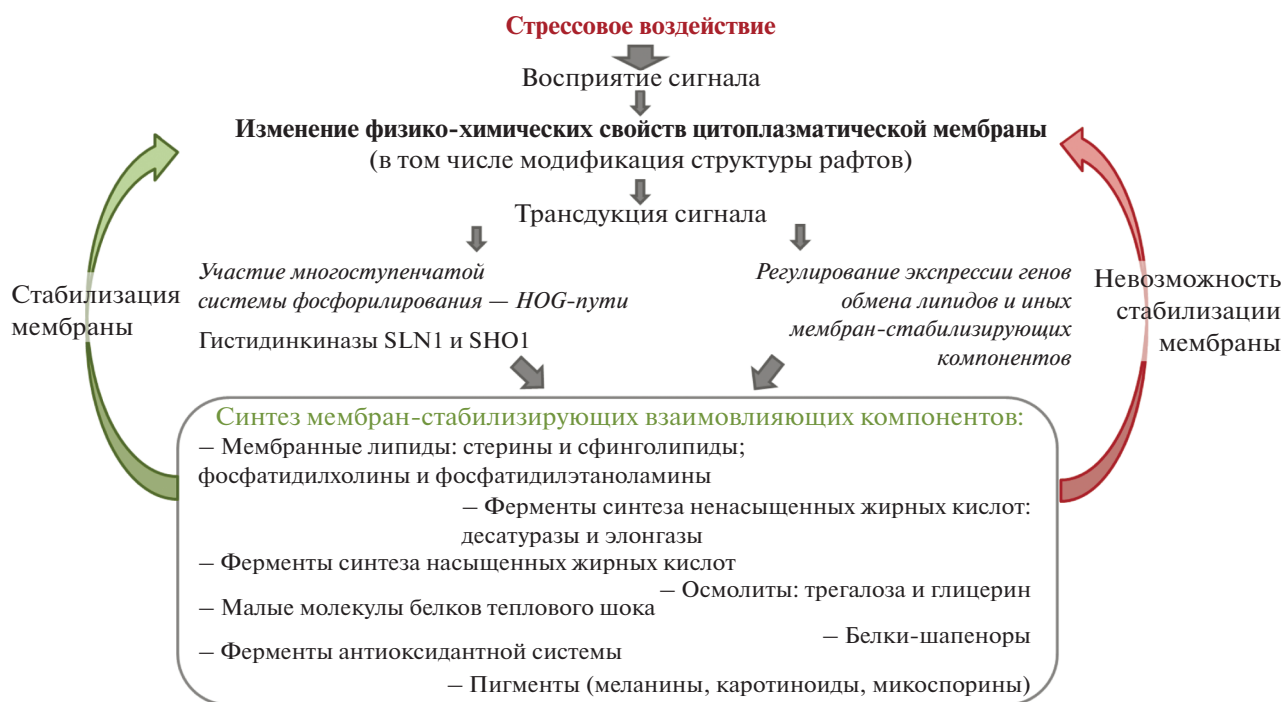


Рис. 2. Упрощенная иллюстрация комплексного ответа грибной клетки на стрессовые воздействия и роли в нем липидного обмена.

личества ФХ и Ст, активацию ПОЛ, способны повреждать мембрану и ингибировать рост грибов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ответ грибной клетки на стрессовые воздействия (осмотическое, холодное, тепловое, токсическое) является комплексным, внутри которого липидный обмен играет одну из основных ролей. Сигнал стресса, передаваемый извне через меняющую свои физико-химические свойства цитоплазматическую мембрану, поступая в клетку, запускает многоступенчатую систему фосфорилирования и экспрессию соответствующих генов, что приводит к синтезу мембраностабилизирующих компонентов (рис. 2). К данным компонентам относятся мембранные липиды; ферменты синтеза насыщенных и ненасыщенных ЖК; малые БТШ; белки-шапероны; осмолиты (трегалоза и глицерин); ферменты антиоксидантной защиты; протекторные пигменты. Мембраностабилизирующие компоненты влияют на липидный обмен: трегалоза защищает от окисления двойные связи ацильных цепей ФЛ, малые БТШ способны повышать ригидность липидного бислоя.

Воздействия стрессорных факторов приводят к качественным и количественным изменениям липидного состава, обеспечивающим адаптацию грибов к неблагоприятным условиям среды обитания. Изменения состава ФЛ, Ст и СЛ охарактеризованы как многообразные и неоднозначные,

зависящие от силы воздействия, исходного состава липидов, генетически закрепленной резистентности грибов и способности к адаптации к внешним воздействиям (табл. 1). Важным условием для поддержания стабильности в условиях стресса является вязкость мембраны грибной клетки, которая зависит от СН ФЛ и отношения Ст/ФЛ. Изменение вязкости мембраны (как увеличение, так и уменьшение) рассматривается как адаптационный механизм в ответ на стрессорные воздействия и характерен для многих изученных видов грибов. Регулирование СН ФЛ чаще всего происходит за счет модулирования количества стеариновой ($C_{18:0}$) и линолевой ($C_{18:2}$) кислот. Представление о целостности мембран может составить соотношение между ФХ и ФЭ. Повышение уровня бислоенных ФХ стабилизирует липидный бислой, в то время как небислоенные ФЭ имеют тенденцию образовывать гексагональную фазу. Отсюда следует, что изменения общего содержания двух основных групп ФЛ (ФХ и ФЭ) представляют собой адаптивный ответ грибных клеток, в частности, на токсическое действие загрязняющих веществ. Ст и СЛ играют важную роль в стабилизации мембран, регулируя их текучесть. Грибы с высоким содержанием эргостерина менее чувствительны к экстремальным осмотическим и температурным воздействиям, токсичности загрязняющих веществ. Увеличение доли ФК в составе мембранных липидов

Таблица 1. Обобщенные паттерны качественных и количественных изменений состава липидов грибов в результате осмотического, температурного воздействий и токсичности среды

Грибы	Изменения липидов в результате стрессовых воздействий	Источник
Гиперосмотическое воздействие		
<i>Fusarium</i> sp.	Повышение доли ФК и снижение доли Ст в составе мембранных липидов; снижение соотношения Ст/ФЛ	Smolyanyuk et al., 2013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Повышение доли ФЭ в составе ФЛ; повышение количества Ст и соотношения Ст/ФЛ; небольшое повышение СН ФЛ	Turk et al., 2004
<i>Debariomyces hansenii</i>	Повышение долей ФГ и Ст, снижение долей ФИ и ФС в составе мембранных липидов; повышение соотношения Ст/ФЛ и СН ФЛ	Turk et al., 2007
<i>Hortaea werneckii</i>	Снижение доли ФХ в составе ФЛ; небольшое снижение соотношения Ст/ФЛ; небольшое увеличение СН ФЛ	Turk et al., 2004
<i>Phaeothea triangularis</i>	Небольшое снижение долей ФХ и ФЭ в составе ФЛ; количество Ст не меняется; повышение соотношения Ст/ФЛ	Turk et al., 2004
Холодовое воздействие		
Мезофильные дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Небольшие изменения СН общих липидов при 4, 18, 30°C	Rossi et al., 2009
Мезофильные дрожжи <i>Candida sake</i>	Повышение СН общих липидов при 15 и 0°C	Gostinčar, Gunde-Cimerman, 2018
Мезофильный микромицет <i>Aspergillus niger</i>	Ответ на холодовой шок: повышение долей ФК и Ст в составе мембранных липидов; повышение соотношения Ст/ФЛ; повышение СН ФЛ	Ianutsevich et al., 2016
Термофильный микромицет <i>Rhizomucor miehei</i>	Ответ на холодовой шок: повышение доли ФК в мембранных липидах; снижение соотношения Ст/ФЛ; повышение СН ФЛ	Ianutsevich et al., 2020
Психрофильные дрожжи <i>Leucosporidium frigidum</i> , <i>L. nivalis</i> , <i>L. gelodum</i>	Повышение СН общих липидов за счет роста доли α -C _{18:3} при 17, 8 и -1°C	Watson et al., 1976
Тепловое воздействие		
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Cunninghamella japonica</i>	Повышение доли ФК, Ст и СЛ в составе мембранных липидов; СН ФЛ не снижается	Терёшина и соавт., 2010, 2011
<i>Rhizomucor miehei</i> , <i>R. tauricus</i> , <i>Myceliophthora thermophila</i>	Повышение доли ФК, Ст и СЛ в составе мембранных липидов; СН ФЛ не снижается	Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Повышение доли ФК, Ст и СЛ в составе мембранных липидов; СН ФЛ не снижается	Sekova et al., 2019
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Снижение доли ФЭ в составе ФЛ; снижение СН ФЛ	Glatz et al., 2016; Péter et al., 2017
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Повышение доли СЛ в составе мембранных липидов	Cowart et al., 2010; Chen et al., 2013
Воздействие токсикантов		
<i>Glomus irregulare</i>	Снижение количества Ст и ФХ	Debiane et al., 2011
<i>Rhizophagus irregularis</i>	Снижение количества предшественников Ст и ФЛ; интенсификация биосинтеза ФК	Calonne et al., 2014

Таблица 1. Окончание

Грибы	Изменения липидов в результате стрессовых воздействий	Источник
<i>Metarhizium robertsii</i> ; отдельные культуры <i>Trichoderma</i> spp. <i>Trichoderma harzianum</i>	Снижение доли ФХ и соотношения ФХ/ФЭ в составе ФЛ	Siewiera et al., 2015; Nykiel-Szymańska et al., 2019
<i>Cunninghamella elegans</i> , отдельные культуры <i>Trichoderma</i> spp. <i>Raecilomyces marquandii</i> ; <i>Curvularia lunata</i>	Снижение доли ФХ и соотношения ФХ/ФЭ в составе ФЛ; повышение доли молекулярных видов КЛ 72:7 и снижение доли КЛ 72:8; повышение количества оксипиринов (9-NODE и 13-NODE)	Mironenka et al., 2020
	Снижение долей ФЭ и ФС на фоне повышения долей ФК, ФИ и ФХ в составе ФЛ; повышение соотношения ФХ/ФЭ; увеличение доли ФК	Bernat et al., 2014; Nykiel-Szymańska et al., 2019
	Тяжелые металлы по мере снижения токсичности (Pb > Cu > Ni = Cd > Zn) вызывают меньшую степень изменения долей ФХ и ненасыщенных ЖК в составе ФЛ	Paraszkiewicz et al., 2009; Paraszkiewicz et al., 2010; Słaba et al., 2013

Примечание. Обозначения как на рис. 1.

является универсальной реакцией на описанные в обзоре неблагоприятные воздействия и может служить маркером состояния стресса микромицетов.

Таким образом, анализ литературы и собственные экспериментальные исследования позволяют заключить, что изменчивость липидных профилей, прежде всего мембранных структур, играет большую роль в адаптации микромицетов к стрессовым условиям среды. Мы полагаем, что именно с преобразованиями в липидном составе мембран связан основной механизм экологической пластичности и резистентности, способствующий повсеместному распространению грибов на Земле.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50516 (Экспансия).

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

Горбунова Е.А., Терехова В.А. Тяжелые металлы как фактор стресса для грибов: проявление их действия на клеточном и организменном уровнях // Микология и фитопатология. 1995. Т. 29. № 4. С. 63–69.

Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005. 195 с.

Розенцвиг О.А., Федосеева Е.В., Терехова В.А. Липидные биомаркеры в экологической оценке почвенной биоты: анализ жирных кислот (обзор) // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139. С. 161–177. <https://doi.org/10.1134/S0042132419020078>

Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р., Феофилова Е.П. Состав мембранных липидов и углеводов цитозоля в условиях теплового шока у *Aspergillus niger* // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 45–51.

Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р. Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 447–453.

Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R. The effect of different heat influences on composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in mycelial fungi // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 455–460. <https://doi.org/10.1134/S0026261711040199>

Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука, 2007. 215 с.

Терехова В.А., Шитиков В.К., Иванова А.Е., Кыдралиева К.А. Оценка экологического риска техногенного загрязнения почвы на основе статистического распределения встречаемости видов микромицетов // Экология. 2017. Т. 48. С. 339–346. <https://doi.org/10.7868/S0367059717050031>

Terekhova V.A., Shitikov V.K., Ivanova A.E., Kydraliev K.A. Assessment of the ecological risk of technogenic soil pollution on the basis of the statistical distribution of the occurrence of micromycete species // Russ. J. Ecol. 2017. V. 48. P. 417–424. <https://doi.org/10.1134/S1067413617050125>

Терехова В.А., Швед Л.Г. Изменение морфо-биохимических признаков водных грибов под воздействием тяжелых металлов // Экология. 1994. № 6. С. 77–79.

- Alvarez F.J., Douglas L.M., Konopka J.B. Sterol-rich plasma membrane domains in fungi // *Eukaryot. Cell*. 2007. V. 6. P. 755–763.
<https://doi.org/10.1128/EC.00008-07>
- Athanasopoulos A., André B., Sophianopoulou V., Gournas C. Fungal plasma membrane domains // *FEMS Microbiol. Lett.* 2019. V. 43. P. 642–673.
- Azevedo M.-M., Carvalho A., Pascoal C., Rodrigues F., Cásio F. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi // *Sci. Total Environ.* 2007. V. 377. P. 233–243.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.027>
- Baldrian P. Effect of heavy metals on saprotrophic soil fungi // *Soil Heavy Metals* / Eds. Sherameti I. and Varma A. *Soil Biology*. 2010. V. 19.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-02436-8>
- Ballweg S., Sezgin E., Doktorova M., Covino R., Reinhard J., Wunnicke D., Hänelt I., Levental I., Hummer G., Ernst R. Regulation of lipid saturation without sensing membrane fluidity // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14528-1>
- Balogh G., Péter M., Glatz A., Gombos I., Török Z., Horváth I., Harwood J.L., Vigh L. Key role of lipids in heat stress management // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 1970–1980.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.016>
- Barman A., Gohain D., Bora U., Tamuli R. Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi // *Microbiol. Res.* 2018. V. 209. P. 55–69.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.012>
- Bernat P., Gajewska E., Szewczyk R., Słaba M., Długoński J. Tributyltin (TBT) induces oxidative stress and modifies lipid profile in the filamentous fungus *Cunninghamella elegans* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014. V. 21. P. 4228–4235.
<https://doi.org/10.1007/s11356-013-2375-5>
- Brewster J., Valoir T. de, Dwyer N., Winter E., Gustin M. An osmosensing signal transduction pathway in yeast // *Science*. 1993. V. 259. P. 1760–1763.
<https://doi.org/10.1126/science.7681220>
- Bruder Nascimento A.C.M. de O., Reis T.F. dos, Castro P.A. de, Hori J.I., Bom V.L.P., Assis L.J. de, Ramalho L.N.Z., Rocha M.C., Malavazi I., Brown N.A., Valiante V., Brakhage A.A., Hagiwara D., Goldman G.H. Mitogen activated protein kinases SakA HOG1 and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence // *Mol. Microbiol.* 2016. V. 100. P. 841–859.
<https://doi.org/10.1111/mmi.13354>
- Calonne M., Fontaine J., Debiane D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A. The arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis* activates storage lipid biosynthesis to cope with the benzo[a]pyrene oxidative stress // *Phytochemistry*. 2014. V. 97. P. 30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.014>
- Catlett N.L., Yoder O.C., Turgeon B.G. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens // *Eukaryot. Cell*. 2003. V. 2. P. 1151–1161.
<https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1151-1161.2003>
- Cazzolli R., Shemon A.N., Fang M.Q., Hughes W.E. Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid // *IUBMB Life*. 2006. V. 58. P. 457–461.
<https://doi.org/10.1080/15216540600871142>
- Chen P.W., Fonseca L.L., Hannun Y.A., Voit E.O. Coordination of rapid sphingolipid responses to heat stress in yeast // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9. e1003078.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003078>
- Cordero R.J.B., Robert V., Cardinali G., Arinze E.S., Thon S.M., Casadevall A. Impact of yeast pigmentation on heat capture and latitudinal distribution // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. P. 2657–2664.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.034>
- Covino R., Ballweg S., Stordeur C., Michaelis J.B., Puth K., Wernig F., Bahrami A., Ernst A.M., Hummer G., Ernst R. A Eukaryotic sensor for membrane lipid saturation // *Mol. Cell*. 2016. V. 63. P. 49–59.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.015>
- Cowart L.A., Gandy J.L., Tholanikunnel B., Hannun Y.A. Sphingolipids mediate formation of mRNA processing bodies during the heat-stress response of *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. J.* 2010. V. 431. P. 31–38.
<https://doi.org/10.1042/BJ20100307>
- Debiane D., Calonne M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A. Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution // *Fungal Biol.* 2011. V. 115. P. 782–792.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.06.003>
- Ding X., Liu K., Lu Y., Gong G. Morphological, transcriptional, and metabolic analyses of osmotic-adapted mechanisms of the halophilic *Aspergillus montevidensis* ZYD4 under hypersaline conditions // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 3829–3846.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09705-2>
- Epstein S. Sphingolipid signaling in yeast potential implications for understanding disease // *Front. Biosci.* 2013. V. E5. P. E599.
<https://doi.org/10.2741/E599>
- Ernst R., Ejsing C.S., Antonny B. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. P. 4776–4791.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.013>
- Escribá P.V., González-Ros J.M., Goñi F.M., Kinnunen P.K.J., Vigh L., Sánchez-Magraner L., Fernández A.M., Busquets X., Horváth I., Barceló-Coblijn G. Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies: Translational Medicine // *J. Cell. Mol. Med.* 2008. V. 12. P. 829–875.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00281.x>
- Espenshade P.J., Hughes A.L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes // *Annu. Rev. Genet.* 2007. V. 41. P. 401–427.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130315>
- Fassler J.S., West A.H. Histidine phosphotransfer proteins in fungal two-component signal transduction pathways // *Eukaryot. Cell*. 2013. V. 12. P. 1052–1060.
<https://doi.org/10.1128/EC.00083-13>
- Fernandes C.M., Goldman G.H., Poeta M. Del Biological roles played by sphingolipids in dimorphic and filamentous fungi // *MBio*. 2018. V. 9. №3. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00642-18>
- Gadd G. Fungi and industrial pollutants // *Environmental and Microbial Relationships. The Mycota*. V. 4. / Eds. Druzhinina I.S., Kubicek C.P. Springer, 2016. 3 ed. V. 4. P. 99–125.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-29532-9>
- Glatz A., Pilbat A., Németh G.L., Vince-Kontár K., Jószyay K., Hunya Á., Udvardy A., Gombos I., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vigh L., Török Z. Involvement of small heat shock

- proteins, trehalose, and lipids in the thermal stress management in *Schizosaccharomyces pombe* // Cell Stress Chaperones. 2016. V. 21. P. 327–338.
<https://doi.org/10.1007/s12192-015-0662-4>
- Golub T., Wacha S., Caroni P. Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts // Curr. Opin. Neurobiol. 2004. V. 14. P. 542–550.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.08.003>
- Goncalves N.V., Aline B.M., Rosa C.A. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 82. P. 459–471.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7100445>
- Gostinčar C., Turk M., Trbuha T., Vaupotič T., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. Expression of fatty-acid-modifying enzymes in the halotolerant black yeast *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud under salt stress // Stud. Mycol. 2008. V. 61. P. 51–59.
<https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.04>
- Gostinčar C., Turk M., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. The expressions of Δ^9 -, Δ^{12} -desaturases and an elongase by the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* are salt dependent // FEMS Yeast Res. 2009. V. 9. P. 247–256.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00481.x>
- Gostinčar C., Gunde-Cimerman N. Overview of oxidative stress response genes in selected halophilic fungi // Genes (Basel). 2018. V. 9. Art. 143. P. 1–13.
<https://doi.org/10.3390/genes9030143>
- Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Bondarenko S.A., Debets A.J.M., Bilanenko E.N. On the diversity of fungi from soda soils // Fungal Diversity. 2016. V. 76. P. 27–74.
<https://doi.org/10.1007/s13225-015-0320-2>
- Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. P. 353–375.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
- Haas K. Role of sterol metabolism and endoplasmic reticulum-associated degradation of proteins in cold adaptation of yeasts // Cold-Adapted Yeasts / Eds. Buzzini P., Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 281–293.
- Hać-Wydro K., Połec K., Broniatowski M. The comparative analysis of the effect of environmental toxicants: Bisphenol A, S and F on model plant, fungi and bacteria membranes. The studies on multicomponent systems // J. Mol. Liq. 2019. V. 289. P. 111136.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111136>
- Harayama T., Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2018. V. 19. P. 281–296.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Hayashi M., Maeda T. Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biochem. 2006. V. 139. P. 797–803.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvj089>
- He B., Ma L., Hu Z., Li H., Ai M., Long C., Zeng B. Deep sequencing analysis of transcriptomes in *Aspergillus oryzae* in response to salinity stress // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 897–906.
<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8603-z>
- Holthuis J.C.M., Menon A.K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis // Nature. 2014. V. 510. P. 48–57.
<https://doi.org/10.1038/nature13474>
- Hong J., Gierasch L.M., Liu Z. Its preferential interactions with biopolymers account for diverse observed effects of trehalose // Biophys. J. 2015. V. 109. P. 144–153.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.05.037>
- Horváth I., Multhoff G., Sonnleitner A., Vigh L. Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones // Biochim. Biophys. Acta – Biomembr. 2008. V. 1778. P. 1653–1664.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.02.012>
- Hosono K. Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* // J. Gen. Microbiol. 1992. V. 138. P. 91–96.
<https://doi.org/10.1099/00221287-138-1-91>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Tereshina V.M. Membrane lipids and cytosol carbohydrates in *Aspergillus niger* under osmotic, oxidative, and cold impact // Microbiology (Moscow). 2016a. V. 85. P. 302–310.
<https://doi.org/10.1134/S0026261716030152>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Kotlova E.R., Tereshina V.M. Heat shock response of thermophilic fungi: Membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // Microbiology (SGM). 2016b. V. 162. P. 989–999.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000279>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Kurilov D.V., Zavarzin I.V., Tereshina V.M. Osmolytes and membrane lipids in adaptive response of thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* to cold, osmotic and oxidative shocks // Extremophiles. 2020a. V. 24. P. 391–401.
<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01163-3>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Kurilov D.V., Zavarzin I.V., Tereshina V.M. Osmolytes and membrane lipids in adaptive response of thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* to cold, osmotic and oxidative shocks // Extremophiles. 2020b. V. 24. P. 391–401.
<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01163-3>
- Inouye M., Phadtare S. Cold-shock response and adaptation to near-freezing temperature in cold-adapted yeasts // Cold-Adapted Yeasts / Eds. Buzzini P., Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 243–257.
- Jacob S., Thines E. Multistep phosphorelay in fungi: the enigma of multiple signals and a limited number of signaling pathways // Mycol. Prog. 2017. V. 16. P. 1007–1013.
<https://doi.org/10.1007/s11557-017-1342-9>
- Jang J.H., Lee C.S., Hwang D., Ryu S.H. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners // Prog. Lipid Res. 2012. V. 51. P. 71–81.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.003>
- Khaware R.K., Koul A., Prasad R. High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranefaciens* // Biochem. Mol. Biol. Int. 1995. V. 35. №4. P. 875–880.
- Kim H.J., Lee J.H., Do H., Jung W. Production of antifreeze proteins by cold-adapted yeasts // Cold-Adapted Yeasts / Eds. Buzzini P., Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 259–280.
- Kim I.-S., Moon H.-Y., Yun H.-S., Jin I. Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 // J. Microbiol. 2006. V. 44. P. 492–501.

- Kimata Y., Nguyen T.M.P., Kohno K. Response and cytoprotective mechanisms against proteotoxic stress in yeast and fungi // *Stress Response Mechanisms in Fungi* / Ed. Skoneczny M. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 161–188.
- Klose C., Surma M.A., Gerl M.J., Meyenhofer F., Shevchenko A., Simons K. Flexibility of a eukaryotic lipidome – insights from yeast lipidomics // *PLoS One*. 2012. V. 7. e35063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035063>
- Kodedová M., Sychrová H. Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae* // *PLoS One*. 2015. V. 10. e0139306. P. 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139306>
- Kooijman E.E., Burger K.N.J. Biophysics and function of phosphatidic acid: A molecular perspective // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids*. 2009. V. 1791. P. 881–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.04.001>
- Laroche C., Beney L., Marechal P.A., Gervais P. The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 56. P. 249–254. <https://doi.org/10.1007/s002530000583>
- Leach M.D., Farrer R.A., Tan K., Miao Z., Walker L.A., Cuomo C.A., Wheeler R.T., Brown A.J.P., Wong K.H., Cowen L.E. Hsf1 and Hsp90 orchestrate temperature-dependent global transcriptional remodelling and chromatin architecture in *Candida albicans* // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. Art. 11704. <https://doi.org/10.1038/ncomms11704>
- Li S., Yu H., Liu Y., Zhang X., Ma F. The lipid strategies in *Cunninghamella echinulata* for an allostatic response to temperature changes // *Process Biochem.* 2019. V. 76. P. 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.005>
- Li Z., Agellon L.B., Allen T.M., Umeda M., Jewell L., Mason A., Vance D.E. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis // *Cell Metab.* 2006. V. 3. P. 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.007>
- Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // *Science*. 2010. V. 327. P. 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>
- Liu K.-H., Ding X.-W., Narsing Rao M.P., Zhang B., Zhang Y.-G., Liu F.-H., Liu B.-B., Xiao M., Li W.-J. Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress // *Front. Microbiol.* 2017a. V. 8. P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01789>
- Liu Y.-N., Lu X.-X., Chen D., Lu Y.-P., Ren A., Shi L., Zhu J., Jiang A.-L., Yu H.-S., Zhao M.-W. Phospholipase D and phosphatidic acid mediate heat stress induced secondary metabolism in *Ganoderma lucidum* // *Environ. Microbiol.* 2017b. V. 19. P. 4657–4669. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13928>
- Loertscher J., Larson L.L., Matson C.K., Parrish M.L., Felthouser A., Sturm A., Tachibana C., Bard M., Wright R. Endoplasmic reticulum-associated degradation is required for cold adaptation and regulation of sterol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Eukaryot. Cell*. 2006. V. 5. P. 712–722. <https://doi.org/10.1128/EC.5.4.712-722.2006>
- Manfiolli A.O., Mattos E.C., Assis L.J. De, Silva L.P., Ulas M., Brown N.A., Silva-Rocha R., Bayram Ö., Goldman G.H. *Aspergillus fumigatus* high osmolarity glycerol mitogen activated protein kinases SakA and MpkC physically interact during osmotic and cell wall stresses // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00918>
- Mantil E., Crippin T., Avis T.J. Supported lipid bilayers using extracted microbial lipids: domain redistribution in the presence of fengycin // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019. V. 178. P. 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.050>
- Margesin R., Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms // *Res. Microbiol.* 2011. V. 162. P. 346–361. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004>
- McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling // *Nature*. 2005. V. 438. P. 590–596. <https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Meier K.D., Deloche O., Kajiwara K., Funato K., Riezman H. Sphingoid base is required for translation initiation during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Biol. Cell*. 2006. V. 17. P. 1164–1175. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-11-1039>
- Mironenka J., Różalska S., Soboń A., Bernat P. Lipids, proteins and extracellular metabolites of *Trichoderma harzianum* modifications caused by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a plant growth stimulator // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. V. 194. P. 110383. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110383>
- Moliné M., Libkind D., Garcia V. de, Giraud M.R. Production of pigments and photo-protective compounds by cold-adapted yeasts // *Cold-Adapted Yeasts* / Eds. Buzzini P., Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 193–224.
- Morano K.A., Grant C.M., Moye-Rowley W.S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. 2012. V. 190. P. 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Munnik T. Phosphatidic acid: An emerging plant lipid second messenger // *Trends Plant Sci.* 2001. V. 6. P. 227–233. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01918-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01918-5)
- Nakagawa Y., Sakumoto N., Kaneko Y., Harashima S. Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 291. P. 707–713. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6507>
- Nicolson G.L. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2014. V. 1838. P. 1451–1466. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>
- Nykiel-Szymańska J., Różalska S., Bernat P., Staba M. Assessment of oxidative stress and phospholipids alterations in chloroacetanilides-degrading *Trichoderma* spp. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019. V. 184. P. 109629. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109629>

- Pan J., Hu C., Yu J.H. Lipid biosynthesis as an antifungal target // *J. Fungi*. 2018. V. 4. P. 1–13.
<https://doi.org/10.3390/jof4020050>
- Paraszkiewicz K., Bernat P., Naliwajski M., Długoński J. Lipid peroxidation in the fungus *Curvularia lunata* exposed to nickel // *Arch. Microbiol.* 2010. V. 192. P. 135–141.
<https://doi.org/10.1007/s00203-009-0542-3>
- Paraszkiewicz K., Bernat P., Długoński J. Effect of nickel, copper, and zinc on emulsifier production and saturation of cellular fatty acids in the filamentous fungus *Curvularia lunata* // *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2009. V. 63. P. 100–105.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.03.015>
- Péter M., Glatz A., Gudmann P., Gombos I., Török Z., Horváth I., Vigh L., Balogh G. Metabolic crosstalk between membrane and storage lipids facilitates heat stress management in *Schizosaccharomyces pombe* // *PLoS One*. 2017. V. 12. №3. P. e0173739.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173739>
- Piper P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Microbiol. Rev.* 1993. V. 11. P. 339–355.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00005.x>
- Rangel D.E.N. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011a. V. 27. P. 1281–1296.
<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0584-3>
- Redón M., Guillamón J.M., Mas A., Rozès N. Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature // *Eur. Food Res. Technol.* 2009. V. 228. P. 833–840.
<https://doi.org/10.1007/s00217-008-0996-6>
- Redón M., Borrull A., López M., Salvadó Z., Cordero R., Mas A., Guillamón J.M., Rozès N. Effect of low temperature upon vitality of *Saccharomyces cerevisiae* phospholipid mutants // *Yeast*. 2012. V. 29. P. 443–452.
<https://doi.org/10.1002/yea.2924>
- Renne M.F., de Kroon A.I.P.M. The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes // *FEBS Lett.* 2018. V. 592. P. 1330–1345.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12944>
- Rep M., Krantz M., Thevelein J.M., Hohmann S. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 8290–8300.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8290>
- Řezanka T., Kolouchová I., Gharwalová L., Doležalová J., Nedbalová L., Sigler K. Sphingolipidomics of thermotolerant yeasts // *Lipids*. 2018. V. 53. P. 627–639.
<https://doi.org/10.1002/lipd.12076>
- Rodríguez-Vargas S., Sánchez-García A., Martínez-Rivas J.M., Prieto J.A., Randez-Gil F. Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 110–116.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01360-06>
- Román E., Correia I., Prieto D., Alonso R., Pla J. The HOG MAPK pathway in *Candida albicans*: more than an osmosensing pathway // *Int. Microbiol.* 2020. V. 23. P. 23–29.
<https://doi.org/10.1007/s10123-019-00069-1>
- Rossi M., Buzzini P., Cordisco L., Amaretti A., Sala M., Raimondi S., Ponzoni C., Pagnoni U.M., Matteuzzi D. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009. V. 69. P. 363–372.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00727.x>
- Ruenwai R., Neiss A., Laoteng K., Vongsangnak W., Dalfard A.B., Cheevadhanarak S., Petranovic D., Nielsen J. Heterologous production of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* causes a global transcriptional response resulting in reduced proteasomal activity and increased oxidative stress // *Biotechnol. J.* 2011. V. 6. P. 343–356.
<https://doi.org/10.1002/biot.201000316>
- Sahara T., Goda T., Ohgiya S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 50015–50021.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209258200>
- Salar R.K. *Thermophilic Fungi: Basic Concepts and Biotechnological Applications*. CRC Press, 2018. 352 p.
- Satyanarayana T., Johri B.N. *Physiology and biochemistry of thermophilic moulds* // *Thermophilic Moulds in Biotechnology* / Eds. Johri B.N., Satyanarayana T., Olsen J. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. P. 85–113.
- Sazanova K.V., Senik S.V., Kirtsideli I.Yu., Shavarda A.L. Metabolomic profiling and lipid composition of Arctic and Antarctic strains of micromycetes *Geomyces pannorum* and *Thelebolus microsporus* grown at different temperatures // *Microbiology (Moscow)*. 2019. V. 88. P. 282–291.
<https://doi.org/10.1134/S002626171903011>
- Sekova V.Y., Dergacheva D.I., Isakova E.P., Gessler N.N., Tereshina V.M., Deryabina Y.I. Soluble sugar and lipid readjustments in the *Yarrowia lipolytica* yeast at various temperatures and pH // *Metabolites*. 2019. V. 9. P. 307.
<https://doi.org/10.3390/metabo9120307>
- Shin J.J., Loewen C.J. Putting the pH into phosphatidic acid signaling // *BMC Biol.* 2011. V. 9. P. 85.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-85>
- Siewiera P., Bernat P., Różalska S., Długoński J. Estradiol improves tributyltin degradation by the filamentous fungus *Metarhizium robertsii* // *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 2015. V. 104. P. 258–263.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.014>
- Simons K., Sampaio J. Membrane organization and lipid rafts // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. V. 3. P. a004697.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>
- Sinensky M. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. P. 522–525.
- Singer M.A., Lindquist S. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo* // *Mol. Cell*. 1998. V. 1. P. 639–648.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80064-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80064-7)
- Słaba M., Szewczyk R., Piątek M.A., Długoński J. Alachlor oxidation by the filamentous fungus *Paecilomyces marquandii* // *J. Hazard Mater.* 2013. V. 261. P. 443–450.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.064>
- Smolyanyuk E.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M., Kachalkin A.V., Kamzolkina O.V. Effect of sodium chloride concentration in the medium on the composition of the membrane lipids and carbohydrates in the cytosol of the fungus *Fusarium* sp. // *Microbiology (Moscow)*. 2013.

- V. 82. P. 600–608.
<https://doi.org/10.1134/S0026261713050111>
- Sum A.K., Faller R., de Pablo J.J. Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 2830–2844.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74706-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74706-7)
- Tanigawa M., Kihara A., Terashima M., Takahara T., Maeda T. Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response // *Mol. Cell. Biol.* 2012. V. 32. P. 2861–2870.
<https://doi.org/10.1128/MCB.06111-11>
- Tatebayashi K., Yamamoto K., Tomida T., Nishimura A., Takayama T., Oyama M., Kozuka-Hata H., Adachi-Akahane S., Tokunaga Y., Saito H. Osmostress enhances activating phosphorylation of Hog1 MAP kinase by mono-phosphorylated Pbs2 MAP2K // *EMBO J.* 2020. V. 39. P. 1–25.
<https://doi.org/10.15252/embj.2019103444>
- Thibault G., Shui G., Kim W., McAlister G.C., Ismail N., Gygi S.P., Wenk M.R., Ng D.T.W. The membrane stress response buffers lethal effects of lipid disequilibrium by reprogramming the protein homeostasis network // *Mol. Cell.* 2012. V. 48. P. 16–27.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.016>
- Tiwari S., Thakur R., Shankar J. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi // *Biotechnol. Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2015/132635>
- Turk M., Méjanelle L., Šentjerc M., Grimalt J.O., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi // *Extremophiles.* 2004. V. 8. P. 53–61.
<https://doi.org/10.1007/s00792-003-0360-5>
- Turk M., Montiel V., Žigon D., Plemenitaš A., Ramos J. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity // *Microbiology (SGM)*. 2007a. V. 153. P. 3586–3592.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009563-0>
- Turk M., Abramović Z., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi // *FEMS Yeast Res.* 2007b. V. 7. P. 550–557.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00209.x>
- Turk M., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. Extremophilic yeasts: Plasma-membrane fluidity as determinant of stress tolerance // *Fungal Biol.* 2011. V. 115. P. 950–958.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.006>
- van den Brink-van der Laan E., Killian J.A., de Kruijff B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2004. V. 1666. P. 275–288.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.010>
- Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V., Benson A.A. Identification of diacylglycerol-4'-*o*-(N,N,N-trimethyl)homoserine in mushrooms // *Lipids.* 1991. V. 26. P. 254–256.
- Verghese J., Abrams J., Wang Y., Morano K.A. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. P. 115–158.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.05018-11>
- Vesentini D., Dickinson D.J., Murphy R.J. The protective role of the extracellular mucilaginous material (ECMM) from two wood-rotting basidiomycetes against copper toxicity // *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2007. V. 60. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.11.006>
- Wang D., Zhang M., Huang J., Zhou R., Jin Y., Wu C. *Zygosaccharomyces rouxii* combats salt stress by maintaining cell membrane structure and functionality // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 30. P. 62–70.
- Watson K., Arthur H., Shipton W.A. Leucosporidium yeasts: obligate psychrophiles which alter membrane-lipid and cytochrome composition with temperature // *J. Gen. Microbiol.* 1976. V. 97. P. 11–18.
<https://doi.org/10.1099/00221287-97-1-11>
- Weete J.D. Introduction to fungal lipids // *Fungal Lipid Biochemistry* / Ed. Kritchevsky D. New York: Springer US, 1974. Ch. 1. P. 3–36.
- Weete J.D. Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms. Boston, MA: Springer US, 1980. 388 p.
- Weete J.D., Gandhi S.R. Biochemistry and molecular biology of fungal sterols // *The Mycota. III Biochemistry and Molecular Biology.* Berlin, Heidelberg, N.Y.: Springer-Verlag, 1996. P. 421–438.
- Welker S., Rudolph B., Frenzel E., Hagn F., Liebisch G., Schmitz G., Scheuring J., Kerth A., Blume A., Weinkauff S., Haslbeck M., Kessler H., Buchner J. Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. P. 507–520.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.001>
- Winkler A., Arkind C., Mattison C.P., Burkholder A., Knoche K., Ota I. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress // *Eukaryot. Cell.* 2002. V. 1. P. 163–173.
<https://doi.org/10.1128/EC.1.2.163-173.2002>
- Wu C., Zhang J., Zhu G., Yao R., Chen X., Liu L. Cg Hog1-mediated Cg Rds2 phosphorylation alters glycerophospholipid composition to coordinate osmotic stress in *Candida glabrata* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. V. 85. P. 1–19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02822-18>
- Xia J., Jones A.D., Lau M.W., Yuan Y.-J., Dale B.E., Balan V. Comparative lipidomic profiling of xylose-metabolizing *S. cerevisiae* and its parental strain in different media reveals correlations between membrane lipids and fermentation capacity // *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. P. 12–21.
<https://doi.org/10.1002/bit.22910>
- Yamashita A., Hayashi Y., Nemoto-Sasaki Y., Ito M., Oka S., Tanikawa T., Waku K., Sugiura T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms // *Progr. Lipid Res.* 2014. V. 53. P. 18–81.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.10.001>
- Yanutsevich E.A., Memorskaya A.S., Groza N.V., Kochkina G.A., Tereshina V.M. Heat shock response in the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 498–504.
<https://doi.org/10.1134/S0026261714050282>
- Zhang Y., Xu J. Molecular mechanisms of fungal adaptive evolution // *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution Grand Challenges in Biology and Biotechnology* / Ed. Rampelotto P. Springer, Cham, 2018. P. 409–435.

Micromycete Lipids and Stress

E. V. Fedoseeva^{1,*}, O. A. Danilova², E. A. Ianutsevich², V. A. Terekhova^{3,4}, and V. M. Tereshina²

¹*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia*

²*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119091 Russia*

³*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, 119071 Russia*

⁴*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: elenfedoseeva@gmail.com*

Received: June 25, 2020; revised: July 10, 2020; accepted: July 10, 2020

Abstract—Among the variety of living organisms, microscopic fungi have no equal in their ability to occupy various ecological niches due to evolutionarily formed mechanisms of adaptation to a wide range of variability of climatic and technogenic factors. One approach to understanding the mechanisms of adaptation to changing environmental conditions is associated with lipid metabolism. The review provides a critical analysis of publications and our own experimental data on the variability of micromycete lipids under the influence of stress factors and the possible adaptation mechanisms associated with this. The functional, structural, and quantitative changes in fungal lipids were analyzed under the conditions of osmotic, thermal, and cold influences, as well as toxicity. Biochemical changes in the composition of phospholipids and other membrane lipids are characterized as diverse and ambiguous, depending on the degree of exposure, the initial composition of lipids, the resistance of fungi and the ability to adapt to external influences. The role of lipid metabolism in the overall complex response of fungal cells to stress has been discussed.

Keywords: fungi, membrane, viscosity, phospholipids, sterols, sphingolipids, degree of unsaturation, osmotic shock, heat shock, cold shock, environmental toxicity

СНИЖЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК И ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ И ВЫСУШИВАНИЮ У *ahpC* МУТАНТА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

© 2021 г. А. В. Шелудько^а, *, Д. И. Мокеев^а, С. С. Евстигнеева^а,
Ю. А. Филипьева^а, А. М. Буров^а, Л. П. Петрова^а, Е. И. Кацы^а, **

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

*e-mail: shel71@yandex.ru

**e-mail: ei_katsy@mail.ru

Поступила в редакцию 21.02.2020 г.

После доработки 14.07.2020 г.

Принята к публикации 10.08.2020 г.

Azospirillum brasilense формируют биопленки на разнообразных поверхностях. Ранее было показано, что инактивация гена *ahpC* алкилгидропероксидредуктазы у мутанта SK586 штамма *A. brasilense* Sp245 привела к повышению чувствительности к пероксидам и к изменениям в жгутиковании, подвижности и свойствах клеточной поверхности. В данной работе установлено, что штамм Sp245 в условиях лимита по азоту переходит преимущественно к биопленочному существованию, тогда как для *ahpC* мутанта SK586 такая тенденция не характерна. Инактивация гена *ahpC* негативно влияет на жизнеспособность клеток SK586 в составе биопленок, что наиболее заметно при дефиците азота. При отсутствии существенных морфологических различий цистоподобных форм Sp245 и SK586 устойчивые к высушиванию покоящиеся формы мутанта из безазотистой среды были более чувствительны к перекиси водорода, чем покоящиеся формы Sp245. В биопленках штамма Sp245 устойчивые к высушиванию жизнеспособные формы обнаруживались и после 9 мес. хранения, а в биопленках мутанта SK586 такие бактерии сохраняли жизнеспособность менее месяца. При адаптации к корневой системе растений увеличивалось количество клеточных форм азоспирилл, устойчивых к высушиванию, по сравнению с числом таких клеток из зрелых биопленок на абиотических поверхностях. В отличие от Sp245 *ahpC*, мутант SK586 не оказывал позитивного влияния на развитие корневой системы и рост надземной части 10-дневных растений – возможно, из-за сниженной способности к колонизации корней проростков пшеницы, инкубируемых в жидкой среде. По-видимому, алкилгидропероксидредуктаза существенна для более успешного противостояния азоспирилл разнообразным стрессам и для проявления стимулирующей рост растений активности этих бактерий.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, AhpC, алкилгидропероксидредуктаза, биопленки, ультраструктура, покоящиеся формы бактерий, устойчивость к стрессам, стимулирование роста растений

DOI: 10.31857/S0026365621010110

Альфапротеобактерии *Azospirillum brasilense*, обитающие в фитосфере и используемые в качестве биоудобрений, оказывают существенное положительное влияние на рост растений и их устойчивость к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам (Bashan, de-Bashan, 2010; Fibach-Paldi et al., 2012; Fukami et al., 2018). Растения воспринимают не только патогенные, но и полезные бактерии как потенциальную угрозу и защищаются от них, в частности, с помощью продукции перекиси водорода и других активных форм кислорода (АФК) (Васильева и соавт., 2007). Полагают, что устойчивость бактерий к окислительно-му стрессу способствует успешной колонизации

ими растений (Fukami et al., 2018). Защите клеток азоспирилл от эндогенных и экзогенных АФК помогают такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза и алкилгидропероксидредуктаза (Tarrand et al., 1978; Nur et al., 1982; Clara, Knowles, 1984; Wasim et al., 2009).

Определенное значение для успешного формирования и функционирования растительно-микробной ассоциации и противостояния бактерий и растений различным абиотическим стрессам может иметь способность азоспирилл формировать биопленки на корнях растения-хозяина (Шелудько и соавт., 2010; Fibach-Paldi et al., 2012; Vogino et al., 2013). В биопленках бактерии заключе-

ны в матрикс, являющийся резервуаром воды, ферментов и питательных веществ и играющий структурную и защитную роль (Flemming, Wingender, 2010). Матрикс биопленок медленно высыхает, чем предохраняет микроорганизмы от изменений водного потенциала. Исследованы состав, структура и функции основных биополимеров матрикса биопленок азоспирилл, обеспечивающих фиксацию зрелых биопленок на твердой поверхности и выполняющих каркасную функцию, способствующих созданию в биопленках условий для фиксации азота (Ramírez-Mata et al., 2016; Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2018). Охарактеризован морфологический и функциональный полиморфизм клеточных форм в биопленках азоспирилл (Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2020). Так, наличие покоящихся форм в биопленочной популяции повышает устойчивость к таким негативным воздействиям, как высушивание и окислительный стресс (Шелудько и соавт., 2020). Однако сведения о физиолого-биохимических механизмах защиты клеток от данного типа воздействий имеют лишь предварительный характер (Шелудько и соавт., 2020). Анализ систем защиты от окислительного и других стрессов интересен также и для осмысления роли этих систем в адаптации азоспирилл к существованию как в динамичной почвенной среде, так и в ассоциации с растениями (Fukami et al., 2018).

Объектами нашего исследования стали активно исследуемый штамм *A. brasilense* Sp245, способный проникать внутрь корней и заселять межклетники проводящей системы и корневые волоски пшеницы (Baldani et al., 1983; Schloter et al., 1998), и полученный нами ранее мутант SK586 (Sheludko et al., 1998), у которого одиночная вставка искусственного транспозона Omegon-Km находится в каталитической субъединице С алкилгидропероксидредуктазы (AhpC) – одного из ферментов защиты от АФК (Poole, Ellis, 1996; Wasim et al., 2009). Ранее было показано, что инактивация AhpC у мутанта SK586 привела к множественным фенотипическим изменениям, включая жгутикование и подвижность бактерий, морфологию колоний и свойства клеточной поверхности, способность клеток к агрегации (Sheludko et al., 1998; Wasim et al., 2009).

На наш взгляд, биопленки *ahpC* мутанта SK586 могли стать интересным объектом для анализа возможного вклада алкилгидропероксидредуктазы в адаптацию биопленочной популяции азоспирилл к окислительному и другим стрессам. К примеру, известно, что у ряда бактерий в условиях теплового шока AhpC выполняет функции шаперона и предотвращает агрегацию белков (Lee et al., 2016; Kamariah et al., 2018).

Целью данной работы явилось исследование формирования биопленок культурами штамма

A. brasilense Sp245 и его инсерционного *ahpC* мутанта SK586, характеристика устойчивости биопленок к неблагоприятным внешним факторам. В наши задачи входил анализ влияния состава среды культивирования на формирование биопленок штаммов Sp245 и SK586, сравнение устойчивости биопленочных популяций к окислительному стрессу и высушиванию, анализ колонизации этими бактериями корней проростков пшеницы и способности стимулировать рост растений-партнеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий и питательные среды. В работе использовали штамм *A. brasilense* Sp245 [IBPPM 219], выделенный в Бразилии из корней пшеницы (*Triticum* sp.) (Baldani et al., 1983), и его дефектный по жгутикованию и подвижности Omegon-Km мутант SK586 (Sheludko et al., 1998), содержащий вставку искусственного транспозона Omegon-Km (Km^R) в гене *ahpC* каталитической субъединицы С алкилгидропероксидредуктазы (Wasim et al., 2009).

Бактерии культивировали при 30°C на малатно-солевой среде (МСС) (Döbereiner, Day, 1976) с NH₄Cl (1 г/л) или без него и на среде Lugia–Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Плотные и полужидкие среды содержали 1.8 и 0.3% Бакто агара соответственно. Мутант SK586 культивировали в присутствии 50 мкг/мл канамицина (Km).

Анализ формирования и микроструктуры биопленок. Ночные (24 ч; стационарная фаза роста) культуры азоспирилл, выращенные с аэрацией в жидкой МСС с NH₄Cl, отмывали 50 мМ фосфатным буфером (ФБ) (pH 7.0) и суспендировали до ОП₅₉₀ = 0.05–0.10 (*l* = 0.5 см) в свежей МСС с хлоридом аммония или без него. Вносили по 2 мл или по 0.2 мл полученных суспензий соответственно в стеклянные пробирки и ячейки полистирольных планшетов с 96-ю плоскодонными лунками и инкубировали 6 сут при 30°C в стационарных условиях. За это время стабилизировалось относительное количество биомассы в биопленках азоспирилл и завершалось их формирование (зрелые биопленки, относительное количество биомассы в которых не изменяется при увеличении сроков культивирования в исследованном временном диапазоне от 6 до 11 сут) (Шелудько и соавт., 2015). Относительное количество биомассы в зрелых биопленках оценивали посредством окраски биопленок кристаллическим фиолетовым (O'Toole, Kolter, 1998), как подробно описано в работе Шелудько и соавт. (2020). Фазово-контрастную микроскопию биопленок и планктонных клеток выполняли на приборе Leica DM6000 B ("Leica Microsystems", Германия).

Приготовление ультратонких срезов. Биопленки осторожно промывали и смывали 50 мМ ФБ (рН 7.0). Смывы, содержащие фрагменты биопленок, или 24-ч планктонные культуры из жидкой МСС с азотом, выросшие в условиях аэрации, осаждали центрифугированием. Полученные образцы биопленочных и планктонных клеток поэтапно фиксировали (растворами 2.5% глутарового альдегида и 1% OsO₄ в 0.1 М какодилатном буфере (рН 7.2)) и обезвоживали, как описано ранее (Шелудько и соавт., 2020). Обезвоженный материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Срезы получали на ультратоме, переносили на сеточки и при необходимости негативно окрашивали 3% раствором уранилацетата в 70% спирте. Ультратонкие срезы просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ.

Анализ влияния перекиси водорода на жизнеспособность азоспирилл выполняли, как описано Шелудько и соавт. (2020). Зрелые биопленки или 24-ч планктонные культуры, выращенные с аэрацией, инкубировали 18 ч в 50 мМ ФБ (рН 7.0), содержащем 0, 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.01, 0.1 или 1% H₂O₂. Пробирки с биопленками предварительно осторожно промывали этим же буфером, а после его удаления вносили 2.5 мл раствора H₂O₂ соответствующей концентрации. В случае планктонных бактерий 2 мл жидких культур, разведенных до ОП₅₉₀ = 0.3–0.4 (*l* = 0.5 см), осаждали и ресуспендировали в 2.5 мл раствора H₂O₂. (Суспензии азоспирилл с ОП₅₉₀ = 0.3–0.4 содержат (5.5 ± 0.5) × 10⁹ жизнеспособных бактерий в 1 мл). Через 18 ч удаляли раствор H₂O₂ из пробирок с биопленками, а планктонные клетки осаждали центрифугированием. В пробирки с биопленками или осадком планктонных клеток вносили по 2.5 мл безазотистой МСС, содержащей 0.3% агара. Через 24–48 ч инкубации фиксировали наличие роста под поверхностью полужидкой среды. Отсутствие роста свидетельствовало о гибели бактерий.

Определение численности жизнеспособных клеток в биопленках и их устойчивости к высушиванию. Зрелые биопленки осторожно промывали 50 мМ ФБ (рН 7.0). Определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в промытых нативных (не подвергавшихся каким-либо воздействиям) и сухих биопленках. В последнем случае промытые биопленки сушили при 30°C и хранили при 37°C. Для определения КОЕ в пробирки с биопленками вносили по 2 мл 50 мМ ФБ (рН 7.0), инкубировали 1 ч и смывали биомассу. Биомассу ресуспендировали в 50 мМ ФБ (рН 7.0) и 1 мин диспергировали на встряхивателе Vortex (при световой микроскопии этих суспензий сразу после их получения агрегатов клеток не наблюдали). Из полученной суспензии готовили серию десятикратных разведений и высевали из них по 100 мкл на плотную

МСС с азотом. Результаты с учетом разведения пересчитывали на 1 мл смыва. В качестве контроля использовали пробирки, в которых 6 сут инкубировали стерильную питательную среду. Результаты повторного проверочного окрашивания поверхности стекла опытных пробирок после смывания из них биопленок не отличались от контрольных значений и не превышали 0.04 ед. ОП₅₉₀ (*l* = 0.5 см), что свидетельствовало о полноте смывания биомассы биопленок.

Для определения продолжительности сохранения жизнеспособности покоящимися формами пробирки с сухими биопленками, хранившиеся более 7 сут, через 10 дней, а затем каждые 20 дней заполняли безазотистой полужидкой МСС (с 0.3% агара) и инкубировали для прорастания цистоподобных форм азоспирилл (Шелудько и соавт., 2020). Через 24–48 ч инкубации жизнеспособные микроаэрофильные клетки азоспирилл делятся и, перемещаясь в агаре, формируют видимую глазом полосу под поверхностью безазотистой среды. Если формирования такой полосы не наблюдалось в течение 7 сут, полужидкую среду из пробирок переносили на плотные питательные среды. Отсутствие роста и в этом случае расценивали как гибель популяции.

Анализ способности бактерий к колонизации корней проростков пшеницы проводили в соответствии с процедурой, ранее использованной Шелудько и соавт. (2010) в работе с мутантами азоспирилл по жгутикованию и подвижности. Семена мягкой яровой пшеницы сорта Саратовская 29, полученные из ВНИИ сельского хозяйства Юго-Востока (Саратов, Россия), стерилизовали, проращивали в течение 3-х сут и инокулировали, выдерживая проростки с покачиванием (25 об./мин) в суспензии бактерий (ОП₅₉₀ = 0.5 (*l* = 0.5 см)) в 50 мМ ФБ (рН 7.0) (Шелудько и соавт., 2010). Инокулированные проростки пшеницы однократно промывали стерильным ФБ и помещали над слоем жидкости в пробирки, содержащие 10 мл среды для растений следующего состава (г/л): KH₂PO₄ – 4; CaCl₂ – 1.25; H₃BO₃ – 0.0016; CuSO₄ · 5H₂O – 0.00025; MgSO₄ – 0.09; Na₂MoO₄ · 2H₂O – 0.0025; KJ – 0.008; ZnSO₄ – 0.015; FeSO₄ · 7H₂O – 0.028; этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль – 0.037 (рН 6.0). Инокулированные растения выращивали еще 7 дней при 22°C и естественном освещении. Распределение бактерий и образование биопленок на поверхности корней исследовали с использованием микроскопа Leica DM6000 B (“Leica Microsystems”, Германия). Из навесок стерильно отмытых корней 10-дневных проростков готовили гомогенат, в котором определяли количество КОЕ посредством высевов серийных десятикратных разведений на плотную МСС. Нулевое и первое разведение центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость, сушили

Таблица 1. Рост планктонных культур (а), биомасса (б) и количество КОЕ (в) в зрелых биопленках *A. brasilense*, сформированных в стеклянных пробирках под жидкой МСС

Штамм	(а) ОП ₅₉₀ (<i>l</i> = 0.5 см) планктонных культур		(б) ОП ₅₉₀ (<i>l</i> = 0.5 см) кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок		(в) * Количество КОЕ × 10 ¹⁰ в 1 мл суспензии смывой биомассы биопленки	
	+NH ₄ Cl	-NH ₄ Cl	+NH ₄ Cl	-NH ₄ Cl	+NH ₄ Cl	-NH ₄ Cl
Sp245	0.33 ± 0.03 B	0.14 ± 0.03 A	0.73 ± 0.04 Б	0.73 ± 0.12 Б	1.9 ± 0.3 г	1.1 ± 0.1 в
SK586	0.36 ± 0.02 B	0.26 ± 0.02 Б	0.69 ± 0.05 Б	0.40 ± 0.05 А	0.9 ± 0.1 б	0.6 ± 0.2 а

Примечание. Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в колонках (а) или (б) представлены заглавными буквами; разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними. В колонках (а), (б) и (в) показаны результаты ANOVA, проведенного с последовательным сравнением средних в столбце и строке; разными буквами обозначены статистически значимые различия. А, А или а – средние значения с наименьшей величиной.

* Биомассу биопленки смывали 2 мл 50 мМ ФБ (рН 7.0).

при 30°C и хранили при 37°C. В этих образцах выявляли устойчивые к высушиванию клетки как описано выше. Количество бактерий, высеваемых с корней, пересчитывали на одно растение. Контролировали наличие посторонней микрофлоры в гомогенатах корней. Образцы, в посевах с которых встречались колонии с нехарактерной для азоспирилл морфологией, отбрасывали.

Статистическая обработка результатов. Выполняли не менее трех независимых экспериментов как минимум в двух повторностях. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (доверительные интервалы даны для 95% уровня значимости) и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) (при уровне значимости $p \leq 0.05$). Для статистической обработки использовали пакет программ Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика зрелых биопленок азоспирилл. Как показано в табл. 1 (столбцы б), исключение из МСС источника связанного азота приводит к снижению количества биомассы в зрелых биопленках *ahpC* мутанта SK586, сформированных на гидрофильной поверхности, а в биопленках штамма Sp245 оно остается неизменным. Оптическая плотность планктонных культур этих штаммов, выросших параллельно с биопленками в безазотистой МСС, уступает плотности культур со среды с азотом (табл. 1, столбцы а). Отношение показателя, характеризующего количество клеток в планктонных культурах (ОП₅₉₀ планктонных культур), к показателю, характеризующему относительную биомассу биопленок (ОП₅₉₀ кристаллического фиолетового, десорбированного из биопленок), под МСС с/без NH₄Cl для бактерий Sp245 и SK586 составило, соответственно, 0.5/0.2 и 0.5/0.7 (табл. 1, столбцы а,

б). Таким образом, в условиях лимита по азоту контактирующие с гидрофильной поверхностью клетки штамма Sp245 переходили преимущественно к биопленочному существованию; а в случае мутанта SK586 этого предпочтения не наблюдалось.

Зрелые биопленки штамма Sp245 содержали примерно в 1.8–2.1 раза больше жизнеспособных бактерий, по сравнению с биопленками мутанта SK586 (табл. 1, столбцы в), независимо от наличия источника связанного азота в МСС. В суспензиях биомассы биопленок штамма Sp245, смытых с поверхности стекла, число КОЕ варьировало в пределах порядка 10¹⁰, а в случае биопленок штамма SK586 – 10⁹. Более низкое количество КОЕ соответствовало сниженному количеству биомассы в биопленках мутанта на стекле под безазотистой МСС (табл. 1, столбцы б, в). Однако на такой же поверхности в МСС с NH₄Cl относительное количество биомассы в биопленках SK586 не уступало показателям Sp245, но различия в количестве КОЕ в биопленках сохранялось.

Сформированные под жидкой средой LB биопленки штаммов Sp245 и SK586 содержали примерно одинаковое количество биомассы на гидрофильной и гидрофобной поверхности (рис. 1). На стекле под МСС с NH₄Cl показатели биомассы Sp245 и SK586 не отличались от значений, характерных для биопленок, сформированных под LB. По сравнению с Sp245, мутант SK586 формировал менее выраженные биопленки на гидрофильной поверхности под безазотистой МСС и на полистироле под МСС с/без NH₄Cl (рис. 1). Стоит отметить, что через 7 сут культивирования рН окружающих биопленки сред LB и МСС с/без NH₄Cl увеличивался с 7.0 до (8.3 ± 0.1) и (9.3 ± 0.1) соответственно. Не исключено, что инактивация гена *ahpC* привела к повышению чувствительно-

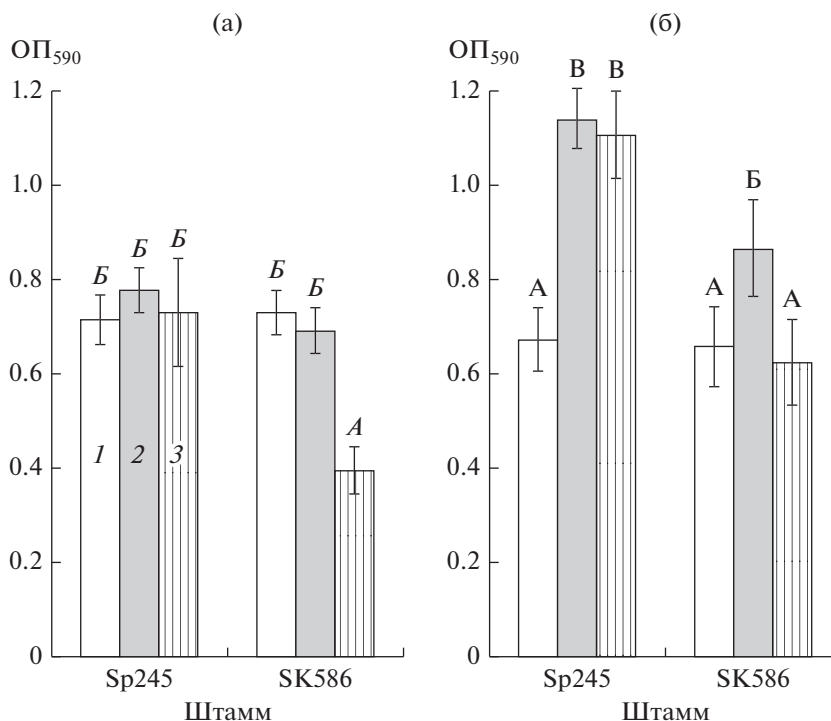


Рис. 1. Влияние состава среды на биомассу зрелых биопленок *A. brasilense*, сформированных на стекле (а) и полистироле (б) под жидкой средой LB (1), МСС + NH₄Cl (2) или МСС без NH₄Cl (3). Обозначения: ОП₅₉₀ ($l = 0.5$ см) – оптическая плотность раствора кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) данных на панелях (а) и (б) последовательно проводили, сравнивая влияние состава среды на показатели каждого штамма, затем сопоставляя показатели Sp245 и SK586 на каждой из сред; разными заглавными буквами обозначены статистически значимые различия; А и А – средние значения с наименьшей величиной.

сти мутанта к изменениям pH среды, что могло сказаться и на жизнеспособности клеток в составе биопленок (табл. 1, столбцы в).

Устойчивость биопленок к окислительному стрессу. Мы оценили влияние перекиси водорода в качестве агента окислительного стресса на жизнеспособность бактерий из планктонных культур в стационарной фазе роста или из зрелых биопленок. В отсутствие источников углерода и азота (в 50 мМ ФБ; pH 7.0) планктонные культуры Sp245 сохраняли жизнеспособность в присутствии 0.001% H₂O₂, а культуры SK586 – в присутствии 0.0005% H₂O₂. МИК перекиси водорода для родительского и мутантного штаммов различались в 10 раз (табл. 2, столбец а). Эти данные согласуются с результатами проведенного ранее сравнения устойчивости к алкилпероксидам и H₂O₂ планктонных культур Sp245 и SK586, активно росших в минимальной и богатой средах (Wasim et al., 2009).

В нативных зрелых биопленках устойчивость азоспирилл к окислительному стрессу возрастала. МИК 0.1% H₂O₂ для особей из биопленок Sp245 не зависела от наличия азота в среде (табл. 2, столбцы б). В МСС с NH₄Cl устойчивость к перекиси водорода клеток из биопленок

мутанта SK586 не отличалась от показателей Sp245, но в МСС без азота МИК перекиси водорода для SK586 снижалась на порядок (табл. 2, столбцы б). Таким образом, предполагаемый вклад AhpC в адаптацию азоспирилл к воздействию внешних факторов окислительного стресса наиболее заметен не только при дефиците источника углерода (Wasim et al., 2009), но и в условиях дефицита азота (данная работа).

Влияние окислительного стресса на жизнеспособность устойчивых к высушиванию покоящихся форм биопленок. Выживанию биопленочных популяций азоспирилл в условиях окислительного стресса способствует формирование покоящихся форм (Шелудько и соавт., 2020). Для получения покоящихся форм биопленки были высушены при 30°C и заложены на хранение при 37°C (оптимальная температура для культивирования *A. brasilense* (Tarrand et al. 1978)). Через 7 сут хранения максимальная численность 10³ КОЕ сохранялась в биопленках Sp245. В случае мутанта SK586 количество КОЕ составляло 10² (табл. 3). В биопленках Sp245 жизнеспособные формы сохранялись после 9 мес. хранения сухих образцов. Устойчивые

Таблица 2. Устойчивость к окислительному стрессу 24-ч планктонных культур (а) и зрелых биопленок *A. brasiliense* (б и в), сформированных в стеклянных пробирках под жидкой МСС

Штамм	* Наличие бактериального роста под толщей полужидкой среды после инкубации в растворе H ₂ O ₂															
	(а) Планктонные культуры из МСС + NH ₄ Cl			(б) Нативные биопленки из МСС						(в) ** Сухие биопленки из МСС						
				+NH ₄ Cl			-NH ₄ Cl			+NH ₄ Cl			-NH ₄ Cl			
	H ₂ O ₂ , %															
	0.0005	0.001	0.01	0.001	0.01	0.1	0.001	0.01	0.1	0.001	0.01	0.1	0.0001	0.001	0.01	0.1
Sp245	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
SK586	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-

Примечание. В случае планктонных культур (а) и биопленок (б, в) результаты воспроизведены в 7 и 5 независимых экспериментах соответственно.

* Планктонные культуры или биопленки после 18 ч инкубации с H₂O₂ 48 ч культивировали в МСС с 0.3% агара без источника связанного азота. Планктонные культуры (а) и нативные биопленки (б) содержали не менее 10⁹ КОЕ в 1 мл суспензии (см. Материалы и методы исследования и табл. 1); количество КОЕ в сухих биопленках (в) приведено в табл. 3.

** Биопленки (б) высушили и хранили 7 сут при 37°C.

Таблица 3. Влияние продолжительности хранения при 37°C на жизнеспособность *A. brasiliense* в сухих зрелых биопленках

Штамм	(а) * КОЕ в 1 мл суспензии смывой биомассы сухих биопленок, хранившихся 7 сут		(б) ** Наличие бактериального роста под поверхностью полужидкой среды при культивировании сухих биопленок из МСС											
	+NH ₄ Cl	-NH ₄ Cl	+NH ₄ Cl					-NH ₄ Cl						
			Хранение сухих биопленок при 37°C, сут											
			7	17	37	127	277	7	17	37	127	277		
Sp245	(2.4 ± 0.4) × 10 ³	(5.7 ± 0.7) × 10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SK586	(1.3 ± 0.04) × 10 ²	(1.6 ± 0.1) × 10 ²	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

* Биомассу биопленки смывали 2 мл 50 мМ ФБ (pH 7.0).

** Сухие биопленки инкубировали 48 ч в МСС с 0.3% агара без источника связанного азота. Результаты воспроизведены в 3-х независимых экспериментах.

к высушиванию формы из биопленок SK586 сохраняли жизнеспособность менее месяца (табл. 3).

Покоящиеся формы Sp245 в сухих биопленках сохраняли жизнеспособность после инкубации с 0.001% H₂O₂, а МИК H₂O₂ составляла для них 0.01%, как и для планктонных культур (табл. 2, столбец в). В биопленках из МСС с азотом покоящиеся формы SK586 имели сходную с Sp245 устойчивость к перекиси водорода (табл. 2, столбец в), превышавшую устойчивость планктонных клеток мутанта. Для покоящихся форм мутанта из безазотистой МСС МИК перекиси водорода снижалась до 0.001%. Таким образом, по сравнению со штаммом Sp245, при культивировании в МСС без азота покоящиеся формы и биопленки мутанта SK586 были более чувствительными к негативному воздействию H₂O₂.

Ультраструктура клеток в составе биопленок.

Анализ ультраструктуры планктонных клеток штаммов Sp245 и SK586 из 24-ч жидких культур, выросших при перемешивании в МСС с азотом, показал, что вегетативные клетки (В-клетки) являются вибрионами с минимальным количеством включений, которые, как сообщается, могут являться гранулами полигидроксибутирата (ПГБ) (Berg et al., 1980). Тонкий слой капсулы тесно связан с липополисахаридом наружной мембраны клеток. Также встречаются клетки, лишенные выраженной капсулы. В популяции планктонных клеток азоспирилл присутствуют делящиеся особи и длинные клетки (Дл-клетки).

Сравнение ультратонких срезов биопленок Sp245 и SK586 показало, что для обоих штаммов характерен выраженный полиморфизм размера и формы клеток, независимо от наличия связанного

азота в среде культивирования (рис. 2). На срезах биопленок обнаруживались В-клетки, Дл-клетки и клетки яйцевидной формы (рис. 2) средних и больших размеров – цистоподобные формы (ЦП-формы), которые описаны в старых культурах азоспирилл, в частности, в среде без источника связанного азота (Berg et al., 1980). Часть Дл-клеток покрыта выраженным внешним слоем (рис. 2). В биопленках были также выявлены лизированные клетки. Наличие бактерий с признаками разрушения частично объясняло отсутствие зависимости между количествами биомассы биопленок и КОЕ; необходимо также учитывать, что и матрикс биопленок вносит вклад в общее количество биомассы. Кристаллический фиолетовый, использованный нами для определения относительного количества биомассы в биопленках, окрашивает как живые и мертвые клетки, так и внеклеточный матрикс (O'Toole, Kolter, 1998; Плакунов и соавт., 2016; Шелудько и соавт., 2018).

Определение численности бактерий, адсорбирующихся и формирующих биопленки на корнях проростков пшеницы. Начальные этапы колонизации азоспириллами корневой системы растений зависят от способности бактерий перемещаться по направлению к корням растения. Данное обстоятельство обусловило выбор способа инокуляции (с покачиванием инкубационных сосудов), обеспечивающих штамму дикого типа и его мутанту с дефектами в подвижности равные шансы на контакт с поверхностью корня (Шелудько и соавт., 2010). Количество клеток *A. brasilense*, прикрепившихся к корням, стабилизировалось в течение 3 ч инкубации суспензии бактерий с трехсуточными проростками пшеницы. Количество адсорбированных клеток Sp245 и SK586 варьировало в пределах порядка 10^7 и составляло, соответственно, $(2.0 \pm 0.2) \times 10^7$ и $(1.2 \pm 0.1) \times 10^7$ КОЕ/растение.

Уже через 24–48 ч после инокуляции растений клетки штаммов Sp245 и SK586 обнаруживались на корнях в виде агрегатов наряду с равномерно распределенными особями. На шестые–седьмые сутки агрегаты клеток этих штаммов, образующие биопленку, формировали скопления на поверхности корней проростков (рис. 3). Биопленки располагались не равномерно по всему корню, а, преимущественно, в зонах всасывания и верхушки корня. Бактериальные скопления наблюдались у мест соединения корневых волосков с поверхностью корня, на кончике корневого волоска; встречались и корневые волоски, заселенные бактериями вдоль всей поверхности. Численность бактерий SK586, обитавших в корневой системе проростков пшеницы, после 7 сут инкубации на порядок уступала численности бактерий Sp245 (табл. 4, столбец а). При микроскопии степень выраженности биопленок на поверхности корня в случае двух штаммов согласовалась с численно-

стью бактерий, заселивших корневую систему к 7 сут культивирования: см., например, в табл. 4 (столбец в) процент корневых волосков с шапочками из бактерий (рис. 3). Отметим, что при выращивании растений в полужидком агаре другим авторам не удалось выявить изменений в способности *ahpC* мутанта SK586 колонизировать поверхность корней проростков пшеницы (Wasim et al., 2009). Вероятно, в микроаэрофильных условиях, являющихся оптимальными для азоспирилл (Elmas et al., 2019), клетки мутанта SK586 легче адаптируются к существованию в корневой системе растений (Wasim et al., 2009).

Исследована численность устойчивых к высушиванию клеток Sp245 и SK586, заселивших корни проростков. Для получения покоящихся форм гомогенаты инокулированных корней были высушены при 30°C и заложены на хранение при 37°C. Образцы корней, инокулированных Sp245, без высушивания содержали 10^7 КОЕ, через 7 сут хранения сухих образцов количество КОЕ снижалось до 10^5 (табл. 4, столбец а, б). В случае мутанта SK586 количество КОЕ без высушивания образцов составляло 10^6 , а в сухих пробах – 10^4 (табл. 4, столбец а, б).

Для биопленок, сформированных на абиотической поверхности под МСС, наблюдалась более выраженная тенденция снижения численности клеток в сухих образцах. Так, в сырых биопленках Sp245/SK586 содержалось $10^{10}/10^9$ КОЕ, а сухие биопленки этих штаммов содержали $10^3/10^2$ КОЕ (табл. 1 и 3). Вероятно, у азоспирилл, адаптированных к корневой системе растений, формируется больше клеточных форм, устойчивых к высушиванию (или в этих условиях потенциал устойчивости клеток к данному виду стресса возрастает), по сравнению с бактериями из биопленок, сформированных в абиотических условиях – на стекле под МСС.

Инокуляция штаммами Sp245 и SK586 по-разному сказывалась на морфометрических показателях проростков пшеницы (табл. 4, столбцы г, д). Инокуляция штаммом Sp245 стимулировала развитие корневой системы проростков и положительно влияла на длину надземной части (табл. 4, столбцы г, е). В случае растений, инокулированных SK586, подобные эффекты отсутствовали, что можно объяснить как низкой численностью бактерий, обитающих на корнях растений, так и повышенной чувствительностью клеток мутанта к окислительному стрессу, вызванной инактивацией гена *ahpC*.

Таким образом, у *ahpC* мутанта бактерии *A. brasilense* Sp245 снижена эффективность формирования биопленок в условиях лимита по азоту и при колонизации корней проростков пшеницы, а клетки мутанта в составе биопленок с абиотической и биотической поверхностями обладали сни-

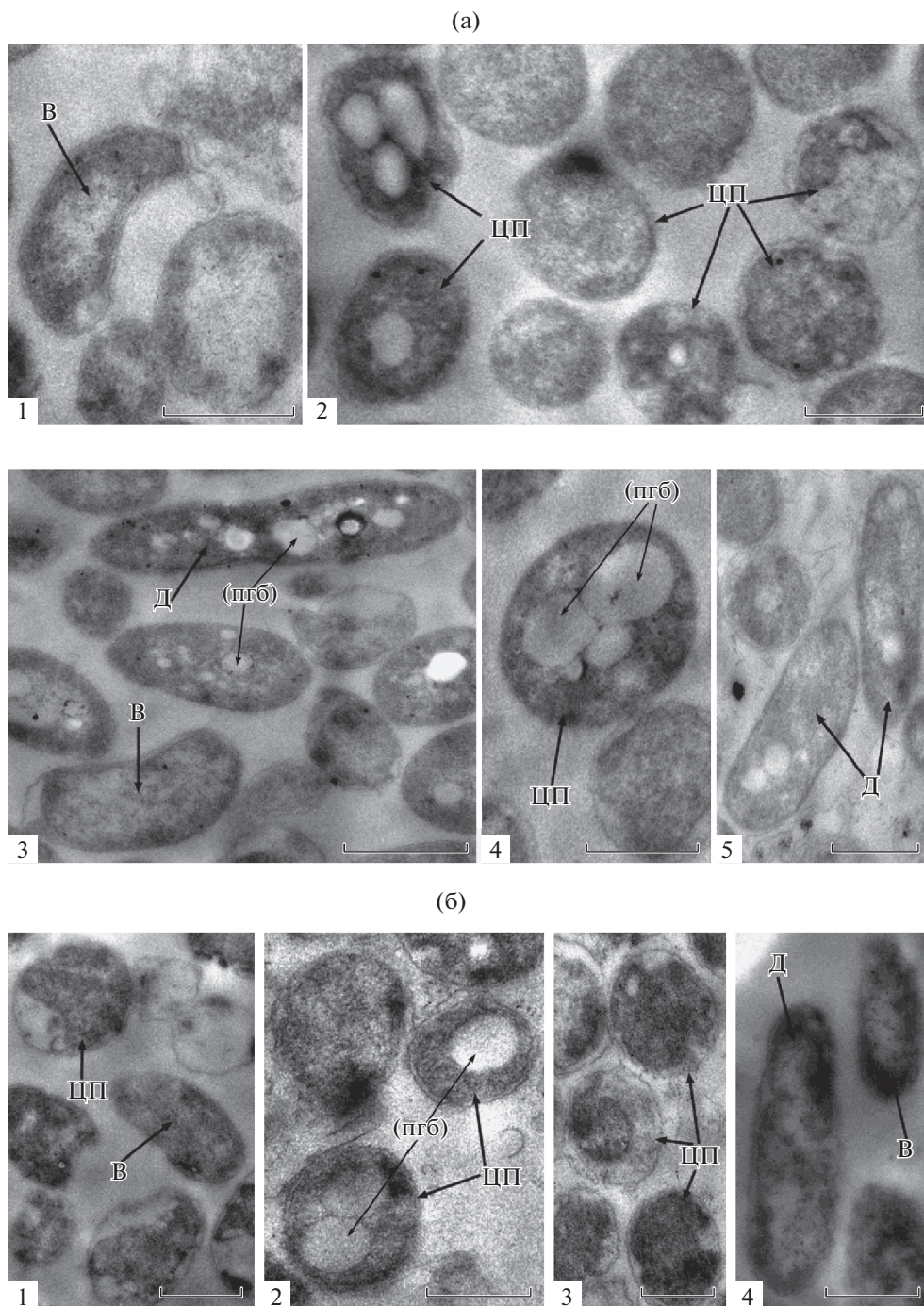


Рис. 2. Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов клеток *A. brasilense* Sp245 (а) и SK586 (б) из фрагментов зрелых биопленок, сформированных под жидкой МСС с NH_4Cl (1, 3, 4) или без связанного азота (2, 5). Масштабная линейка соответствует 1 мкм. В – “В-клетки”, Д – “Дл-клетки”, ЦП – “ЦП-формы”, (пгб) – полигидроксибутират.

женной жизнеспособностью. При отсутствии существенных морфологических различий ЦП-клеток Sp245 и SK586 численность устойчивых к высушиванию покоящихся форм мутанта уступала таковой у родительского штамма. Устойчивые к высушиванию формы в биопленках Sp245 со-

храняли жизнеспособность после 9 мес. хранения сухих образцов, а в биопленках SK586 жизнеспособность таких форм сохранялась менее месяца. По-видимому, отсутствие AhrC у мутанта SK586 усиливало влияние стресса, обусловленного высушиванием биопленок. Возможно, в процессе

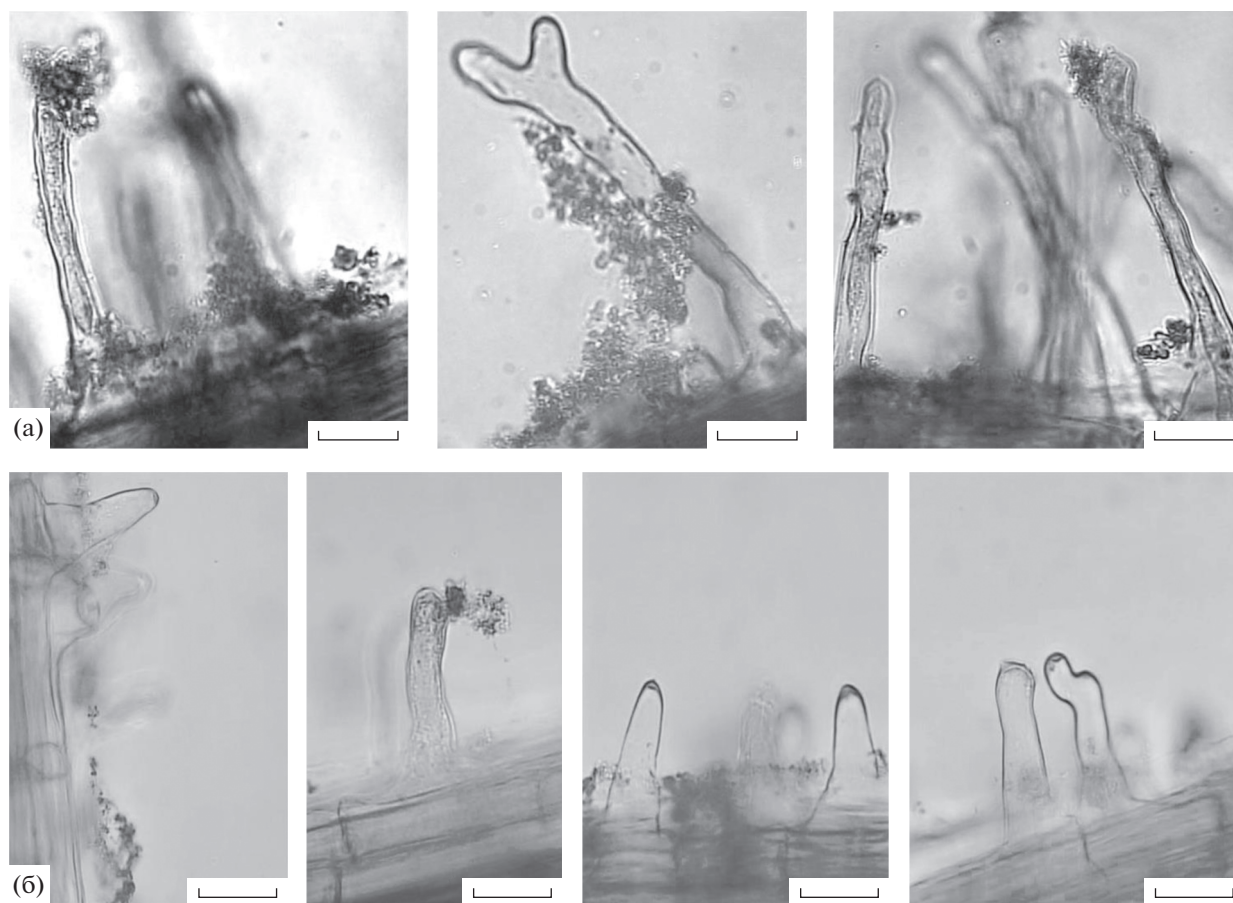


Рис. 3. Просвечивающая световая микроскопия корней 10-дневных проростков пшеницы через 7 дней после инокуляции культурами *A. brasilense* Sp245 (а) и SK586 (б). Масштабная линейка соответствует 10 мкм.

прорастания сухих покоящихся форм активность *AhpC* позволяла бактериям, сталкивающимся со стрессорными факторами, преодолевать их негативное влияние. Мутантный штамм, адаптировавшийся в корневой системе проростков пшеницы, формировал меньше, чем Sp245, клеточных форм, устойчивых к высушиванию. Однако в популяциях обоих штаммов в условиях *in planta* формировалось больше устойчивых к высушиванию клеток, чем в биопленках на абиотической поверхности (под жидкой МСМ на стекле).

Инокуляция проростков пшеницы культурой штамма *A. brasilense* Sp245 стимулировала развитие корневой системы проростков и положительно влияла на длину надземной части; но в случае растений, инокулированных мутантом SK586, подобные эффекты отсутствовали. Возможно, *AhpC* способствует более успешной адаптации азоспирилл к существованию в ассоциации с растениями и проявлению стимулирующей рост растений активности этих бактерий. Следует отметить, что *AhpC* отвечает за удаление не только H_2O_2 , но и других органических пероксидов (Wasim et al., 2009), а также может защищать белки при тепло-

вом шоке (Lee et al., 2016; Kamariah et al., 2018) и, возможно, при других стрессах.

Азоспириллы способны формировать биопленки как самостоятельно, так и совместно с другими микроорганизмами, например, с бактериями, осуществляющими очистку сточных вод (Gómez-Villalba et al., 2006). В составе мультивидовых биопленок члены сообщества могут оказывать взаимные как защитные, так и антагонистические воздействия (Ножевникова и соавт., 2015). Очевидно, азоспириллы в таких пленках будут сталкиваться с конкуренцией за ростовые факторы и с изменением рН, а влияние на их популяцию окислительного стресса, обусловленного эндогенным H_2O_2 и/или другими органическими пероксидами, может усиливаться. В данной работе выявлено, что инактивация гена *ahpC* сопровождалась снижением устойчивости биопленочной популяции азоспирилл не только к окислительному стрессу, но и к недостатку ростовых факторов, изменению рН среды и высушиванию, и влияла на свойства покоящихся форм. По-видимому, алкилгидропероксидредуктаза может участвовать в обеспечении адаптивных ответов *A. brasilense* на

Таблица 4. Характеристики 10-суточных проростков пшеницы через 7 сут после инокуляции бактериями *A. brasilense**

Штамм	Проросток после 7-ми дней культивирования с бактериями						(д) Длина побега, мм
	(а) КОЕ × 10 ⁷ , высеваемые из корневой системы	(б) КОЕ × 10 ⁵ , высеваемые из сухих корней, хранившихся 7 сут	(в) Корневые волоски с шапочками из бактерий, %	(г) Корневая система			
				деформи- рованные корневые волоски, %	разветвленные корни, %	длина корня, мм	
К**	0	0	0	16.3 ± 1.6 а	39.0 ± 2.5 А	30.6 ± 1.9 А	119.7 ± 4.7 А
Sp245	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.2	49.6 ± 3.9 б	39.3 ± 2.3 в	56.8 ± 3.3 Б	27.9 ± 1.7 А	138.5 ± 4.0 Б
SK586	0.1 ± 0.04	0.5 ± 0.06	38.6 ± 4.5 а	27.4 ± 4.9 б	33.6 ± 5.5 А	28.5 ± 6.4 А	111.2 ± 18.4 А

Примечание. Приведены результаты 5 независимых экспериментов, в каждом из которых использовали не менее 10 растений. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) в колонках (в), (г) или (д) проводили, сравнивая средние в столбце. Разными буквами обозначены статистически значимые различия. А, А, а или а – средние значения с наименьшей величиной.

* Для инокуляции использовали 3-х суточные проростки, которые 3 ч инкубировали в суспензии клеток штаммов Sp245 и SK586. Число бактерий, адсорбированных на корнях, составило $(2.0 \pm 0.2) \times 10^7$ и $(1.2 \pm 0.1) \times 10^7$ КОЕ, соответственно штамму.

** Контроль – стерильные растения.

широкий круг стрессов, что, возможно, способствует более успешному приспособлению биопленочной популяции азоспирилл к изменениям окружающей среды, существованию в ассоциации с растениями и в составе мультивидовых сообществ (Bashan, de-Bashan, 2010; Bogino et al., 2013).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Коллекции ризосферных культур ИБФРМ РАН за штамм *A. brasilense* Sp245 [IBPRM 219] и Центру коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН (Саратов, Россия) за допуск к работе на приборах Multiskan Ascent, Leica DM6000 В и Libra 120. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00006-а.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильева Г.Г., Глянко А.К., Миронова Н.В., Путилина Т.Е., Лузова Г.Б.* Активные формы кислорода в проростках гороха при взаимодействии с симбиотическими и патогенными микроорганизмами // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. С. 240–245.
- Vasil'eva G.G., Glyan'ko A.G., Mironova N.V., Putilina T.E., Luzova G.B.* Active oxygen species in pea seedlings during the interactions with symbiotic and pathogenic microorganisms // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. P. 217–221.
- Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К.* Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 623–644.
- Nozhevnikova A.N., Botchkova E.A., Plakunov V.K.* Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 731–750.
- Плакунов В.К., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Журкина М.В.* Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 484–489.
- Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V.* A universal method for quantitative characterization of growth and metabolic activity of microbial biofilms in static models // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 509–513.
- 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.Yu., Katsy E.I.* Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 688–695.

- Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Шумилова Е.М., Хлебцов Б.Н., Буров А.М., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 175–183.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Shumilova E.M., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in biofilm formation in the nonflagellated *flhB1* mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 144–151.
- Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Телешева Е.М., Буров А.М., Евстигнеева С.С., Бурый Г.Л., Петрова Л.П. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 483–494.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Telesheva E.M., Burov A.M., Evstigneeva S.S., Burygin G.L., Petrova L.P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 610–620.
- Шелудько А.В., Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Филипьева 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'echeva 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.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. V. 29. P. 924–929.
- Bashan Y., de-Bashan L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment // Adv. Agron. 2010. V. 108. P. 77–136.
- Berg R.H., Tyler M.E., Novick N.J., Vasil V., Vasil I.K. Biology of *Azospirillum*–sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity // Appl. Environ. Microbiol. 1980. V. 39. P. 642–649.
- 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.
- Clara R.W., Knowles R. Superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in ammonium-grown and nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense* // Can. J. Microbiol. 1984. V. 30. P. 1222–1228.
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symp. on Nitrogen Fixation / Eds. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
- Elmas M., Alexiades V., O'Neal L., Alexandre G. Modeling aerotaxis band formation in *Azospirillum brasilense* // BMC Microbiol. 2019. V. 19. P. 101.
- Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting 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.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation // AMB Exp. 2018. V. 8. P. 73–85.
- Gómez-Villalba B., Calvo C., Vilchez R., González-López J., Rodelas B. TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 393–400.
- Kamariah N., Eisenhaber B., Eisenhaber F., Grüber G. Molecular mechanism of the *Escherichia coli* AhpC in the function of a chaperone under heat-shock conditions // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 14151.
- Lee J.T., Lee S.S., Mondal S., Tripathi B.N., Kim S., Lee K.W., Hong S.H., Bai H.-W., Cho J.-Y., Chung B.Y. Enhancement of the chaperone activity of alkyl hydroperoxide reductase C from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from a point-specific mutation confers heat tolerance in *Escherichia coli* // Mol. Cells. 2016. V. 39. P. 594–602.
- Nur I., Okon Y., Henis Y. Effect of dissolved oxygen tension on production of carotenoids, poly- β -hydroxybutyrate, succinate oxidase and superoxide dismutase by *Azospirillum brasilense* grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. 1982. V. 128. P. 2937–2943.
- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // Mol. Microbiol. 1998. V. 28. P. 449–461.
- Poole L.B., Ellis H.R. Flavin-dependent alkyl hydroxyperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. I. Purification and enzymatic activities of over expressed AhpF and AhpC proteins // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 56–64.
- Ramírez-Mata A., López-Lara L.I., Xiqui-Vázquez L., Jijón-Moreno S., Romero-Osorio A., Baca B.E. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* // Res. Microbiol. 2016. V. 167. P. 190–201.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Scheludko A.V., Katsy E.I., Ostudin N.A., Gringaus O.K., Panasenko V.I. Novel classes of *Azospirillum brasilense* mutants with defects in the assembly and functioning of polar and lateral flagella // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1998. № 4. С. 33–37.
- Schlöter M., Hartmann A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies // Symbiosis. 1998. V. 25. P. 159–179.
- Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. // Can. J. Microbiol. 1978. V. 24. P. 967–980.
- 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.
- Wasim M., Bible A.N., Xie Z., Alexandre G. Alkyl hydroperoxide reductase has a role in oxidative stress resistance and in modulating changes in cell-surface properties in *Azospirillum brasilense* Sp245 // Microbiology (SGM). 2009. V. 155. P. 1192–1202.

Suppressed Biofilm Formation Efficiency and Decreased Biofilm Resistance to Oxidative Stress and Drying in an *Azospirillum brasilense* *ahpC* Mutant

A. V. Shelud'ko^{1,*}, D. I. Mokeev¹, S. S. Evstigneeva¹, Yu. A. Filip'echeva¹, A. M. Burov¹,
L. P. Petrova¹, and E. I. Katsy^{1,**}

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

**e-mail: shel71@yandex.ru*

***e-mail: ei_katsy@mail.ru*

Received February 21, 2020; revised July 14, 2020; accepted August 10, 2020

Abstract—*Azospirillum brasilense* forms biofilms on various surfaces. It was previously shown that inactivation of the *ahpC* gene of alkyl hydroperoxide reductase in the SK586 mutant of *A. brasilense* Sp245 led to an increased sensitivity to peroxides and to changes in flagellation, motility, and cell surface properties. The present work revealed that under nitrogen limitation, Sp245 switches predominantly to the biofilm mode of life, whereas this tendency is not characteristic of the mutant SK586. Inactivation of the *ahpC* gene negatively affects the viability of SK586 in biofilms, which is most noticeable under nitrogen limitation. While no significant morphological differences were found between cyst-like forms of Sp245 and SK586, the resting mutant forms grown in a nitrogen-free medium were more sensitive to hydrogen peroxide than the resting forms of Sp245. In Sp245 biofilms, viable forms resistant to drying were found even after 9 months of storage, while in SK586 biofilms, such bacteria remained viable for less than a month. In the course of adaptation to the plant root system, the number of *Azospirillum* cells resistant to drying increased, as compared to the number of such cells from mature biofilms on abiotic surfaces. Unlike Sp245, SK586 did not promote the development of the root system and the growth of the aerial parts of 10-day-old plants, possibly owing to its lower ability to colonize the roots of wheat seedlings incubated in a liquid medium. Alkyl hydroperoxide reductase is probably essential for better resistance of azospirilla to various stresses and for manifestation of their plant-growth-promoting activity.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, AhpC, alkyl hydroperoxide reductase, biofilms, ultrastructure, bacterial resting forms, resistance to stress, plant growth promotion

МИКРОБНЫЙ КОНСОРЦИУМ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЙ УДАЛЕНИЕ ФОСФАТОВ В ЦИКЛИЧЕСКОМ АЭРОБНО-АНАЭРОБНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© 2021 г. А. В. Пелевина^{а, *}, Ю. Ю. Берестовская^а, В. А. Грачёв^а, И. К. Дорофеева^а,
В. В. Сорокин^а, А. Г. Дорофеев^{а, b}, А. Ю. Каллистова^а, Ю. А. Николаев^а, Р. Ю. Котляров^с,
А. В. Белецкий^с, Н. В. Равин^с, Н. В. Пименов^а, А. В. Марданов^с

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

^бАО “Мосводоканал”, Москва, 105005 Россия

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

*e-mail: annie.pelevina@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.08.2020 г.

После доработки 24.09.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

Исследованы особенности формирования сообщества фосфат-аккумулирующих микроорганизмов в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия (sequencing batch reactor, SBR), обеспечивающим чередование аэробных и анаэробных условий при периодическом сливе и добавлении среды. Биореактор обеспечивал удаление 50% фосфора из поступающей среды уже через 22 сут с момента запуска. Методами микроскопии и рентгеновского микроанализа показано наличие клеток разной морфологии, которые содержали обогащенные фосфором гранулы. Методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК выявлены изменения в составе микробного сообщества активного ила в процессе его культивирования в биореакторе. Показана смена форм бактерий в сообществе, связанная с увеличением относительного вклада представителей порядка *Bacteroidetes* (до 43% от всех последовательностей гена 16S рРНК), а также представителей классов *Alpha*- и *Betaproteobacteria* (до 15 и 27% соответственно). В момент запуска биореактора в посевном материале (активный ил очистных сооружений) доля типичных представителей активного ила фосфат-аккумулирующих микроорганизмов – бактерий рода “*Candidatus Accumulibacter*” класса *Betaproteobacteria* была низкой – 0.2% от общего количества последовательностей гена 16S рРНК, и они полностью элиминировались из сообщества в ходе работы биореактора. К моменту максимального удаления фосфора из поступающей среды произошло увеличение доли других представителей этого класса – бактерий родов *Dechloromonas* и *Zoogloea* семейства *Rhodocyclaceae* с (0.7 до 11.1%) и с (0.09 до 11.5%) соответственно. По-видимому, эффективное удаление фосфатов связано с развитием бактерий семейства *Rhodocyclaceae*, которые ранее не относили к типичным представителям ФАО.

Ключевые слова: фосфат-аккумулирующие организмы, активный ил, бактерии с циклическим типом метаболизма, волютиновые гранулы, семейство *Rhodocyclaceae*, род *Dechloromonas*, *Zoogloea*, “*Candidatus Accumulibacter*”

DOI: 10.31857/S0026365621010092

Микроорганизмы группы фосфат-аккумулирующих организмов (ФАО), способные к внутриклеточному накоплению полифосфатов, осуществляют биологическую очистку сточных вод от фосфора. Они развиваются в активном иле очистных сооружений при обязательной цикличности условий роста: периодической смене отсутствия и наличия акцепторов электронов (в первую очередь кислорода) и, соответственно, присутствия и отсутствия легкодоступных органических веществ (Van Loosdrecht et al., 1997; Mino et al., 1998; Seviour et al., 2003; Wentzel et al., 2008). Периодиче-

ская смена условий роста определяет направленность основных метаболических путей ФАО. В анаэробных условиях (без акцепторов электронов) ФАО поглощают органические соединения (главным образом, летучие жирные кислоты (ЛЖК)) и запасают их в форме внутриклеточных полимеров с одновременной деградацией внутриклеточных полифосфатов и выбросом ортофосфата из клеток. В аэробных условиях (или) при наличии альтернативного акцептора электронов (нитратов или нитритов) ФАО способны расти, поглощать ортофосфаты и синтезировать

внутриклеточные полифосфаты, используя для этих процессов энергию от разложения внутриклеточных источников углерода и энергии, накопленных в анаэробных условиях. Таким образом, представители ФАО относятся к микроорганизмам, обладающим циклическим типом метаболизма (Дорофеев и соавт., 2019).

Группа ФАО не является монофилетичной, т.е. способность к аккумуляции фосфатов выявлена у представителей различных филогенетических групп микроорганизмов, как бактерий, так и архей. В настоящее время к истинным ФАО относят представителей кандидатного рода “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” (сем. *Rhodocyclaceae*, *Betaproteobacteria*) (Hesselmann et al., 1999; Nguyen et al., 2012; Stokholm-Bjerregaard et al., 2017; Zeng et al., 2018; Qiu et al., 2019), которые в качестве субстрата используют летучие жирные кислоты (ацетат, пропионат). В зависимости от используемых акцепторов электронов внутри этого фенотипа выделяют две основные филогенетические группы “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” (тип I и тип II), каждая из которых в свою очередь подразделяется на клады (тип I – на клады от IA до IE и тип II на клады от IIA до II I) (Rubio-Rincon et al., 2017). ФАО I используют в качестве акцепторов электронов нитрат и нитрит, а ФАО II – только кислород (Figdore et al., 2018; Dasgupta et al., 2019). К потенциальным представителям ФАО относят широко распространенные в очистных сооружениях аэробные актинобактерии *Tetrasphaera* (Maszenan et al., 2000; Nielsen et al., 2019), а также ряд других прокариот, роль которых в биологическом удалении фосфора надежно не установлена – *Thiothrix caldifontis* (Rubio-Rincón et al., 2017), *Microlunatus phosphovorius* (Nakamura et al., 1995), “*Ca. Accumulimonas*” (Nguyen et al., 2012), новая группа органофильных бактерий семейства *Comamonadaceae* (Ge et al., 2015), *Dechloromonas* (Ren et al., 2020), *Methanosarcina mazei* (Paula et al., 2019).

Несмотря на полувековой опыт использования ФАО в процессах очистки сточных вод и огромное количество исследований, посвященных этой группе бактерий, физиология фосфат-аккумулялирующих бактерий до сих пор детально не изучена. Основная причина заключается в том, что в связи со сложностью организации и большим разнообразием микробных сообществ активных илов, в которых бактерии тесно связаны слизистым матриксом, выделить представителей ФАО с циклическим типом метаболизма в чистую культуру до сих пор никому не удалось (Дорофеев и соавт., 2019). Источниками информации о ФАО являются метагеномный анализ микробных консорциумов, осуществляющих биологическое удаление фосфатов в крупномасштабных очистных сооружениях, и лабораторных культур фосфат-аккумулялирующих организмов. На основании исследования метагенома ила, обогащенного “*Ca.*

Accumulibacter phosphatis”, было установлено, что представители ФАО II имеют полный набор генов фиксации азота и CO₂ (Flowers et al., 2013). Исследования экспрессии генов цикла трикарбонных кислот выявили значительные расхождения в анаэробном и аэробном метаболизме различных популяций “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” (Wexler et al., 2009). Было показано, что представители ФАО имеют как общие пути центрального метаболизма углерода и фосфора, так и специфические, связанные со спектром используемых органических субстратов и акцепторов электронов (Skenner et al., 2015). На основании протеомного анализа было установлено, что анаэробная деградация гликогена у всех изученных “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” осуществляется по пути Эмбдена–Мейергофа–Парнаса (Wilmes et al., 2008).

Выращивание обогащенных ФАО культур проводят, как правило, в реакторах типа SBR (Sequencing Batch Reactor) (Artan et al., 2005; Liu et al., 2020; Fan et al., 2020), воспроизводящих технологические условия крупномасштабных очистных сооружений. Эта технология имеет ряд недостатков. В частности, для получения в SBR культур с высокой плотностью (несколько граммов в литре) прибегают к удержанию в биореакторе части биомассы, в результате чего развитие культур происходит в виде флокул, которые имеют такую же сложную многокомпонентную структуру, как активный ил очистных сооружений. Получить микробное сообщество с минимальным количеством компонентов, в котором доминируют ФАО, в таких реакторах практически невозможно. Существенный прогресс в исследовании ФАО авторы видят в развитии и совершенствовании альтернативных способов циклического культивирования, поддерживающих оптимальные условия для роста ФАО в гомогенной культуре и дающих преимущество по сравнению с традиционным SBR-культивированием. В гомогенной культуре проще проводить физиологические исследования и выделять чистые культуры ФАО традиционными микробиологическими методами.

В настоящей работе для минимизации образования флокул и получения гомогенного микробного сообщества, обогащенного ФАО, был выбран циклический отъемно-доливной способ культивирования с перемешиванием в модифицированном биореакторе SBR-типа, обеспечивающем чередование аэробных и анаэробных условий. Целью исследования было изучение развивающегося в этих условиях фосфат-аккумулялирующего микробного консорциума, его описание и изучение видового состава.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование в биореакторе. Лабораторный биореактор для циклического культивирования микробного сообщества был создан на основе биореактора BIOSTAT В (фирмы “Sartorius”), имеющего рабочий объемом 2 л, снабженного перемешивающим устройством и внешней рубашкой для термостатирования. Схема биореактора для культивирования представлена на рис. 1.

Цикличность культивирования заключалась в чередовании анаэробных условий с присутствием ацетата (легкодоступного источника углерода и энергии) и аэробных условия без ацетата (после его потребления в анаэробный период). Подача свежей среды в биореактор и слив культуры осуществляли с помощью двух перистальтических насосов. Аэробные и анаэробные условия создавали за счет подачи в биореактор воздуха или азота, очищенного от следов кислорода, с использованием системы регулирования подачи газов (ООО “Элточприбор”, Россия). Управление газовыми потоками и перистальтическими насосами осуществляли в автоматическом режиме с использованием универсального логического модуля LOGO (“Siemens”).

Каждый цикл культивирования микробного сообщества в биореакторе длился 6 ч и состоял из нескольких последовательных этапов:

1) создание анаэробных условий продувкой реактора азотом в течение 5 мин со скоростью 5 л/мин (за это время концентрация O_2 в культуре падала ниже 0.05 мг O_2 /л), после чего в биореактор подавали питательную среду в объеме 0.125 л. Общая продолжительность этого этапа составляла 10 мин;

2) анаэробный период, в течение которого культуру перемешивали мешалкой со скоростью 200 об./мин. Продолжительность анаэробного периода составляла 2 ч 50 мин;

3) аэробный период, в течение которого микробное сообщество аэрировали воздухом. Продолжительность аэробного периода – 3 ч.

Через каждые четыре цикла выращивания (24 ч) в конце аэробного периода (за 5 мин до его окончания) прекращали подачу воздуха и 0.5 л культуры сливали из биореактора (остаточный объем культуры в реакторе составлял 1.5 л).

Таким образом, усредненная удельная скорость протока системы составила 0.29 л/сут, что в квазистационарном состоянии соответствует возрасту культуры 3.4 сут (время генерации – 2.4 сут).

Для предотвращения зарастания емкости с питательной средой и подающих ее в реактор шлангов, эти части установки еженедельно промывали стерильной водопроводной водой, нагретой до 95°C.

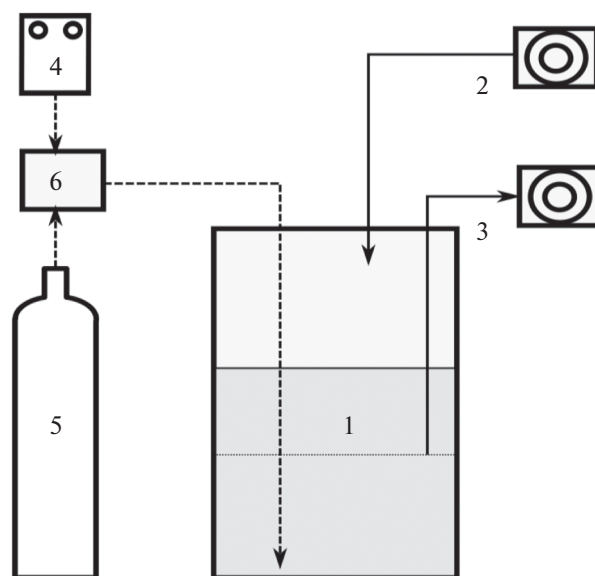


Рис. 1. Схема установки для отъемно-доливного аэробно/анаэробного выращивания микроорганизмов: 1 – биореактор; 2 – насос подачи среды; 3 – насос отведения культуры; 4 – воздушный компрессор; 5 – источник газообразного азота; 6 – система регулирования подачи газов.

Посевным материалом (инокулянт), который вносили в биореактор, служил ил аэротенков Люберецких очистных сооружений (г. Москва).

Питательная среда, подобранная на основании мирового опыта лабораторного выращивания ФАО (Onuki et al., 2002; Welles et al., 2017) имела следующий состав (г/л водопроводной воды): $CH_3COONa (3H_2O)$ – 0.708; $(NH_4)_2SO_4$ – 0.046; KH_2PO_4 – 0.109; дрожжевой экстракт – 0.009; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.135. В качестве основного источника углерода и энергии был использован ацетат (Artan et al., 2005; Tchobanoglous et al., 2014).

Аналитические методы. Значение pH среды измеряли с помощью pH-метра-иономера Эксперт-001 (“ООО Эконикс-Эксперт”, Россия). В процессе культивирования в реакторе значение pH находилось в пределах 8.5–8.7.

Температуру культивирования микробного сообщества 18–20°C задавали с помощью термостата Haake® WKL 26 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Количество взвешенного вещества в отобранной из реактора пробе после ее фильтрования и высушивания определяли гравиметрически (ПНДФ 14.1:2:4.254-09).

Концентрацию фосфатов определяли фотометрически с молибдатом аммония как в подающейся в биореактор питательной среде, так и на выходе из биореактора в конце аэробной и анаэробной фаз культивирования (ПНДФ 14.1:2:4.248-07).

Концентрацию растворенного кислорода измеряли электрохимически с использованием кислородомера Oxi 197 ("WTW", Германия).

Исследование культуры фосфат-аккумулирующих бактерий. Морфологию клеток исследовали на микроскопе Olympus CX41 с фазовым контрастом ("Olympus", Япония).

Фосфат-аккумулирующие бактерии в составе микробного сообщества определяли по наличию в составе клеток гранул, состоящих из соединений фосфора, о чем судили по результатам рентгеновского микроанализа препаратов.

Количество клеток (% от состава клеток всего сообщества), имеющих в своем составе различные включения, определяли на основании среднего значения, полученного при подсчете клеток в 80 полях зрения.

Электронно-микроскопические исследования тотальных препаратов проводили на микроскопе JEM 100 ("Jeol", Япония) по методике описанной ранее (Vasilyeva et al., 2006). Для приготовления препаратов клетки фиксировали 2.5% глutarовым альдегидом. Дофиксацию проводили раствором тетраоксида осмия.

Рентгеновский микроанализ препаратов клеток проводили на микроскопе JEM-1400 ("Jeol", Япония), оснащенного рентгеновским микроанализатором ("Oxford Instruments", Великобритания), при ускоряющем напряжении 80 кВ; угол наклона образца – 15°. Получаемые спектры анализировали с применением программы AZtec ("Oxford Instruments", Великобритания). Эту же программу использовали для элементного картирования образцов. Образцы для рентгеновского микроанализа готовили с использованием медных сеток для электронной микроскопии с нанесенной формваровой пленкой, напыленной углеродом, на которые наносили нативные препараты клеток. Сетки высушивали и использовали для анализа.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2007.

Исследуемые образцы. Для исследования состава развивающегося микробного консорциума в лабораторном биореакторе отбирали четыре образца активного ила:

1) Образец активного ила из промышленного биореактора по удалению органического вещества, аммония и фосфора. В биореакторе реализована технология Кейптаунского университета (Burton et al., 2014), основанная на чередовании аэробной и анаэробной зон (в аэротенке карусельного типа). Данный образец использовался для загрузки лабораторного биореактора.

2) Образец активного ила, отобранного из лабораторного биореактора на 8 сут с момента его пуска.

3) Образец активного ила, отобранного из лабораторного биореактора на 15 сут с момента его пуска.

4) Образец активного ила, отобранного из лабораторного биореактора на 22 сут с момента его пуска.

Выделение ДНК для метагеномного анализа, амплификация и секвенирование фрагментов генов 16S рРНК. ДНК из образцов активного ила выделяли с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit ("Qiagen", Германия) по протоколам производителя. Вариабельный V3–V4 регион гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров 341F CCTAYGGGDBGCWS-CAG и 806R GGACTACNVGGGTHTCTAAT (Frey et al., 2016). Полученные ПЦР фрагменты использовали для приготовления библиотек для секвенирования с помощью наборов Nextera XT DNA Library Prep Kit ("Illumina") по протоколам производителя. Мультиплексировали с помощью наборов Nextera XT Index Kit v2. ПЦР фрагменты секвенировали с использованием Illumina MiSeq. Для каждого образца получали не менее 8 тысяч последовательностей фрагментов генов 16S рРНК.

Чтения из всех образцов были объединены вместе, исключены низкокачественные чтения, синглтоны и химеры. Оставшиеся чтения были кластеризованы в ОТЕ с минимальной идентичностью в 97%. Для определения доли ОТЕ в каждом из образцов, на репрезентативные последовательности ОТЕ были наложены исходные чтения (включая низкокачественные и синглтоны) с минимальной идентичностью в 97% на всей длине чтения. Для выполнения всех этих процедур использовался пакет программ usearch (Edgar, 2010). Таксономическую идентификацию микроорганизмов по последовательностям генов 16S рРНК проводили с использованием usearch и базы данных Silva.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование ФАО. Разработана методика выращивания ФАО в биореакторе, основанная на периодическом (циклическом) изменении условий культивирования. Содержание взвешенного вещества в биореакторе после его инокуляции активным илом составляло 3.43 г/л, рН 8.5. В течение первых 15 сут происходило уменьшение массы взвеси до 0.2 г/л за счет ее вымывания и незначительное изменение рН до 8.9. За это время снижалось количество грубодисперсной примеси, после чего взвешенное вещество практически полностью было представлено микробной биомассой. С 15 до 22 сут концентрация микробной биомассы, а также значение рН водной фазы реактора держались на постоянном уровне, что свидетельствовало о стабилизации его работы. Одно-

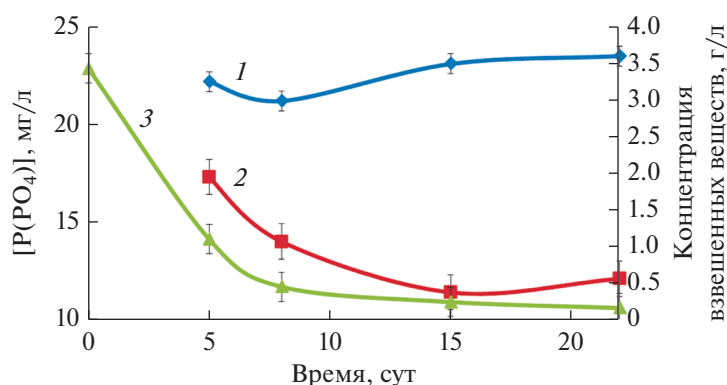


Рис. 2. Изменение содержания растворимых фосфатов в биореакторе: 1 — концентрация P-PO₄ в среде, поступающей в реактор; 2 — концентрация P-PO₄ на выходе из биореактора; 3 — концентрация взвешенных веществ в биореакторе.

временно с этим происходило постепенное уменьшение содержания фосфатов в водной фазе реактора. Если на 5 сут культивирования разница между количеством фосфатов в исходной среде и сливной воде биореактора составляла 4.9 мг/л, то к 8 сут эта цифра возрастала в 1.5 раза (до 7.2 мг/л), а к 22 сут она составила 11–12 мг P-PO₄/л, что соответствовало 50% удалению фосфора из поступающей среды (рис. 2).

Для выяснения природы удаления фосфора, нами было исследовано изменение количества фосфатов в среде в течение одного цикла работы, включающего аэробную и анаэробную фазы. Количественные данные о содержании фосфатов в течение одного цикла культивирования на 8, 15 и 22 сут работы реактора представлены в табл. 1. Необходимо отметить, что в соответствии с биохимическими реакциями, протекающими у ФАО, в анаэробных условиях в отсутствие окислителей и при наличии ацетата происходит выброс фосфатов из клеток. При попадании в аэробные условия клетки ФАО окисляют накопленные углеродные субстраты и при этом поглощают фосфата из среды (Terashgima et al., 2016).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что в процессе культивирования активного ила очистных сооружений в лабораторной установке развивалось микробное сообщество, включающее физиологически активных представителей ФАО. Также важно, что концентрация фосфатов на выходе из реактора была всегда ниже, чем в поступающей воде.

Исследование клеток ФАО методами микроскопии и рентгеновского микроанализа. Микроскопическое исследование микробного сообщества биореактора выявило морфологическое разнообразие бактериальных форм в его составе. Большинство (до 85%) клеток содержало включения (рис. 3). В целом, в сообществе доминировали вытянутые округлые клетки размером (1–1.5) × (2–3.5) мкм, которые содержали преломляющие свет структуры разного размера, расположенные вдоль клеток (рис. 3а). Крупные палочковидные клетки размером (2–3) × (3–5) мкм содержали мелкие плотные темные включения (рис. 3б). Наряду с палочковидными клетками в сообществе развивались клетки округлой формы размером 2.4 × 3.3 мкм со светящимися круглыми внутриклеточными структурами, которые располагались

Таблица 1. Изменение концентрации фосфатов в ходе одного цикла культивирования микробного сообщества на 8, 15 и 22 сут работы биореактора

Время культивирования, сут	Концентрация P-PO ₄ , мг/л			
	начало цикла	конец анаэробной фазы	конец аэробной фазы	Δ, мг/л
8	14.6 ± 1.18	17.0 ± 1.19	14.0 ± 1.35	3.0
15	12.3 ± 1.18	14.7 ± 1.19	11.4 ± 1.35	3.3
22	13.0 ± 1.18	15.3 ± 1.19	12.1 ± 1.35	3.2

Примечание. Δ — разность концентраций фосфора в среде между анаэробной и аэробной фазами.

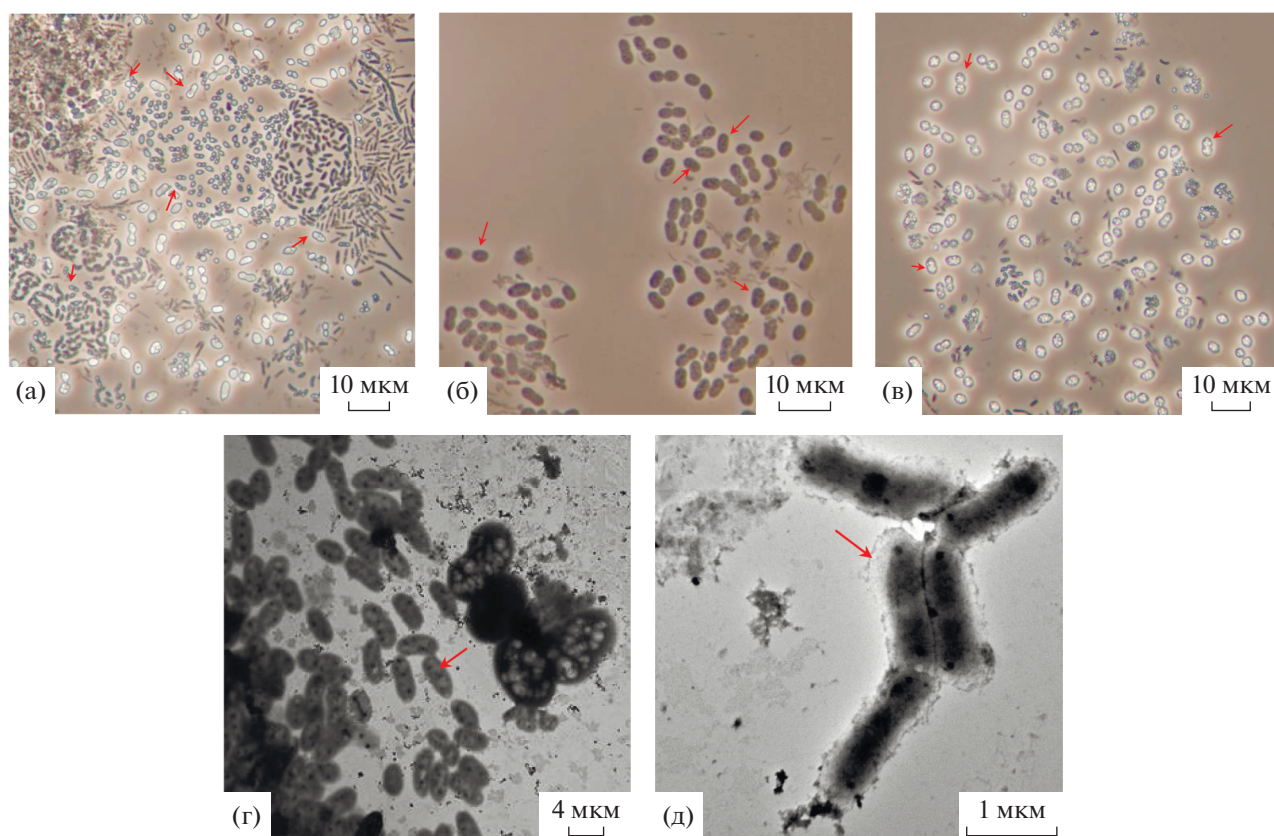


Рис. 3. Бактериальное разнообразие в составе микробного сообщества биореактора: а–в – фазовый контраст, $\times 1000$; г – электронная микроскопия, $\times 800$; д – электронная микроскопия, $\times 1700$. Стрелками показаны клетки с включениями.

равномерно по всему объему клетки (рис. 3в). Электронно-микроскопическое исследование подтвердило наличие в микробном сообществе клеток с разными включениями (рис. 3г, 3д).

Для определения химического состава включений нами было сделано картирование микробного сообщества в целом методом рентгеновского микроанализа, а также проведен точечный анализ элементного состава бактериальных клеток. Метод рентгеновского микроанализа позволяет проводить быстрое определение элементного состава микробных объектов, как отдельных клеток, так и их скоплений, что позволяет получить информацию по содержанию интересующего нас фосфора и других элементов в сравнительном количественном соотношении друг к другу. Применение режима картирования программы AZtec дает возможность увидеть наглядную картину распределения элементов в образце.

Картирование позволило установить, что химические элементы, включая фосфор, распределялись внутри представителей сообщества поразному. Часть элементов содержались внутри клеток, часть сорбировалась в межклеточном пространстве на поверхности клеток сообщества.

В палочковидных клетках размером $(1-1.5) \times (2-3.3)$ мкм такие химические элементы как углерод, калий, сера и кальций были равномерно распределены в клетках, а фосфор, натрий и магний находились не только внутри клеток, но в межклеточном пространстве (рис. 4). В клетках палочковидной формы размером 0.5×2 мкм нами были обнаружены электронно-плотные структуры, которые были идентифицированы как включения фосфора (рис. 5а, 5б). Для подтверждения результатов картирования микробного сообщества в целом, нами был проведен точечный элементный анализ отдельных клеток сообщества. Наиболее характерные для этих клеток спектры показаны на рис. 5в. Процентное содержание химических элементов в точках анализа представлено в табл. 2. Точечный анализ показал, что содержание фосфора в клетках (спектры 51–54) было выше, по сравнению с фоновым количеством этого элемента. Включения фосфора (спектры 51 и 52) в палочковидных клетках содержали в 10 раз больше этого элемента, по сравнению с контролем. Включения в изогнутых клетках (спектр 53) содержали в 8 раз больше этого элемента. Максимальное количе-

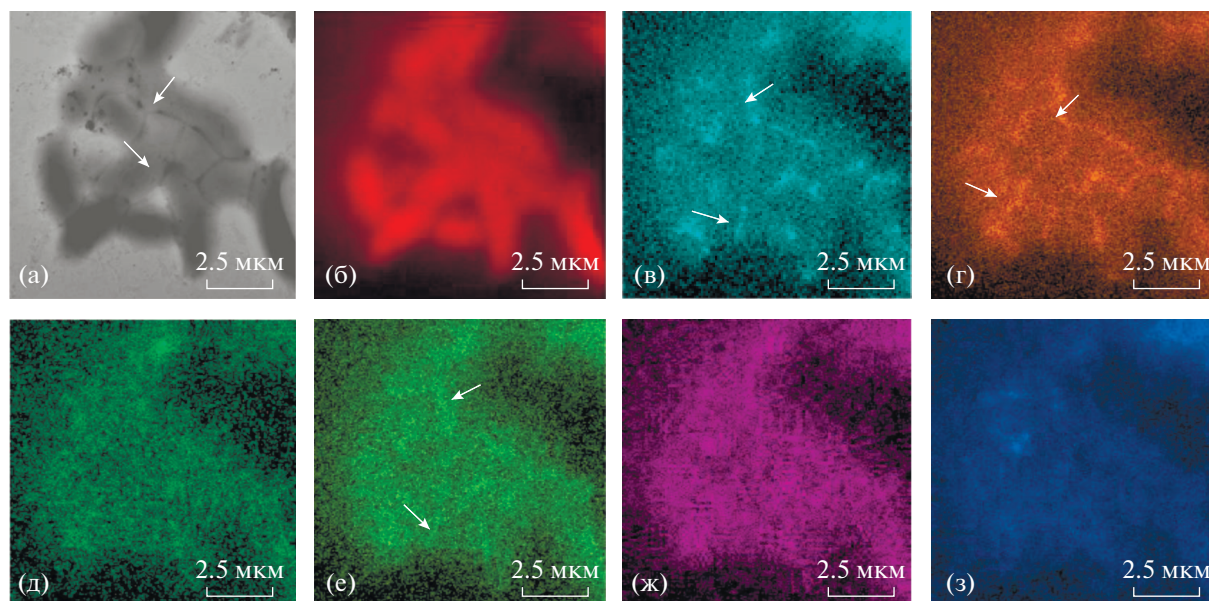


Рис. 4. Элементный анализ микробного сообщества в целом методом картирования с применением рентгеновского микроанализа. Цветом показано распределение отдельных химических элементов; а – электронная фотография сообщества; б – распределение углерода; в – распределение фосфора; г – распределение натрия; д – распределение калия; е – распределение магния; ж – распределение серы; з – распределение кальция. Стрелками показано накопление химических элементов в межклеточном пространстве.

ство фосфора находилось в кокковидных клетках (спектр 54).

Таким образом, было показано, что фосфор находился как на поверхности, так и внутри клеток. Распределение этого элемента внутри клеток было разным. Часть бактерий микробного сообщества биореактора содержали фосфорные гранулы и могли быть представителями ФАО.

Изменение таксономического состава микробного консорциума в процессе его культивирования. На начальном этапе работы биореактора в составе микробного сообщества активного ила были обнаружены последовательности представителей доменов бактерий и архей. Доля архей составляла небольшую часть – 1.17% от общего количества последовательностей. Среди них доминировали метаногены порядка *Methanosarcinales* и представители некультивируемого кандидатного филума *Wosearchaeota*. Ближайшие гомологи найденных последовательностей генов 16S рРНК были обнаружены в очистных сооружениях, сбрасывающих

осадки в анаэробных условиях, и метантенках (Kirkegaard et al., 2017).

Бактериальные последовательности относились к 19 различным филумам, среди которых доминировали представители филумов *Bacteroidetes* (22.4%), *Proteobacteria* (22.3%), *Patescibacteria* (8.8%), *Chloroflexi* (27.2%) и *Nitrospirae* (4.7%). Суммарно их доля от всех последовательностей генов 16S рРНК составляла 85.4%. Филумы *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* и др. составляли минорную часть микробного сообщества (рис. 6).

Около 4.8% всех последовательностей фрагментов генов 16S рРНК относилось к неизвестным глубоким линиям и не были классифицированы даже на уровне филума.

Большинство идентифицированных филумов ранее обнаруживались в биореакторах по очистке сточных вод (Wu et al., 2019).

По мере культивирования сообщества менялся его состав, и снижалось таксономическое раз-

Таблица 2. Содержание химических элементов в точках анализа, выраженное в процентах от общего содержания элементов

Номер спектра	Контроль (подложка без клеток)	51	52	53	54
Содержание фосфора, %	0.15	1.63	1.59	1.31	3.16
Отношение концентраций фосфора в исследуемой точке к контролю	1	10.87	10.6	8.73	21.07

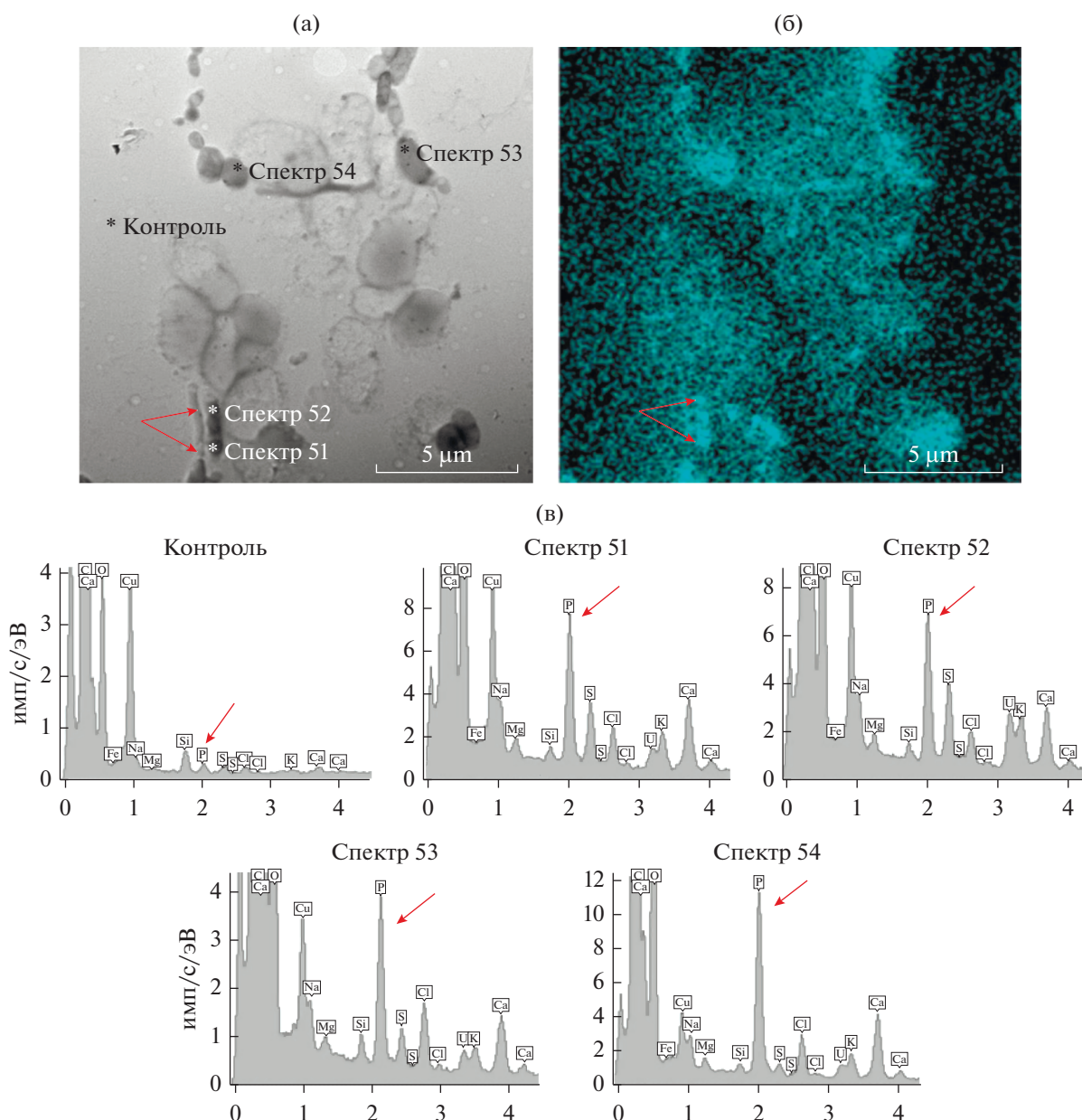


Рис. 5. Точечный анализ элементного состава бактериальных клеток фосфат-аккумулирующего сообщества методом картирования с применением рентгеновского микроанализа: (а) – электронная фотография клеток; (б) – распределение фосфора в клетках сообщества; стрелками показаны обогащенные фосфором гранулы. (в) – контроль – фоновое внеклеточное содержание фосфора; содержание химических элементов: в гранулах палочковидных клеток (спектры 51 и 52); в гранулах изогнутых клеток (спектр 53); в кокковидных клетках (спектр 54). Стрелками отмечены пики фосфора.

нообразии. Так доля архей в ходе работы биореактора снизилась до 0.01% (рис. 6). Доля остальных доминирующих в момент загрузки филумов *Patescibacteria* (8.8%), *Chloroflexi* (27.2%) и *Nitrospirae* (4.7%) в ходе работы биореактора значительно снизилась – до 2.66, 2.63 и 0.15% соответственно. Филум *Patescibacteria* был описан совсем недавно на основании молекулярных данных (Hug et al., 2016; Parks et al., 2018) и в настоящее время не име-

ет культивируемых представителей. Метаболизм бактерий этого филума был предсказан только на основании метагеномного анализа микробных сообществ. *Patescibacteria* имеют, как правило, небольшие геномы, при этом многие метаболические пути у них отсутствуют или они неполные. На основании этих данных предполагается, что бактерии этого филума являются либо паразитами, либо симбионтами.

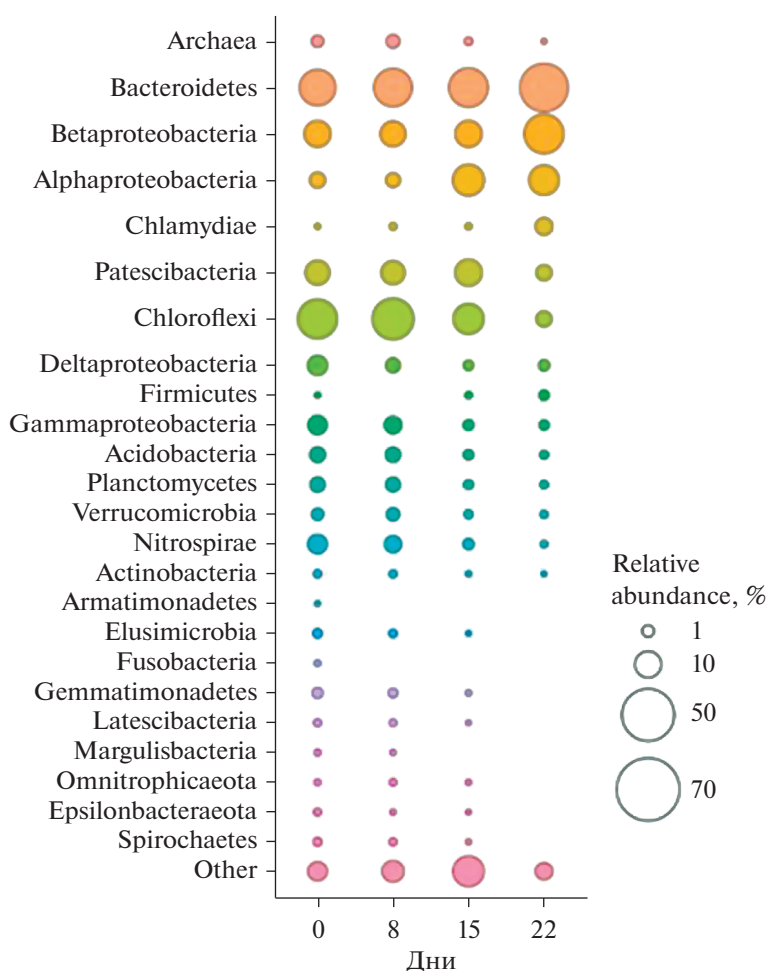


Рис. 6. Таксономический состав микробного сообщества биореактора.

В ходе работы биореактора большинство минорных групп микроорганизмов были элиминированы, среди них представители филумов *Fusobacteria*, *Ca. Margulisbacteria*, *Ca. Latescibacteria*, *Spirochaetes*, *Elusimicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes* и *Omnitrophica*. Доли остальных минорных групп также снижались (рис. 6).

Число обнаруженных ОТЕ сократилось с 445 до 184. На заключительном этапе 61% (10 наиболее многочисленных ОТЕ) всех прочтений составляли ОТЕ, которые на начальном этапе работы биореактора составляли всего 1% сообщества.

Доли двух доминирующих в загрузке филумов *Bacteroidetes* (22.4%) и *Proteobacteria* (22.3%) в ходе культивирования в циклически изменяющихся условиях увеличились. Доля *Bacteroidetes*, которые способны к разложению сложного органического вещества, возросла почти в два раза — до 42.8% (Thomas et al., 2011; Fernández-Gómez et al., 2013; Hahnke et al., 2016). При этом основной рост

приходился на виды, относящиеся к порядкам *Chitinophagales*, *Cytophagales* и *Sphingobacteriales*.

В ходе работы биореактора доля протеобактерий возросла с 22.3 до 43.2%, что было связано с увеличением численности представителей двух классов α - и β -*Proteobacteria* (с 2.7 до 14.8% и с 10.7 до 27.3% соответственно), в то время как доля γ -, δ -, ϵ -протеобактерий снизилась с 9.5 до 1.4%. Среди альфапротеобактерий в биореакторе существенно возрастала доля микроорганизмов, относящихся к порядку *Microvibrionales* (с 0.28 до 7.4%), близкие последовательности 16S рРНК к которым были обнаружены ранее в биопленке аноксигенного гибридного реактора по очистке сточных вод от азота и фосфора (последовательность JN391746, идентична на 98% с OTU1), а также доля бактерий рода *Gemmobacter* с 0.04 до 3.7%, в который входят гетеротрофные бактерии, являющиеся факультативным анаэробами (Rothe et al., 1987).

Бетапротеобактерии, доминирующие в большинстве исследованных микробных сообществ активных илов промышленных очистных сооружений (Yu, Zhang, 2012; Wu et al., 2019), в составе сообщества нашего биореактора были представлены семейством *Rhodocyclaceae*. Следует отметить, что в ходе развития микробного сообщества существенно изменялось соотношение долей родов внутри этого семейства. В частности, снижалась доля представителей рода *Thauera* (с 3.6 до 0.1% от общего числа чтений). Известно, что эти микроорганизмы способны разлагать широкий спектр органических кислот и ароматических соединений (Mechichi et al., 2002; Mao et al., 2010). В тоже время, увеличились доли представителей рода *Zoogloea* (с 0.09 до 11.5%), который встречается в составе большинства микробных сообществ активных илов (Zhang et al., 2012; Wu et al., 2019) и представителей рода *Dechloromonas* семейства *Rhodocyclaceae* – с 0.74 до 11.1% от всех последовательностей гена 16S рНК. Родственные им микроорганизмы были найдены в микробных сообществах различных очистных сооружений, в частности, ближайшие последовательности генов 16S были найдены в аэробном ферментере в Китае (LT841763 – 99%, LT842295 – 99% идентичность) (Dasgupta et al., 2019). В состав семейства *Rhodocyclaceae* входят фосфат-аккумулирующие организмы, в частности, вид “*Ca. Accumulibacter*”, который доминирует в большинстве микробных сообществ промышленных сооружений по очистке сточных вод от соединений фосфора (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015; Barr et al., 2016; Дорофеев и соавт., 2019). В лабораторном биореакторе в момент загрузки активным илом очистных сооружений бактерии *Ca. Accumulibacter* ожидаемо идентифицировались и были представлены двумя ОТЕ, доли которых составляли всего 0.01 и 0.2% и имели высокое сходство с последовательностями гена 16S рНК, выявленных в SBR-реакторе по удалению фосфора (идентичность генов 16S рНК 96%, HM046420) и биореакторах по очистке сточных вод (99% идентичности с LR637422) (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015). Однако в процессе культивирования доля этих организмов снижалась, и к концу работы биореактора они не обнаруживались в составе микробного сообщества. Таким образом, в сконструированном биореакторе в процессе циклического культивирования развивались представители ФАО, которые не были характерны для крупномасштабных очистных сооружений (Artan, Orhon, 2005).

В заключение следует отметить, что использованное нами последовательно-периодическое культивирование позволило получить фосфат-аккумулирующее микробное сообщество, отличающееся от сообщества флокулированного активного ила промышленного аэротенка, использованного в качестве инокулята, большей гомогенностью и

низкой плотностью популяции. Количественные изменения концентрации фосфатов в анаэробный и аэробный периоды и итоговое снижение содержания фосфора в среде указывали на развитие в биореакторе бактерий, которые отвечают за удаление фосфора аналогично процессам биологического удаления фосфора активным илом в очистных сооружениях. Обычно содержание фосфора в сточных водах составляет 4–8 мг/л (Qasim, Zhu, 2017) и снижается до концентрации менее 1 мг/л. При этом концентрация активного ила в промышленных реакторах как правило находится в пределах 2–4 г/л. В наших экспериментах при концентрации биомассы на порядок меньше (0.2 г/л), чем в промышленных очистных сооружениях, удаление фосфора достигало 12 мг/л, что на порядок выше по удельным показателям удаления фосфора на единицу биомассы активного ила. Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффективности использования последовательно-периодического способа культивирования активного ила очистных сооружений, в процессе которого в лабораторном биореакторе развивалось микробное сообщество с высоким содержанием фосфат-аккумулирующих бактерий.

Микроскопические методы исследования показали накопление фосфора в виде гранул в клетках разной морфологии, что свидетельствовало о развитии разных представителей группы ФАО в микробном сообществе. Молекулярно-биологические методы не только подтвердили наличие фосфат-аккумулирующих бактерий в составе сообщества, но и позволили проследить динамику развития сообщества ФАО в целом и определить доминирующих представителей этой группы микроорганизмов. Интересно отметить, что в активном иле очистных сооружений, который использовали как инокулянт, были идентифицированы известные бактерии семейства *Rhodocyclaceae* – “*Ca. Accumulibacter*”, которые считаются типичными для очистных сооружений. Они были представлены двумя ОТЕ, близкими к последовательностям гена 16S рНК, ранее обнаруженным в SBR-реакторе по удалению фосфора (идентичность генов 16S рНК 96%, HM046420) и биореакторах по очистке сточных вод (99% идентичности с LR637422) (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015; Barr et al., 2016; Welles et al., 2017; Дорофеев и соавт., 2019). Однако в процессе работы лабораторного биореактора доля этих организмов снижалась. В момент наиболее эффективного удаления фосфора микробным сообществом бактерии “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” не были идентифицированы в его составе. Доминирующими группами в этот момент были представители семейства *Rhodocyclaceae*, относящиеся к родам *Dechloromonas* и *Zoogloea*, доля последовательностей гена 16S рНК которых увеличилась за время работы реактора максимально по сравне-

нию с долей последовательностей других бактерий.

Бактерии рода *Zoogloea* часто встречаются в активных илах очистных сооружений (Barr et al., 2016; Wu et al., 2019). В ряде работ сообщалось о совместном накоплении представителей родов *Zoogloea* и *Dechloromonas* в биореакторах по удалению фосфора в денитрифицирующих условиях (denitrifying phosphorus removal) (Bond et al., 1995). Были высказаны предположения о том, что бактерии рода *Zoogloea* могут быть потенциальными ФАО (Shao et al., 2009). Так у единственного вида *Zoogloea ramigera* были обнаружены внутриклеточные гранул воллютина (Roinestad, Yall, 1970). Микроорганизмы, родственные бактериям рода *Dechloromonas*, были найдены в микробных сообществах различных очистных сооружений, в частности, ближайшие к этому роду последовательности генов 16S были идентифицированы в аэробном ферментере в Китае (LT841763 – 99%, LT842295 – 99% идентичность) (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015; Welles et al., 2017; Dasgupta et al., 2019).

Таким образом, режим работы лабораторного биореактора с циклическим последовательно-периодическим способом культивирования микробного сообщества активного ила очистных сооружений оказался неблагоприятным для развития типичных для очистных сооружений *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” семейства *Rhodocyclusaceae* и давал преимущество для роста других представителей этой физиологической группы. В составе сообщества были идентифицированы представители двух других родов этого семейства – родов *Dechloromonas* и *Zoogloea*, которые эффективно удаляли фосфор из среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проектов 18-29-25016 (разработка ЦТМ и сбор установки, морфологический анализ микробного сообщества, микроскопирование, химический анализ, молекулярный анализ микробного сообщества в ходе работы биореактора) и 18-34-00627 (анализ состава микробного сообщества активного ила), а также, частично, при финансовой поддержке Минобрнауки РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.А. Грачёв, А.Г. Дорофеев – сборка и поддержание лабораторной установки по культивированию ФАО; В.В. Сорокин, И.К. Дорофеева – электронная микроскопия и элементный анализ; Ю.Ю. Берестовская, А.В. Пелевина, Ю.А. Николаев, Н.В. Пименов – химический анализ, микроскопирование, анализ данных, написание статьи; Р.Ю. Котляров, А.В. Белецкий, Н.В. Равин, А.В. Марданов – выделение метагеномной ДНК, секвенирование и анализ последовательностей генов 16S рРНК, подготовка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Пименов Н.В.* Циклический метаболизм как способ существования микроорганизмов // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 401–416.
- Dorofeev A.G., Nikolaev Y.A., Pimenov N.V., Mardanov A.V.* Cyclic metabolism as a mode of microbial existence // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 402–415.
- Artan N., Orhon D.* Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal // London: IWA Publishing, 2005. 116 p.
- Barr J.J., Dutilh B.E., Skennerton C.T., Fukushima T., Hastie M.L., Gorman J.J., Tyson G.W., Bond P.L.* Metagenomic and metaproteomic analyses of *Accumulibacter phosphatis* enriched floccular and granular biofilm // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 273–287.
- Bond P.L., Hugenholtz P., Keller J., Blackall L.L.* Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1910–1916.
- Burton F.L., Stensel H.D., Tchobanoglous G.* Wastewater engineering: treatment and reuse / 5th ed. revised by G. Tchobanoglous, F.L. Burton, H.D. Stensel. Metcalf and Eddy, New York–London: McGraw Hill, 2014. P. 2044.
- Dasgupta S., De Clippeleir H., Goel R.* Short operational differences support granulation in a lab scale reactor in comparison to another conventional activated sludge reactor // Bioresource Technol. 2019. V. 271. P. 417–426.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Fan Z., Zeng W., Wang B., Guo Y., Meng Q., Peng Y.* Transcriptional responses of “*Candidatus* *Accumulibacter*” clades to environmental dynamics in enhanced biological phosphorus removal // Bioresource Technol. 2020. V. 306. P. 123108.
- Fernández-Gómez B., Richter M., Schüller M., Pinhassi J., Acinas S.G., González J.M.* Ecology of marine *Bacteroidetes*: a comparative genomics approach // ISME. 2013. V. 7. P. 1026–1037.
- Figdore B.A., Stensel H.D., Winkler M.K.H.* Comparison of different aerobic granular sludge types for activated sludge nitrification bioaugmentation potential // Bioresource Technol. 2018. V. 251. P. 2189–2196.

- Flowers J.J., He S., Malfatti S., del Rio T.G., Tringe S.G., Hugenholtz P., McMahon K.D. Comparative genomics of two “*Candidatus Accumulibacter*” clades performing biological phosphorus removal // ISME J. 2013. V. 7. P. 2301–2314.
- 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.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw018>
- Hahnke R.L., Meier-Kolthoff J.P., García-López M., Mukherjee S., Huntemann M., Ivanova N.N., Woyke T., Kyrpides N.C., Klenk H.P., Göker M. Genome-based taxonomic classification of *Bacteroidetes* // Front. Microbiol. 2016. V. 20. P. 2003.
- Hesselmann R.P.X., Werlen C., Hahn D., van der Meer J.R., Zehnder A.J.B. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge // Syst. Appl. Microbiol. 1999. V. 22. P. 454–465.
- Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K., Brown C.T., Probst A.J., Castelle C. A new view of the tree of life // Nat. Microbiol. 2016. V. 1. P. 16048.
- Kirkegaard R.H., McIlroy S.J., Kristensen J.M. The impact of immigration on microbial community composition in full-scale anaerobic digesters // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 9343.
- Liu S., Daigger G. T., Liu B., Zhao W., Liu J. Enhanced performance of simultaneous carbon, nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater in an anaerobic-aerobic-anoxic sequencing batch reactor (AOA-SBR) system by alternating the cycle times // Bioresource Technol. 2020. V. 301. P. 122750.
- Mao Y., Graham D.W., Tamaki H., Zhang T. Dominant and novel clades of *Candidatus “Accumulibacter phosphatis”* in 18 globally distributed full-scale wastewater treatment plants // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 11857.
- Mao Y., Zhang X., Xia X., Zhong H., Zhao L. Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 37. P. 927–934.
- Maszenan A.M., Seviour R.J., Patel B.K.C., Schumann P., Burghardt J., Tokiwa Y., Stratton H.M. Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 593–603.
- Mechichi T., Stackebrandt E., Gad'on N., Fuchs G. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. // Arch. Microbiol. 2002. V. 178. P. 26–35.
- Mino T., Van Loosdrecht M.C.V., Heijnen J.J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process // Wat. Res. 1998. V. 32. P. 3193–3207.
- Nakamura K., Hiraishi A., Yoshimi Y., Kawaharasaki M., Masuda K., Kamagata Y. *Microlunatus phosphovorius* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 17–22.
- Nguyen H.T., Nielsen J.L., Nielsen P.H. “*Candidatus Halomonas phosphatis*”, a novel polyphosphate-accumulating organism in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 2826–2837.
- Nielsen P.H., McIlroy S.J., Albertsen M., Nierychlo M. Re-evaluating the microbiology of the enhanced biological phosphorus removal process // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 57. P. 111–118.
- Onuki M., Satoh H., Mino T. Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate // Water Sci. Technol. 2002. V. 46. P. 145–153.
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.A. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 996–1004.
- Paula F.S., Chin J.P., Schnürer A., Müller B., Manesiotis P., Waters N., McGrath J.W. The potential for polyphosphate metabolism in Archaea and anaerobic polyphosphate formation in *Methanosarcina mazei* // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 1–12.
- Qasim S.R., Zhu G. Wastewater Treatment and Reuse, Theory and Design Examples. V. 1. Principles and Basic Treatment. CRC Press, 2017.
- Qiu G., Zuniga-Montanez R., Law Y., Thi S.S., Nguyen T.Q.N., Eganathan K., Liu X., Nielsen P.H., Williams R.B.H., Wuertz S. Polyphosphate-accumulating organisms in full-scale tropical wastewater treatment plants use diverse carbon sources // Water Res. 2019. V. 149. P. 496–510.
- Ren S., Li X., Yin X., Luo C., Liu F. Characteristics of intracellular polyphosphate granules and phosphorus-absorption of a marine polyphosphate-accumulating bacterium, *Halomonas* sp. YSR-3 // J. Oceanol. Limnol. 2020. V. 38. P. 195–203.
- Roinestad F.A., Yall I. Volutin granules in *Zoogloea ramigera* // Appl. Microbiol. 1970. V. 19. P. 973–979.
- Rothe B., Fischer A., Hirsch P., Sittig M., Stackebrandt E. The phylogenetic position of the budding bacteria *Blastobacter aggregatus* and *Gemmobacter aquatilis* gen. nov., sp. nov. // Arch. Microbiol. 1987. V. 147. P. 92–99.
- Rubio-Rincon F.J., Lopez-Vazquez C.M., Welles L., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. Cooperation between *Candidatus Competibacter* and *Candidatus Accumulibacter* clade I, in denitrification and phosphate removal processes // Water Res. 2017. V. 120. P. 156–164.
- Rubio-Rincon F.J., Welles L., Lopez-Vazquez C.M., Nierychlo M., Abbas B., Geleijnse M., Nielsen P.H., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. Long-term effects of sulphide on the enhanced biological removal of phospho-

- rus: The symbiotic role of *Thiothrix caldifontis* // Water Res. 2017. V. 116. P. 53–64.
- Seviour R.J., Mino T., Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems // FEMS Microbiol. Rev. 2003. V. 27. P. 99–127.
- Shao Y., Chung B.S., Lee S.S., Park W., Lee S.S., Jeon C.O. *Zoogloea caeni* sp. nov., a floc-forming bacterium isolated from activated sludge // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 526–530.
- Skennerton C.T., Barr J.J., Slater F.R., Bond P.L., Tyson G.W. Expanding our view of genomic diversity in *Candidatus Accumulibacter* clades // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. P. 1574–1585.
- Stokholm-Bjerregaard M., McIlroy S.J., Nierychlo M., Karst S.M., Albertsen M., Nielsen P.H. A critical assessment of the microorganisms proposed to be important to enhanced biological phosphorus removal in full-scale wastewater treatment systems // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 718.
- Terashima M., Yama A., Sato M., Yumoto I., Kamagata Y., Kato S. Culture-dependent and -independent identification of polyphosphate-accumulating *Dechloromonas* spp. predominating in a full-scale oxidation ditch wastewater treatment plant // Microbes Environ. 2016. V. 31. P. 449–455.
- Thomas F., Hehemann J.-H., Rebuffet E., Czejek M., Michel G. Environmental and gut *Bacteroidetes*: the food connection // Front. Microbiol. 2011. V. 2. P. 93.
- Van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Brdjanovic D., Heijnen J.J. Biological phosphorus removal processes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. P. 289–296.
- Vasilyeva L.V., Omelchenko M.V., Berestovskaya Y.Y., Lysenko A.M., Abraham W.R., Dedysh S.N., Zavarzin G.A. *Asticcacaulis benevestitus* sp. nov., a psychrotolerant, dimorphic, prosthecate bacterium from tundra wetland soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 2083–2088.
- Welles L., Abbas B., Sorokin D.Y., Lopez-Vazquez C.M., Hooijmans C.M., van Loosdrecht M., Brdjanovic D. Metabolic response of “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” clade II C to changes in influent P/C ratio // Front. Microbiol. 2017. V. 7. P. 2121.
- Wentzel M.C., Comeau Y., Ekama G.A., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. Enhanced biological nutrient removal // Biological Wastewater Treatment. Principles, Modelling and Design / Eds. Henze M., van Loosdrecht M.C.M., Ekama G.A., Brdjanovic D. London: IWA Pub., 2008. P. 155–220.
- Wexler M., Richardson D.J., Bond P.L. Radiolabelled proteomics to determine differential functioning of *Accumulibacter* during the anaerobic and aerobic phases of a bioreactor operating for enhanced biological phosphorus removal // Environ. Microbiol. 2009. V. 11. P. 3029–3044.
- Wilmes P., Andersson A.F., Lefsrud M.G., Wexler M., Shah M., Zhang B., Hettich R.L., Bond P.L., VerBerkmoes N.C., Banfield J.F. Community proteogenomics highlights microbial strain-variant protein expression within activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal // ISME J. 2008. V. 2. P. 853–864.
- Wu L., Ning D., Zhang B., Li Y., Zhang P., Shan X., Ling F. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants // Nat. Microbiol. 2019. V. 4. P. 1183–1195.
- Yu K., Zhang T. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge // PLoS One. 2012. V. 7. e38183.
- Zeng W., Zhang L., Fan P., Guo J., Peng Y. Community structures and population dynamics of “*Candidatus Accumulibacter*” in activated sludges of wastewater treatment plants using *ppk1* as phylogenetic marker // J. Environ. Sci. 2018. V. 67. P. 237–248.
- Zhang T., Shao M.-F., Ye L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants // ISME J. 2012. V. 6. P. 1137–1147.

Phosphates Removal by a Microbial Consortium under Conditions of Cyclic Aerobic-Anaerobic Cultivation

A. V. Pelevina^{1,*}, Yu. Yu. Berestovskaya¹, V. A. Grachev¹, I. K. Dorofeeva¹, V. V. Sorokin¹,
A. G. Dorofeev^{1,2}, A. Yu. Kallistova¹, Yu. A. Nikolaev¹, R. Yu. Kotlyarov³,
N. V. Pimenov¹, and A. V. Mardanov³

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

²Mosvodokanal Co., Moscow, 105005 Russia

³Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: annie.pelevina@yandex.ru

Received August 5, 2020; revised September 24, 2020; accepted September 29, 2020

Abstract—Formation of a community of phosphate-accumulating microorganisms (PAO) in a laboratory sequential batch bioreactor ensuring altered aerobic and anaerobic conditions during periodic removal and addition of the medium were investigated. The bioreactor removed 50% phosphorus from the incoming medium after 22 days from the start-up. Microscopy and X-ray microassay revealed the of cells of diverse morphology that contained phosphorus-enriched granules. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene fragments carried out on days 0, 8, 15, and 22 showed changes in the community composition and its de-

ing diversity. On day 22, approximately twofold increase of the relative abundancies of *Bacteroidetes* (up to 43% of the 16S rRNA gene sequences) and *Proteobacteria* of the classes alpha (up to 15%) and beta (up to 27%) was observed. While at the onset of the reactor operation, typical PAOs related to “*Candidatus Accumulibacter*” (class *Betaproteobacteria*) constituted 0.2% of the community, they were not detected on day 22. The most likely PAO candidates were beta-proteobacteria of the genus *Dechloromonas*, the share of which increased from 0.7 to 11% by the time of the highest phosphorus removal from the inflowing medium. The relative abundance of denitrifying heterotrophs of the genus *Zoogloea* (family *Rhodocyclaceae*) increased from 0.1 to 11.5%. Apparently, the operation mode of the bioreactor provided favorable conditions for the process of denitrifying phosphorus removal and selection of the appropriate PAO.

Keywords: phosphate-accumulating organisms, activated sludge, bacteria with a cyclic type of metabolism, volutin granules, family *Rhodocyclaceae*, *Dechloromonas*, *Zoogloea*, “*Candidatus Accumulibacter*”

БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДНО-ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ МЫШЬЯКА

© 2020 г. Ю. А. Елкина^{a, b}, В. С. Меламуд^b, А. Г. Булаев^{a, b, *}

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, 119192 Россия

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

*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.01.2020 г.

После доработки 08.07.2020 г.

Принята к публикации 16.07.2020 г.

Целью работы являлось изучение зависимости скорости биовыщелачивания меди и цинка из мышьяксодержащего медно-цинкового концентрата, содержащего 16% Cu, 5.3% Zn и 1.36% As, от температуры и присутствия в среде органического источника углерода (дрожжевого экстракта). Основными минералами концентрата были халькопирит (CuFeS_2), теннантит ($\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$), сфалерит (ZnS) и пирит (FeS_2). В работе использовалась смешанная культура умеренно-термофильных ацидофильных микроорганизмов, окисляющих серу и двухвалентное железо, состоящая из штаммов *Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH-1 и *Acidiplasma* sp. MBA-1. Эксперименты проводили в колбах со 100 мл минеральной среды и 2 г концентрата на ротационной качалке в течение 30 сут при температурах от 40 до 60°C. Было показано, что скорость выщелачивания меди зависела и от температуры, и от присутствия дрожжевого экстракта. Так, степень выщелачивания меди возрастала с увеличением температуры, а степень выщелачивания цинка зависела от температуры в меньшей степени. При этом в присутствии органического источника углерода в среде биовыщелачивание и меди, и цинка происходило активно при высоких температурах (55 и 60°C), тогда как в экспериментах со средой без дрожжевого экстракта активность выщелачивания цветных металлов из концентрата при данных температурах была гораздо ниже. В то же время при температурах 40–50°C активность выщелачивания в меньшей степени зависела от присутствия в среде органического источника углерода.

Ключевые слова: биогидрометаллургия, ацидофильные микроорганизмы, халькопирит, теннантит, сульфидные полиметаллические концентраты

DOI: 10.31857/S0026365620060038

Биогидрометаллургические технологии, широко применяемые в промышленном масштабе для извлечения благородных (золото, серебро) и цветных (медь, никель, цинк, уран) металлов из сульфидных руд и концентратов и основанные на процессах окисления сульфидных минералов ацидофильными железом- и сероокисляющими микроорганизмами, подразделяются на технологии кучного и чанового (реакторного) биовыщелачивания (Johnson, 2014; Булаев и соавт., 2016). Нужно отметить, что из-за относительно высоких затрат реакторное биоокисление обычно применяется для извлечения из концентратов благородных металлов, тогда как переработку концентратов цветных металлов обычно выгоднее осуществлять с помощью пирометаллургических технологий (Булаев и соавт., 2016; World Copper Factbook, 2017; Pietrzyk, Tora, 2018). При этом для извлечения цветных металлов обычно используется кучное биовыщелачивание, которое позволяет рентабельно

перерабатывать бедные руды цветных металлов благодаря низкой себестоимости процесса, не требующего сложного аппаратного оформления (Gentina, Acevedo, 2013; Johnson, 2014; Булаев и соавт., 2016).

Практика применения биогидрометаллургических технологий показывает, что реакторное биовыщелачивание может успешно применяться для извлечения цветных металлов из концентратов, которые не могут быть переработаны пирометаллургическими методами из-за особенностей состава (относительно низкое содержание ценных компонентов, наличие примесей, которые невозможно удалить на этапе обогащения, высокое содержание токсичных элементов) (Булаев и соавт., 2016). Например, было продемонстрировано, что реакторное биовыщелачивание может быть успешно использовано для переработки сульфидных концентратов, содержащих кобальт, никель,

медь и цинк (Morin, d'Hugues, 2007; Gericke et al., 2009; Neale et al., 2017).

Одной из причин, которая вынуждает использовать гидрометаллургические технологии (в том числе биовыщелачивание) для переработки руд и концентратов цветных металлов, является высокое содержание мышьяка (Marsden, House, 2006; Neale et al., 2017). Например, золотосодержащие концентраты часто содержат минерал арсенопирит (FeAsS), поэтому при их переработке с помощью пирометаллургических технологий (обжига) возникают проблемы с газовыми выбросами, полная очистка которых от высокотоксичных летучих оксидов мышьяка As_2O_3 и As_4O_6 , образующихся при обжиге, представляет собой технологическую проблему (Marsden, House, 2006). Поэтому для их переработки повсеместно используются технологии реакторного биоокисления и автоклавного окисления, которые позволяют избежать образования токсичных газовых выбросов (Marsden, House, 2006; Mahmoud et al., 2017). В Финляндии существует предприятие, которое использует реакторное биовыщелачивание для извлечения никеля и кобальта из сульфидного концентрата. Так как концентрат содержит около 1.5% мышьяка, его нельзя направлять на пирометаллургическую переработку, и поэтому для его переработки используется реакторное биовыщелачивание (Neale et al., 2017).

Перспективной областью для применения биогидрометаллургических методов может быть переработка мышьяксодержащих руд и концентратов меди. Наиболее распространенным минералом меди, обладающим и наибольшим значением для металлургии, является сульфидный минерал халькопирит (CuFeS_2). Халькопиритные концентраты, получаемые из сульфидных руд с помощью флотационного обогащения, обладающие достаточно высоким содержанием меди и не содержащие большого количества примесей, могут успешно перерабатываться с помощью пирометаллургических технологий (Watling, 2006; Vaba et al., 2012). Однако, из многих медных руд из-за особенностей минерального состава не всегда возможно получить концентраты, полностью отвечающие требованиям для пирометаллургической переработки. Так, проблемой является присутствие в рудах сульфидных минералов меди, содержащих мышьяк, например энаргита (Cu_3AsS_4) и теннантита ($\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$) (Filippou et al., 2007; Diaz et al., 2018). В ряде работ было исследовано биовыщелачивание медных руд и концентратов, содержащих мышьяк (Diaz et al., 2018). В частности, в одной из работ исследовали биовыщелачивание концентрата, содержащего энаргит при температурах 35 и 68°C мезофильными и термофильными микроорганизмами соответственно. Было показано, что выщелачивание меди из энаргита зависело от

температуры, и при более высокой температуре было выщелочено на порядок больше меди, чем в мезофильных условиях (84 и 8% соответственно) (Munoz et al., 2006).

Разработка технологических подходов для биовыщелачивания разных типов сырья требует понимания закономерностей процессов выщелачивания, которые определяются разными факторами. Сульфидные концентраты содержат всегда целый ряд сульфидных минералов, механизмы биоокисления которых различаются. Кроме того, в процессе биовыщелачивания сульфидных концентратов между минералами происходят электрохимические взаимодействия (Jyothi et al., 1989; Schippers, Sand, 1999; Mahmoud et al., 2017). Биовыщелачивание сульфидных минералов зависит от физико-химических факторов среды, а также от состава микробной культуры, которая осуществляет процесс биовыщелачивания (Кондратьева и соавт., 2015). В промышленных условиях реакторное биовыщелачивание не проводится в асептических условиях, поэтому всегда осуществляются популяциями микроорганизмов, которые формируются в процессе биовыщелачивания и состав которых зависит от условий процесса, а также от минерального состава сырья (Кондратьева и соавт., 2015). Так как процессы биовыщелачивания в промышленных условиях сопровождаются повышением температуры, то доминируют в микробных популяциях обычно умеренно-термофильные микроорганизмы, такие как представители родов бактерий *Acidithiobacillus* (умеренно-термофильный представитель рода – вид *A. caldus*) и *Sulfobacillus* и архей *Acidiplasma* и *Ferroplasma* семейства *Ferroplasmaceae* (Rawlings et al., 1999; Okibe et al., 2003; Dopson, Lindstrom, 2004; van Hille et al., 2011; Bulaev et al., 2017). Микроорганизмы, которые присутствуют в популяциях, осуществляющих процессы биовыщелачивания, различаются по своим физиологическим свойствам (оптимальная температура, pH, устойчивость к различным ионам тяжелых металлов), поэтому в разных условиях в популяции могут доминировать разные виды микроорганизмов, то есть в зависимости от условий основной вклад в биовыщелачивание сульфидных концентратов могут вносить разные виды микроорганизмов. Таким образом, перед проведением технологических испытаний требуется предварительно проводить лабораторные исследования закономерностей, которые определяют эффективность биовыщелачивания различных типов сырья.

Целью данной работы было изучение процесса биовыщелачивания полиметаллического медно-цинкового концентрата с высоким содержанием мышьяка смешанной культурой умеренно-термофильных микроорганизмов, представителей групп, доминирующих в технологических процессах, в различных условиях для определения влияния

Таблица 1. Физиологические свойства штаммов, использованных при проведении экспериментов

Штамм	Донор электронов	Углеродное питание	Температура, °С (оптимум/верхний предел)
<i>Acidithiobacillus caldus</i> MBC-1	S ⁰	Автотроф	45/53
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> SH-1	Fe ²⁺ , S ⁰	Миксотроф	50/60
<i>Acidiplasma</i> sp. MBA-1	Fe ²⁺ , S ⁰	Гетеротроф	50–55/63

на процесс выщелачивания металлов температуры и присутствия в среде органического источника углерода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектом исследования являлся сульфидный концентрат, содержащий 28% Fe, 16% Cu, 5.3% Zn, 1.36% As, 33.2% сульфидной серы, 2% сульфатной серы и 0.4% элементной серы. Основными минералами концентрата были халькопирит (CuFeS₂), теннантит (Cu₁₂As₄S₁₃), сфалерит (ZnS) и пирит (FeS₂). Концентрат был измельчен до крупности не более 75 мкм.

В работе была использована смешанная культура умеренно-термофильных ацидофильных микроорганизмов, содержащая штаммы *Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH-1 и *Acidiplasma* sp. MBA-1, выделенные ранее из образцов руд и пульпы реакторов биокисления (Булаев и соавт., 2012; Muravyov, Vulaev, 2013). Свойства штаммов представлены в табл. 1. Необходимо отметить, что среди исследованных штаммов все способны к окислению серы, но *A. caldus* MBC-1 является наиболее активным сероокислителем (Елкина и соавт., 2020).

Эксперименты. Для проведения экспериментов была использована жидкая питательная среда, содержащая минеральные соли (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 3.0, KCl – 0.2, MgSO₄ · 7H₂O – 0.5, K₂HPO₄ – 0.5. Чтобы установить начальный pH на уровне 1.5, в среду добавляли 1.5 мл/л концентрированной серной кислоты. Для роста двух исследуемых штаммов (*S. thermosulfidooxidans* SH-1 и *Acidiplasma* sp. MBA-1) необходимо наличие органического источника углерода, поэтому в среду в одном варианте эксперимента вносили органический источник углерода (0.02% (м./об.) дрожжевого экстракта (ДЭ)).

Опыты проводили в колбах со 100 мл питательной среды и 2 г концентрата на ротационной качалке (200 об./мин) в течение 30 сут. Эксперименты проводили при температурах 40, 45, 50, 55 и 60°C. Штаммы во всех экспериментах инокулировали таким образом, чтобы начальная численность каждого микроорганизма составляла примерно 1 × 10⁷ кл/мл.

Для анализа процесса биовыщелачивания отбирали пробы жидкой фазы на 10, 20 и 30 сутки. Во

всех отобранных пробах измеряли pH, окислительно-восстановительный потенциал (Eh), содержание двух- и трехвалентного железа, мышьяка, цинка и меди. Концентрацию ионов железа в среде определяли спектрофотометрически роданидным методом (Резников и соавт., 1970). Содержание мышьяка в среде измеряли с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Содержание цинка и меди измеряли на атомно-абсорбционном спектрометре Perkin Elmer 3100 (США). Измерение данных параметров позволяло судить об активности микроорганизмов. Степень выщелачивания цветных металлов из минералов оценивали по концентрации ионов меди и цинка в среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные в экспериментах по биовыщелачиванию концентрата в разных условиях, представлены на рис. 1–3. Полученные результаты показывают, что присутствие органического источника углерода влияло на процессы биовыщелачивания при разных температурах.

При выщелачивании концентрата в присутствии ДЭ во всех условиях, кроме стерильного контроля, сначала происходило увеличение pH (до 1.74–1.85) (рис. 1а). При 60°C pH на 30 сут постепенно снижался до 1.53 (рис. 1а, кривая 5), тогда как при других температурах pH снижался до значений 1.20–1.31 (рис. 1а, кривые 1–4).

Значения Eh среды при температурах 40–50°C уже на 5 сут эксперимента превысили 800 мВ и на протяжении всего эксперимента составляли 824–878 мВ (рис. 1б, кривые 1–3), тогда как при 55°C значение Eh не превысило 800 мВ и на 30 сут снизилось до 713 мВ (рис. 1б, кривая 4). При 60°C значение Eh было относительно низким (622–671 мВ) (рис. 1а, кривая 5). В контрольном варианте эксперимента Eh практически не изменялся в течение 30 сут эксперимента (рис. 1а, кривая 6).

Закономерности изменения концентрации ионов железа Fe³⁺ и Fe²⁺ в ходе эксперимента (рис. 1в–1д) соответствовали изменениям Eh в процессе эксперимента, так как в процессе окисления сульфидных минералов Eh определяется, прежде всего, соотношением ионов Fe³⁺ и Fe²⁺, которое также отражает активность окисления железа.

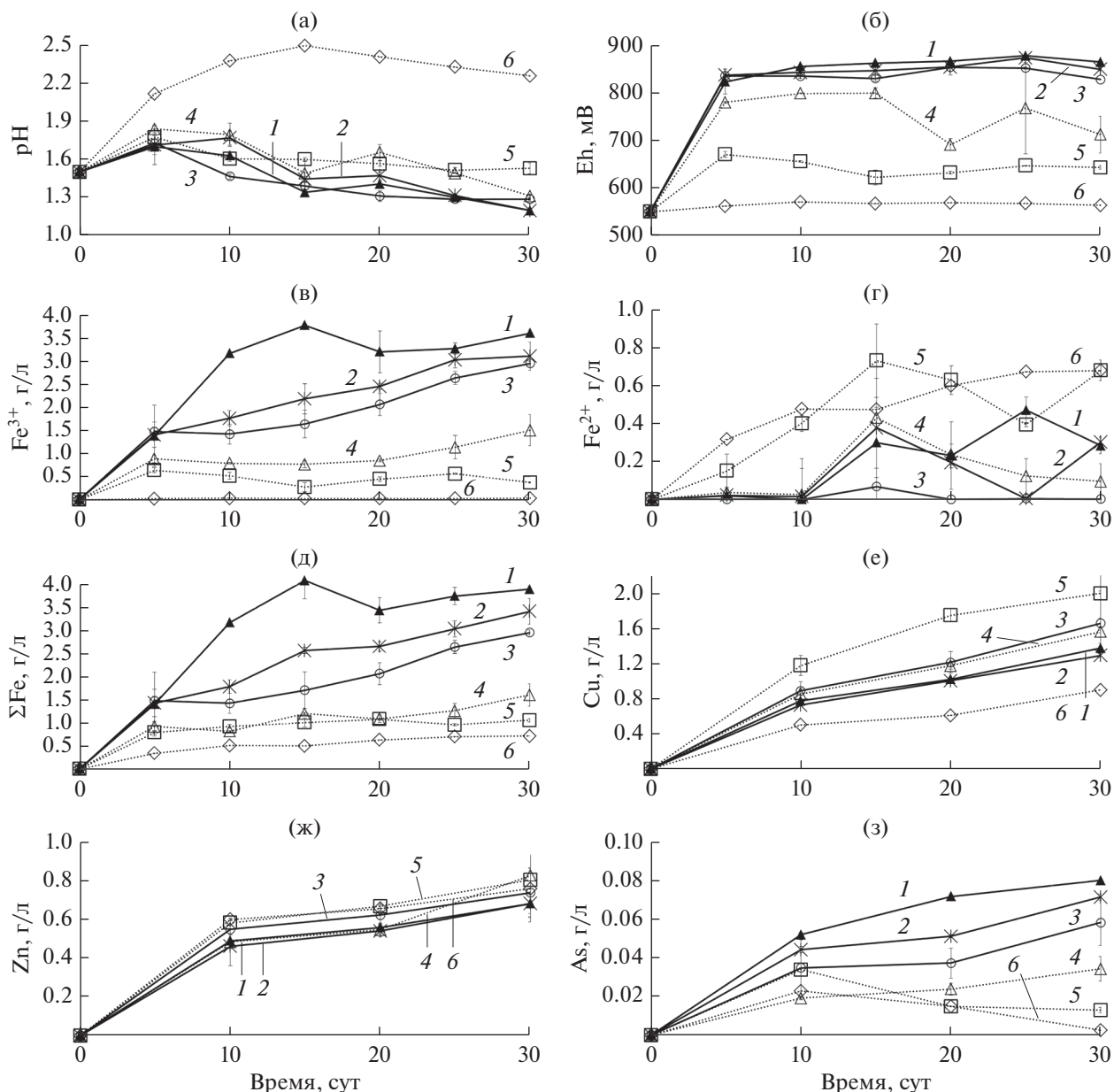


Рис. 1. Изменение параметров среды в процессе биовыщелачивания концентрата микроорганизмами на среде, содержащей 0,02% дрожжевого экстракта, при различных температурах: а – pH среды; б – Eh среды; в – концентрация ионов Fe^{3+} (г/л); г – концентрация ионов Fe^{2+} (г/л); д – суммарная концентрация ионов железа (г/л); е – концентрация меди (г/л); ж – концентрация цинка (г/л); з – концентрация мышьяка (г/л); 1 – 40°C; 2 – 45°C; 3 – 50°C; 4 – 55°C; 5 – 60°C; 6 – 60°C (стерильный контроль).

Наиболее высокими концентрация ионов Fe^{3+} и суммарная концентрация ионов железа были при температуре 40°C (3.60 и 3.88 г/л соответственно на 30 сутки эксперимента) (рис. 1в и 1д, кривая 1), но при температурах 45 и 50°C к концу эксперимента концентрации ионов железа Fe^{3+} были незначительно ниже (2.95 и 3.10 г/л соответственно) (рис. 1в и 1д, кривые 2 и 3). При этом концентрация ионов Fe^{2+} была на порядок ниже, чем ионов Fe^{3+} (рис. 1г, кривые 1–3). Концентрации ионов

Fe^{3+} при 55 и 60°C были в несколько раз ниже, чем при более низких температурах (1.50 и 0.37 г/л соответственно) (рис. 1в, кривые 4 и 5). В контрольном эксперименте концентрации ионов Fe^{3+} были следовыми на протяжении всего эксперимента (рис. 1в, кривая 6). При температуре 60°C концентрации ионов Fe^{2+} были относительно высокими, практически не различались в контрольном эксперименте и в эксперименте с микроорганизмами (0.68 г/л) (рис. 1г, кривые 5 и 6). При 55°C

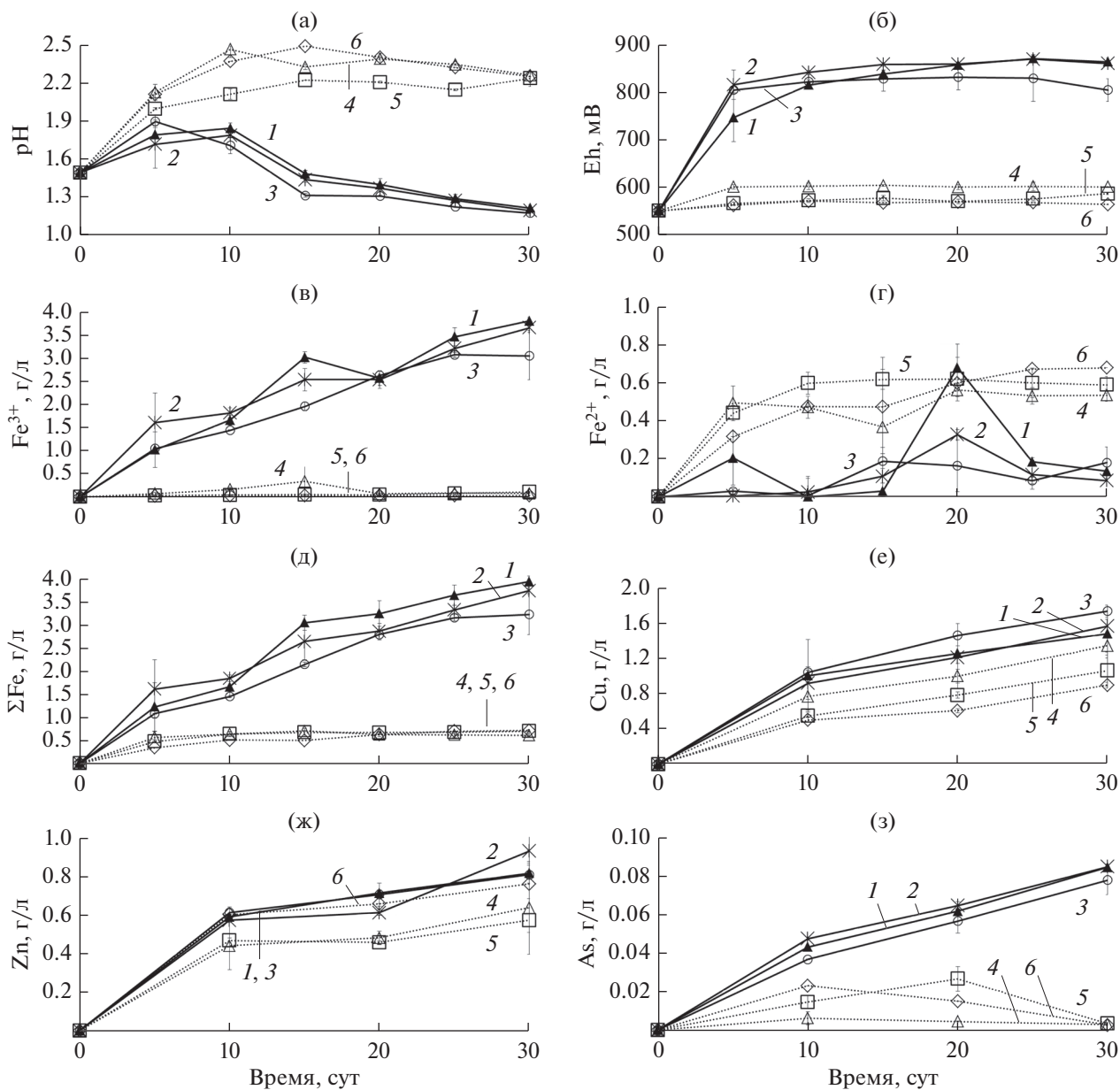


Рис. 2. Изменение параметров среды в процессе биовыщелачивания концентрата микроорганизмами на среде без дрожжевого экстракта при различных температурах: а – pH среды; б – Eh среды; в – концентрация ионов Fe³⁺ (г/л); г – концентрация ионов Fe²⁺ (г/л); д – суммарная концентрация ионов железа (г/л); е – концентрация меди (г/л); ж – концентрация цинка (г/л); з – концентрация мышьяка (г/л); 1 – 40°C; 2 – 45°C; 3 – 50°C; 4 – 55°C; 5 – 60°C; 6 – 60°C (стерильный контроль).

концентрация ионов Fe²⁺ сначала возрастала до 10 сут до 0.81 г/л, но затем постепенно снижалась до 0.10 г/л к концу эксперимента (рис. 1г, кривая 4). Таким образом, при температурах 40–50°C биоокисление сульфидных минералов, содержащих железо, происходило, очевидно, более активно, чем при более высоких температурах, что может быть вызвано снижением активности микроорганизмов при высоких температурах.

На рис. 1е и 1ж показаны изменения концентраций меди и цинка в среде. Тогда как концентрации ионов цинка при разных температурах практически не различались (на 30 сут эксперимента они достигали 0.68–0.83 г/л) и были достаточно высокими и в стерильном контроле (рис. 1ж, кривые 1–6), концентрация меди различалась в разных вариантах эксперимента достаточно значительно (от 0.90 г/л в стерильном контроле до 2.00 г/л при 60°C (рис. 1е, кривые 1–6).

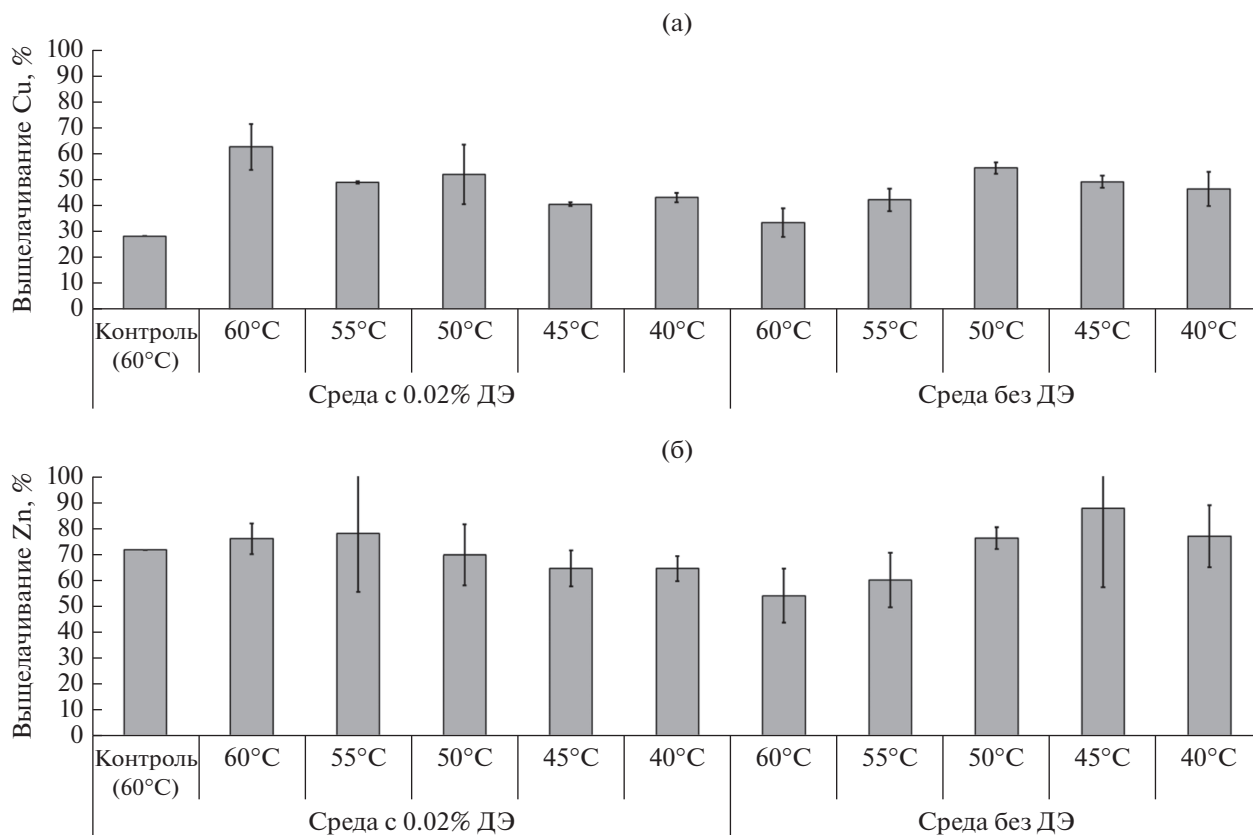


Рис. 3. Извлечение меди (а) и цинка (б) из концентрата после 30 сут биовыщелачивания (%).

В результате выщелачивания концентрата в течение 30 сут было извлечено в раствор от 64% (при 40 и 45°C) до 78% цинка (при 55°C) (рис. 3). При 60°C в стерильном контроле и в эксперименте с микробной культурой было выщелочено 72 и 76% цинка.

Степень выщелачивания меди в разных условиях заметно различалась и в значительной степени зависела от температуры (рис. 3). Наиболее высокой степень выщелачивания была при 60°C (63%), при этом в стерильном контроле она была ниже, чем в других вариантах эксперимента (28%). При 50 и 55°C степени выщелачивания различались слабо (52 и 49%), также как при 40 и 45°C (43 и 40%).

Таким образом, процесс выщелачивания меди, в отличие от выщелачивания цинка из сфалерита, в значительной степени зависел и от активности микроорганизмов. Это может быть обусловлено тем фактом, что сфалерит относительно легко подвергается выщелачиванию, в том числе биологическому и кислотному, поэтому при относительно высоких температурах процесс выщелачивания цинка мог в меньшей степени быть обусловлен активностью микроорганизмов и в какой-то степени происходить за счет химического выщелачивания при низких рН. При этом

минералы меди относительно устойчивы к выщелачиванию, и поэтому выщелачивание меди в большей степени могло зависеть как от температуры, так и от активности микроорганизмов (Jyothi et al., 1989; Schippers, Sand, 1999; Mahmoud et al., 2017).

Степень выщелачивания мышьяка зависела от температуры (рис. 1з) и была самой высокой при 40°C (около 30%) (рис. 1з, кривая 1), снижаясь с повышением температуры (при 60°C после 30 сут выщелачивания она составила около 5%) (рис. 1з, кривая 5). Это указывает на то, что при высоких температурах, при которых степень выщелачивания мышьяка была наиболее высокой, выщелачивание меди было обусловлено, главным образом, выщелачиванием халькопирита. Ранее было продемонстрировано, что биовыщелачивание халькопирита в большой степени зависит от температуры и ускоряется при ее повышении (Rodriguez et al., 2003; Liu et al., 2017), тогда как процесс биовыщелачивания теннантита может в меньшей степени зависеть от температуры по сравнению с халькопиритом (Елкина и соавт., 2020).

Таким образом, было показано, что температура, вероятно, оказывала различное влияние на выщелачивание разных сульфидных минералов, содержащихся в концентрате, а наиболее высокая

степень выщелачивания меди была достигнута при наиболее высокой температуре.

На рис. 2 и 3 показаны результаты экспериментов по биовыщелачиванию концентрата с использованием среды, не содержащей органического источника углерода (ДЭ), который могут потреблять миксотрофные железоокисляющие микроорганизмы, использованные в данной работе. Нужно отметить, что процесс биовыщелачивания концентрата с использованием среды без ДЭ в значительной степени зависел от температуры и ингибировался при высоких температурах в более значительной степени, чем в экспериментах со средой, содержащей органический источник углерода.

Было показано, что в отличие от экспериментов со средой, содержащей ДЭ, в экспериментах в автотрофных условиях рН снижался только при температурах 40–50°C (до значений около 1.20) (рис. 2а, кривые 1–3), тогда как при температурах 55–60°C (рис. 2а, кривые 4 и 5) и в стерильном контроле он возрастал в ходе выщелачивания до значений около 2.26 (рис. 2а, кривая 6).

Значения Eh среды в автотрофных условиях при температурах 40–50°C на 10 сут эксперимента превысили 800 мВ и на протяжении всего эксперимента составляли 805–872 мВ (рис. 2б, кривые 1–3), также как в экспериментах со средой, содержащей ДЭ (рис. 1б). При 55°C значения Eh в течение всего эксперимента составляли около 600 мВ и, таким образом, были намного ниже, чем в эксперименте со средой с ДЭ (рис. 2б, кривая 4). При 60°C как в контрольном эксперименте, так и эксперименте с микробной культурой значения Eh практически не изменялись за 30 сут эксперимента и составляли 562–586 мВ (рис. 2б, кривые 5 и 6).

Изменения концентрации ионов железа Fe^{3+} и Fe^{2+} в ходе эксперимента показаны на рис. 2в–2д. Концентрации ионов Fe^{3+} и суммарные концентрации ионов железа были наиболее высокими при температурах 40 и 45°C (3.81 и 3.66 г/л Fe^{3+} и 3.95 и 3.75 г/л суммарного железа на 30 сут эксперимента соответственно) (рис. 2в и 2д, кривые 1 и 2), а при температуре 50°C к концу эксперимента концентрации ионов Fe^{3+} и суммарная концентрация ионов железа были ненамного ниже (3.05 и 3.23 г/л на 30 сут эксперимента соответственно) (рис. 2в и 2д, кривая 3). Таким образом, концентрации ионов железа при температурах 40–50°C в экспериментах со средой, содержащей ДЭ, и средой без ДЭ отличались в достаточно малой степени (рис. 1в–1д и рис. 2в–2д). Нужно отметить, что при температурах 55–60°C концентрации ионов Fe^{3+} были очень низкими и фактически не превышали значительно концентрацию ионов трехвалентного железа в контрольном варианте эксперимента (рис. 2в, кривые 4–6). Следовательно, при температурах 40–50°C биоокисление суль-

фидных минералов, содержащих железо, в эксперименте со средой без ДЭ происходило фактически с той же скоростью, что и в эксперименте со средой, содержащей органический источник углерода. При этом при температурах 55–60°C окисление железа происходило с крайне низкой скоростью, а железо в среде находилось, в основном, в форме ионов Fe^{2+} , что, очевидно, было обусловлено частичным химическим выщелачиванием сульфидных минералов в среде с низким рН (рис. 2г, кривые 4–6).

На рис. 2е и 2ж показаны изменения концентрации меди и цинка в среде в процессе выщелачивания. Концентрации меди в среде при разных температурах различались к концу эксперимента (от 0.90 г/л в стерильном контроле до 1.74 г/л при 50°C) (рис. 2е, кривые 1–6). В экспериментах со средой без ДЭ степень выщелачивания меди была наибольшей при 50°C и составила 54% (рис. 3). Несколько ниже была степень выщелачивания меди при температурах 40 и 45°C (46 и 49% соответственно), а при температурах 55 и 60°C степень выщелачивания меди была еще ниже (42 и 33%). При 60°C степень выщелачивания была ненамного выше, чем в стерильном контроле (28%). Таким образом, зависимость выщелачивания меди от температуры в экспериментах со средой без ДЭ отличалась от таковой, выявленной в экспериментах со средой с ДЭ. Тогда как при наличии в среде ДЭ степень выщелачивания меди возрастала с температурой, в экспериментах со средой без ДЭ степень выщелачивания меди при температурах выше 50°C в значительной степени снижалась. Степень выщелачивания цинка была максимальной при 45°C (88%). При этом при температурах 40–50°C степень выщелачивания была выше, чем в соответствующих экспериментах со средой, содержащей ДЭ. При 55 и 60°C степень выщелачивания была ниже (60 и 54% соответственно), чем при более низких температурах, и несколько ниже, чем в контрольном эксперименте.

Степень выщелачивания мышьяка (рис. 2з) при температурах 40–50°C была практически одинаковой (около 29–31%) (рис. 2з, кривые 1–3), при этом снижаясь с повышением температуры (после 30 сут выщелачивания она составила около 1% при 55 и 60°C) (рис. 2з, кривые 4 и 5). Таким образом, закономерности зависимости для выщелачивания мышьяка от температуры оказались такими же, как и для цветных металлов.

Результаты данной работы показывают, что процесс выщелачивания минералов, входящих в состав сульфидного концентрата, зависел от условий процесса, при этом характер зависимости определялся комбинацией факторов. Так, выщелачивание меди возрастало с увеличением температуры, а выщелачивание цинка зависело от температуры в

меньшей степени. При этом в присутствии органического источника углерода в среде биовыщелачивание и меди, и цинка происходило активно при высоких температурах (55 и 60°C), тогда как в экспериментах со средой без ДЭ активность выщелачивания цветных металлов из концентрата при данных температурах была гораздо ниже. В то же время при температурах 40–50°C активность выщелачивания в меньшей степени зависела от присутствия в среде органического источника углерода. Это может быть объяснено особенностями физиологических свойств микроорганизмов смешанной культуры, которая использовалась в экспериментах, и взаимодействиями между ними, которые играют важную роль в процессах биовыщелачивания и в значительной степени определяют их скорость и эффективность (Кондратьева и соавт., 2015). Известно, что в микробных популяциях, осуществляющих окисление сульфидных минералов как в природных местах обитания, так и в условиях промышленных процессов (реакторы и кучи биоовыщелачивания), присутствуют как автотрофные микроорганизмы, так и миксо- и гетеротрофы (Gonzalez-Toril et al., 2003; Druschel et al., 2004; Morin, d'Hugues, 2007; van Hille et al., 2011; Кондратьева и соавт., 2015; Bulaev et al., 2017). Благодаря различиям в углеродном метаболизме между микроорганизмами, окисляющими сульфидные минералы, в микробных популяциях между автотрофами и миксо- и гетеротрофами возникают трофические связи, так как автотрофы, способные расти в отсутствие органического источника углерода, продуцируют в том числе экзометаболиты, которые могут потребляться миксо- и гетеротрофами (Gonzalez-Toril et al., 2003; Nancucheo, Johnson, 2010).

В данной работе в смешанной культуре присутствовали штаммы родов *Sulfobacillus* и *Acidiplasma*, которые нуждаются в органическом источнике углерода для роста (Кондратьева и соавт., 2015), а также штамм *A. caldus*, являющийся автотрофом. Так как данный штамм неактивен при температуре выше 53°C, при высоких температурах активность штаммов, нуждающихся в органическом источнике углерода и способных к окислению сульфидных минералов при высоких температурах, полностью зависела от наличия в среде ДЭ.

Кроме того, было установлено, что выщелачивание разных минералов, входящих в состав концентрата, в разной степени зависело от факторов, влияющих на активность штаммов микроорганизмов, что определяется их строением, электрохимическими свойствами и интермедиатами, которые образуются в процессе окисления (Jyothi et al., 1989; Rodriguez et al., 2003; Liu et al., 2017).

Результаты исследований по биовыщелачиванию сульфидных минералов и концентратов в лабораторных условиях, в том числе в данной работе,

могут быть использованы для разработки подходов, позволяющих оптимизировать существующие биогидрометаллургические технологии. В данной работе показано, что разные минералы, входящие в состав исследованного концентрата, наиболее активно окислялись при разных условиях, при этом медь из халькопирита наиболее активно выщелачивалась в условиях, в которых активность культуры зависела от присутствия органического источника углерода (высокая температура), а цинк и мышьяк из сфалерита и теннантита активнее выщелачивались при более низких температурах, при которых не требовалось внесение в среду дополнительных источников углерода. Таким образом, на основании полученных данных можно разработать подходы, которые могут обеспечить максимальное извлечение металлов и обеспечить достаточно высокую активность микроорганизмов. Например, в одной из работ была предложена технологическая схема, предполагающая ведение непрерывного процесса биоокисления упорных золотосодержащих пиритно-арсенопиритных концентратов в переменном температурном режиме (Меламуд и соавт., 1999). Согласно этой схеме, первый этап окисления осуществлялся при температуре 30°C автотрофными мезофильными бактериями *A. ferrooxidans*, а второй этап – при 42 и 50°C миксотрофными умеренно-термофильными бактериями *S. thermosulfidooxidans*. При этом скорость окисления сульфидных минералов увеличивалась по сравнению с мезофильными условиями в несколько раз за счет стимуляции роста сульфобацилл, проводящих процесс биоокисления с большей скоростью. Такая технологическая схема может быть использована для проведения процессов окисления сырья, содержащего упорные минералы, для которых может потребоваться высокая температура, так как можно стабилизировать процесс биоокисления концентрата при таких температурах за счет снабжения умеренно-термофильных миксотрофных микроорганизмов источниками органического углерода, выделенными автотрофными микроорганизмами на первой стадии при более низкой температуре.

Результаты данной работы могут служить научной основой для разработок новой биогидрометаллургической технологии, основанной на биовыщелачивании с переменным температурным режимом. Переменный температурный режим может обеспечить постадийную смену доминирующих в процессе микроорганизмов. Первая низкотемпературная стадия обеспечит активный рост автотрофных микроорганизмов и выщелачивание некоторых сульфидных минералов. В свою очередь, рост автотрофных микроорганизмов на первой стадии обеспечит продуцируемыми экзометаболитами активность миксо- и гетеротрофных микроорганизмов на следующих стадиях, что позволит выщелачивать более упорные сульфид-

ные минералы при высокой температуре. Таким образом, полученные результаты могут быть использованы для проведения дальнейших технологических исследований с целью оптимизации биогидрометаллургических технологий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было выполнено при поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-6639.2018.8.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Булаев А.Г., Першина Е.В., Украинцев И.В. Состояние развития современных биогидрометаллургических технологий и перспективы их использования в России // Цветные металлы. 2016. № 10. С. 29–35.
- Булаев А.Г., Пивоварова Т.А., Кузнецов Б.Б., Колганова Т.В., Кондратьева Т.Ф. Скорость окисления сульфидных минералов сообществами ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов из разных мест обитания // Микробиология. 2012. Т. 81. № 4. С. 434–442.
- Bulaev A.G., Pivovarova T.A., Kuznetsov B.B., Kolganova T.V., Kondrat'eva T.F. Rates of sulfide mineral oxidation by acidophilic chemolithotrophic microbial communities from various sources // Microbiology. 2012. V. 81. № 4. P. 397–404.
- Елкина Ю.А., Мельникова Е.А., Меламуд В.С., Булаева А.Г. Биовыщелачивание теннантита и энаргита умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами // Микробиология. 2020. Т. 89. № 4. P. 419–431.
- Elkina Yu.A., Melnikova E.A., Melamud V.S., Bulaev A.G. Bioleaching of enargite and tennantite by moderately thermophilic acidophilic microorganisms // Microbiology. V. 89. № 4. P. 413–424.
- Кондратьева Т.Ф., Булаев А.Г., Муравьев М.И. Микроорганизмы в биогидрометаллургии переработки сульфидных руд. М.: Наука, 2015. 212 с.
- Меламуд В.С., Пивоварова Т.А., Кондратьева Т.Ф., Каравайко Г.И. Изучение процесса бактериального окисления золотосодержащего пиритно-арсенопиритного концентрата в умеренно термофильных условиях // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 2. С. 182–189.
- Melamud V.S., Pivovarova T.A., Kondrat'eva T.F., Karavaiko G.I. Study of oxidation by bacteria of a difficult-to-dress gold-containing pyrite-arsenopyrite concentrate under moderately thermophilic conditions // Applied Biochemistry and Microbiology. 1999. V. 35. № 2. P. 161–167.
- Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. 140 с.
- Baba A.A., Ayinla K.I., Adekola F.A., Ghosh M.K., Ayanda O.S., Bale R.B., Sheik A.R., Pradhan S.R. A review on novel techniques for chalcopyrite ore processing // International J. Mining Engineering and Mineral Processing. 2012. V. 1(1). P. 1–16.
- Bulaev A., Belyi A., Panyushkina A., Solopova N., Pivovarova T. Microbial population of industrial biooxidation reactors // Solid State Phenomena. 2017. V. 262. P. 48–52.
- Diaz J.A., Serrano J., Leiva E. Bioleaching of arsenic-bearing copper ores // Minerals. 2018. V. 8. № 5. P. 215.
- Dopson M., Lindstrom E.B. Analysis of community composition during moderately thermophilic bioleaching of pyrite, arsenical pyrite, and chalcopyrite // Microb. Ecol. 2004. V. 48. № 1. P. 19–28.
- Druschel G.K., Baker B.J., Gihring T.H., Banfield J.F. Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California // Geochem. Trans. 2004. V. 5. № 2. P. 13–32.
- Filippou D., St-Germain P., Grammatikopoulos T. Recovery of metal values from copper – arsenic minerals and other related resources // Miner. Process Extr. Metall. Rev. 2007. V. 28. № 4. P. 247–298.
- Gentina J.C., Acevedo F. Application of bioleaching to copper mining in Chile // Electron. J. Biotechnol. 2013. V. 16. № 3. P. 16.
- Gericke M., Neale J.W., Van Staden P.J. A Mintek perspective of the past 25 years in minerals bioleaching // J. S. Afr. Inst. Mining and Met. 2009. V. 109. P. 567–585.
- Gonzalez-Toril E., Llobet-Brossa E., Casamayor E.O., Amann R., Amils R. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 4853–4865.
- Johnson D.B. Biomining – biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials // Curr. Opin. Biotechnol. 2014. V. 30. P. 24–31.
- Jyothi N., Sudha K.N., Natarajan K.A. Electrochemical aspects of selective bioleaching of sphalerite and chalcopyrite from mixed sulphides // Int. J. Miner. Process. 1989. V. 27. P. 189–203.
- Liu H., Xia J., Nie Z., Liu L., Wang L., Ma C., Zheng L., Zhao Y., Wen W. Comparative study of S, Fe and Cu speciation transformation during chalcopyrite bioleaching by mixed mesophiles and mixed thermophiles // Miner. Eng. 2017. V. 106. P. 22–32.
- Mahmoud A., Cezac P., Hoadley A.F.A., Contaminea F., D'Hugues P. A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors // International Biodegradation & Biodegradation. 2017. V. 119. P. 118–146.
- Marsden J.O., House C.I. The Chemistry of Gold Extraction. 2nd ed. Littleton: Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc., 2006. 625 p.
- Morin D.H.R., d'Hugues P. Bioleaching of a cobalt containing pyrite in stirred reactors: a case study from laboratory scale to industrial application // Biomining / Eds. Rawlings D.E., Johnson B.D. Berlin: Springer, 2007. P. 35–55.
- Munoz J.A., Blazquez M.L., Gonzalez F., Ballester A., Acevedo F., Gentina J.C., Gonzalez P. Electrochemical study of enargite bioleaching by mesophilic and thermophilic microorganisms // Hydrometallurgy. 2006. V. 84. P. 175–186.

Muravyov M.I., Bulaev A.G. Two-step oxidation of a refractory gold-bearing sulfidic concentrate and the effect of organic nutrients on its biooxidation // *Minerals Engineering*. 2013. V. 45. P. 108–114.

Nancuqueo I., Johnson D.B. Production of glycolic acid by chemolithotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacteria and its role in delineating and sustaining acidophilic sulfide mineral-oxidizing consortia // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 2. P. 461–467.

Neale J., Seppala J., Laukka A., van Aswegen P., Barnett S., Gericke M. The MONDO minerals nickel sulfide bioleach project: from test work to early plant operation // *Solid State Phenomena*. 2017. V. 262. P. 28–32.

26. Okibe N., Gericke M., Hallberg K.B., Johnson D.B. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 4. P. 1936–1943.

Pietrzyk S., Tora B. Trends in global copper mining – a review // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2018. V. 427. 012002.

Rawlings D.E., Coram N.J., Gardner M.N., Deane S.M. *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are

widely distributed in continuous flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal containing ores and concentrates // *Process Metallurgy*. Elsevier, 1999. V. 9. P. 777–786.

Rodriguez Y., Ballester B., Blazquez M.L., Gonzalez F., Munoz J.A. New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature // *Hydrometallurgy*. 2003. V. 71. № 1–2. P. 47–56.

Schippers A., Sand W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. № 1. P. 319–321.

van Hille R.P., van Wyk N., Harrison S.T.L. Review of the microbial ecology of BIOX® reactors illustrate the dominance of the genus *Ferroplasma* in many commercial reactors // *Biohydrometallurgy: Biotech Key to Unlock Minerals Resources Value*. Changsha: Central South University Press, 2011. P. 1021.

Watling H.R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review // *Hydrometallurgy*. 2006. V. 84. № 1–2. P. 81–108.

World Copper Factbook 2017, International Copper Study Group, Lisbon, Portugal.

Bioleaching of a Copper-Zinc Concentrate with High Arsenic Content

Yu. A. Elkina^{1,2}, V. S. Melamud², and A. G. Bulaev^{1,2,*}

¹*Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119192 Russia*

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

*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Received January 22, 2020; revised July 8, 2020; accepted July 16, 2020

Abstract—The goal of the present work was to study the dependence of the rate of copper and zinc bioleaching from an arsenic-containing copper-zinc concentrate containing 16% Cu, 5.3% Zn, and 1.36% As, on the temperature and the presence of an organic carbon source (yeast extract) in the medium. The main minerals of the concentrate were chalcopyrite (CuFeS₂), tennantite (Cu₁₂As₄S₁₃), sphalerite (ZnS), and pyrite (FeS₂). A mixed culture of moderately thermophilic acidophilic microorganisms oxidizing sulfur and ferrous iron, which was used in the work, consisted of the strains *Acidithiobacillus caldus* MBC-1, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* SH-1, and *Acidiplasma* sp. MBA-1. The experiments were carried out in flasks with 100 mL of mineral medium and 2 g of the concentrate on a rotary shaker for 30 days at temperatures from 40 to 60°C. It was shown that the leaching rate of copper depended both on temperature and on the presence of yeast extract. Copper leaching rate increased with increasing temperature, while zinc leaching was less dependent on the temperature. In the presence of an organic carbon source in the medium, both copper and zinc were actively leached at high temperatures (55 and 60°C), while in experiments with a medium without yeast extract, the activity of non-ferrous metals leaching from the concentrate at these temperatures was much lower. At the same time, at temperatures of 40–50°C, leaching activity was less dependent on the presence of the organic carbon source in the medium.

Keywords: biohydrometallurgy, acidophilic microorganisms, chalcopyrite, tennantite, sulfide polymetallic concentrates

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТАТ-ГИДРОЛИЗУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ РОДА *PANTOEA* НА ОСНОВЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА¹

© 2021 г. А. Д. Сулейманова^а, *, Д. Л. Иткина^а, Д. С. Пудова^а, М. Р. Шарипова^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: aliya.kzn@gmail.com

Поступила в редакцию 03.05.2020 г.

После доработки 21.08.2020 г.

Принята к публикации 28.08.2020 г.

В связи с гомологичной рекомбинацией, которая может нарушать границы видов, точная идентификация бактерий рода *Pantoea* тяжело достижима. В настоящее время в определении видов бактерий максимально эффективным является комплексный подход. Биохимическая идентификация с помощью системы API20E, филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК и MLSA анализ на основе частичных последовательностей генов *fusA*, *pyrG*, *leuS*, *gyrB* и *rpoB* показал, что выделенные почвенные фитат-гидролизующие штаммы являются членами рода *Pantoea*, а именно вида *Pantoea brenneri*. Изучение способности штаммов к фиксации атмосферного азота позволило отнести их к диазотрофам.

Ключевые слова: *Pantoea*, идентификация, MLSA, API20E, фиксация азот

DOI: 10.31857/S0026365621010122

Род *Pantoea* был впервые описан французским ученым Gavini et al. (1989) и состоял из двух видов — *Pantoea agglomerans* sp. nov. и *Pantoea dispersa* sp. nov. На сегодняшний день род представлен 29 видами (<http://www.bacterio.net/pantoea.html>). Представители рода *Pantoea* выделяются из различных сред обитания, таких как почва, вода, продукты питания, растения, животные и люди (Chen et al., 2017). Одни из первых изолятов были признаны патогенами растений, вызывающими галлы, увядание, мягкую гниль и некрозы ряда сельскохозяйственных культур (Brady et al., 2008; Herrera et al., 2008). Другие же изоляты *Pantoea*, напротив, продуцируют антимикробные соединения и широко используются в качестве коммерческих био-препаратов (Johnson et al., 1993). Например, бактерии вида *P. ananatis* обладают способностью разлагать гербициды без образования токсичных побочных продуктов и могут найти применение в биоремедиации почв (Pileggi et al., 2012). Вид *P. agglomerans* был первоначально идентифицирован как возбудитель болезней у широкого круга растений, однако многие штаммы, принадлежащие к этому виду, напротив, проявляют свойства, способствующие росту и развитию растений и

биоконтролю над фитопатогенами (Dutkiewicz et al., 2016). Повсеместность, универсальность и генетическая пластичность изолятов *Pantoea* делают этот род идеальной группой не только для изучения характерных для нее процессов адаптации и оппортунизма, но и для разработки коммерческих продуктов с целью применения их в медицине и сельском хозяйстве (Walterson, Stavrinides, 2015).

Филогенетический анализ и сравнение с другими родами семейства *Erwiniaceae* показал, что род *Pantoea* весьма разнообразен. Биохимическая гетерогенность внутри рода усложняет идентификацию штаммов до вида. Точная идентификация бактерий рода *Pantoea* тяжело достижима, особенно учитывая тот факт, что гомологичная рекомбинация и латеральный перенос генов могут нарушать границы видов. В настоящее время в определении видов бактерий используется комплексный подход, включающий в себя как геномные, так и фенотипические характеристики штаммов (Deletoile et al., 2009).

Использование 16S рРНК является важным инструментом для классификации и систематики представителей рода *Pantoea*. Однако последовательности генов 16S рРНК демонстрируют низкое разрешение на внутривидовом уровне (Gonzalez et al., 2013), что делает невозможной надежную идентификацию бактерий до видов и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621010122 для авторизованных пользователей.

подвидов. Таким образом, определение вида новых штаммов требует проведения более точного анализа, с использованием улучшенных таксономических методов, таких как мультилокусный филогенетический анализ (MLSA) (Gevers et al., 2005). В настоящее время определение видов бактерий основано на анализе мультилокусных последовательностей генов домашнего хозяйства, таких как *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB* и *rpoB*, которые регулярно используются для уточнения межвидовых филогенетических позиций видов из рода *Pantoea* (Brady et al., 2008; Deletoile et al., 2009; Palmer et al., 2017; Tambong, 2019) Установлено, что подход MLSA, основанный на шести генах (*leuS*, *fusA*, *gyrB*, *pyrG*, *rpoB* и *rplB*), обеспечивает надежное разграничение видов у рода *Pantoea* (Tambong, 2019). Кроме того, анализ MLSA повышает качество филогенетической реконструкции и сводит к минимуму вес событий рекомбинации (Deletoile et al., 2009).

В данной работе мы сообщаем о таксономической характеристике выделенных нами штаммов *Pantoea* sp. 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1 с использованием полифазного подхода, включающего в себя фенотипические, генотипические и филогенетические данные. Оценивается способность штаммов к фиксации молекулярного азота, которая, вкуче с установленной ранее фитат-гидролизующей активностью, может способствовать росту и развитию растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, питательные среды и условия культивирования. Все исследуемые бактерии были выделены из образцов почвы Республики Татарстан в 2009 г. по признаку максимальной фитат-гидролизующей активности (Suleimanova et al., 2015). Отбор штаммов производили на агаризованной среде PSM (phytase-screening medium), которая содержит фитат кальция в качестве единственного источника фосфора. С помощью ряда биохимических тестов штаммы были отнесены к порядку *Enterobacteriales*, а анализ последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, позволил идентифицировать изоляты как *Pantoea* sp. 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1. Видовую принадлежность установить не удалось.

Для культивирования бактерий использовали среду LB (Лурия–Бертони) (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 5.0. Бактерии культивировали в термостате-шейкере фирмы “KA@KS 4000” (Германия) при 37°C и интенсивности качания 200 об./мин. Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре iMark™ (“Bio-Rad”, США) при длине волны 590 нм.

Биохимические тесты проводили с использованием метода API (Analytical Profile Index) 20E

“bioMerieux” (Франция). Стрипы API 20E использовали в соответствии с инструкцией производителя (“bioMerieux”). Все тесты были проведены в трех биологических повторностях. Профили аналитических индексов были установлены через 24 и 48 ч инкубации при 37°C. Идентификация проводилась с использованием базы данных Биохимической идентификации “ABIS” (https://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html).

Аmplификация, очистка и секвенирование ДНК. Для амплификации и секвенирования внутренних участков шести генов домашнего хозяйства *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*, гена, кодирующего 16S rRNA и гена *repA* (с плазмиды патогенности) использовали праймеры, представленные в табл. 1 по протоколу, описанному в работе Deletoile et al. (2009). Олигонуклеотиды были синтезированы в компании “Евроген” (Москва).

Для ПЦР-амплификации использовали DreamTaq ДНК-полимеразу “Thermo Scientific™” (США) (5 ед./мкл) – 0.08 мкл; 10× DreamTaq буфер (с добавлением 20 mM MgCl₂) – 1.5 мкл; праймеры (5 мкМ) – 0.5 мкл; смесь dNTP (10 mM) – 0.5 мкл; безнуклеазную воду “Invitrogen™” (США) – 6.92 мкл. В качестве ДНК-матрицы использовали ресуспендированные в стерильной дистиллированной воде колонии свежей 18 ч культуры бактерий, выращенной при 37°C на агаризованной среде LB. ПЦР-амплификацию проводили с помощью амплификатора “T100™ Thermal Cycler Bio-Rad” (США), условия проведения реакций представлены в табл. 1. Полученные продукты очищали с помощью набора для очистки продуктов ПЦР GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Scientific™”, США). Секвенирование полученных ПЦР-продуктов проводили на секвенаторе SOLiD xl 5500 Wildfire (“Life Technologies”, США) Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ.

Мультилокусный филогенетический анализ. Первичный анализ полученных последовательностей проводили с использованием программы BLAST сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Конкатенированные последовательности генов сравнивали с таковыми у типовых штаммов рода *Pantoea*, которые указаны в базе данных BacDive (<https://bacdive.dsmz.de/>). Филогенетический анализ исследуемых штаммов проводили в программе MEGA7 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904>). Всего в исследовании использовали последовательности генов 55 представителей рода *Pantoea*, которые были загружены из базы данных GenBank NCBI (табл. S1). Множественное выравнивание последовательностей было выполнено, используя программу ClustalW (Thompson et al., 1994). Выровненные последовательности генов использовались для построения филогенетического дерева по методу максимального прав-

Таблица 1. Праймеры и условия, используемые для амплификации и секвенирования

Ген	Праймер	Программа ПЦР	Последовательность (5'–3')	Размер п.о.	Назначение праймеров
16S rRNA	27 F	94°C – 4 мин	GAGTTTGATCCTG	633	Амплификация
	1492 R	94°C – 1 мин 49°C – 1 мин 72°C – 1 мин (35 циклов); 72°C – 7 мин	TACCTTGTTACGACT		Реамплификация
<i>repA</i>	Rep23220_5	94°C – 4 мин	TACATCACACCAAAATTAAT		Амплификация
	Rep25101_3	94°C – 30 с 45°C – 30 с 72°C – 1 мин (30 циклов); 72°C – 5 мин	ATACTGTTAATGTAGTGATA		Реамплификация
<i>gyrB</i>	gyrB3	94°C – 2 мин 94°C – 1 мин 60°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (10 циклов);	GCG TAA GCG CCC GGG TAT GTA	417	Амплификация
	gyrB4		CCG TCG ACG TCC GCA TCG GTC AT		Реамплификация
	gyrB3i		AAC GCW ATC GAC GAA GC		Амплификация, секвенирование
	gyrB4i		TGG AAV CCR TCR TTC CAC		Реамплификация, секвенирование
<i>leuS</i>	leuS3	94°C – 1 мин, 60°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (10 циклов);	CAG ACC GTG CTG GCC AAC GAR CAR GT	642	Амплификация
	leuS4		CGG CGC GCC CCA RTA RCG CT		Реамплификация
<i>fusA</i>	fusA3	94°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (21 цикл); 72°C – 5 мин	CAT CGG TAT CAG TGC KCA CAT CGA	633	Амплификация
	fusA4		CAG CAT CGC CTG AAC RCC TTT GTT		Реамплификация
<i>pyrG</i>	pyrG3		GGG GTC GTA TCC TCT CTG GGT AAA GG	306	Амплификация
	pyrG4		GGA ACG GCA GGG ATT CGA TAT CNC СКА		Реамплификация
<i>rplB</i>	rplB3		CAG TTG TTG AAC GTC TTG AGT ACG ATC C	333	Амплификация
	rplB4		CAC CAC CAC CAT GYG GGT GRT C		Реамплификация
<i>rpoB</i>	Vic3	94°C – 4 мин 94°C – 30 с 50°C – 30 с 72°C – 30 с (30 циклов); 72°C – 5 мин	GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA	501	Амплификация
	Vic4		GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC		Реамплификация

доподобия (ML), основанного на Общей Обратимой модели времени (GTR), и по методу присоединения соседей (NJ), с использованием модели замен Jukes–Cantor (JC). Показатель достоверности порядка ветвления для деревьев ML и NJ оценивали с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указывали в узлах ветвей в виде процентов, при этом оставляя значения досто-

верности свыше 70%. Последовательности генов *fusA*, *leuS*, *pyrG*, *gyrB*, *rplB* и *rpoB* всех четырех штаммов были депонированы в базу данных GenBank NCBI под номерами: для гена *fusA* – MT415378, MT415382, MT415386, MT415390; *leuS* – MT415379, MT415383, MT415387, MT415391; *pyrG* – MT415380, MT415384, MT415388, MT415392; *rpoB* – MT415381, MT415385, MT415389, MT415393;

gyrB – МТ646765, МТ646766, МТ646767, МТ646768;
rplB – МТ646769, МТ646770, МТ646771, МТ646772.

Способность штаммов к фиксации атмосферного азота. Для установления азотфиксирующей способности изолятов использовали селективную питательную среду Эшби (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 – 0.1; KH_2PO_4 – 0.4; $MgSO_4$ – 0.2; $NaCl$ – 0.1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.08, $CaCl_2$ – 0.02; $FeCl_3$ – 0.01; Na_2MoO_4 – 0.002; сахароза – 20; pH 6.9 (Subba, 1977). Питательная среда Эшби не содержит в себе источника азота, поэтому только бактерии, обладающие способностью фиксировать азот из атмосферы, образуют колонии на данной среде. Изоляты инкубировали при 37°C в течение 24 ч, затем оценивали рост микроорганизмов.

Исследовали накопление биомассы бактериями на жидкой среде Эшби. Посевным материалом служил предварительно выращенный на среде Эшби инокулят исследуемых штаммов. Для посева использовали 2% инокулята и вносили в стерильную среду. Культивирование проводили на качалке при 37°C и 200 об./мин в течение 44 ч. Плотность клеток измеряли на спектрофотометре iMark™ (“Bio-Rad”, США) при ОП₆₀₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика бактериальных изолятов. Почвенные изоляты рода *Pantoea* представляют собой грамотрицательные, факультативно анаэробные, не образующие спор мелкие палочки. Величина клеток односуботочной культуры на питательной среде LB составляла 3–6 × 0.6 мкм. Исследуемые штаммы при росте на агаризованной среде синтезировали пигмент желтого цвета, за исключением изолята *Pantoea* sp. 3.5.2, который образовывал пигмент кремового цвета.

Вирулентность *P. agglomerans*, как патогена растений, связана с плазмидой рРАТН, которая несет в себе островки патогенности (Manulis et al., 1991). Чтобы определить наличие или отсутствие плазмиды рРАТН в исследуемых штаммах, мы провели ПЦР-анализ с использованием праймеров Rep23220_5 и Rep25101_3 (табл. 1). Данная пара праймеров позволяет амплифицировать ген *repA*, который кодирует репликазу А плазмиды рРАТН. Установили, что ни один из исследуемых нами штаммов *Pantoea* sp. не несет в своем геноме ген *repA*. Таким образом, плазида рРАТН в изучаемых изолятах отсутствует, что указывает на авирулентность исследуемых нами штаммов по отношению к растениям.

Биохимические свойства. На основании тестов API 20E все почвенные изоляты имели типичные характеристики для рода *Pantoea*, к которому они относятся: они не обладали способностью ни расщеплять уреазу, ни декарбоксилировать аргинин, лизин и орнитин, ни выделять H₂S из тиосульфа-

та, не образовывали индол (табл. 2). У всех штаммов была положительная реакция на β-галактозидазу. При ферментации сахаров использовали глюкозу, маннозу, инозит, арабинозу, также они были способны гидролизовать желатин. Тест на цитохром С-оксидазу у всех штаммов был отрицательным.

Однако штаммы отличались друг от друга по некоторым свойствам (табл. 2). Например, при ферментации сахаров изолят *Pantoea* sp. 3.2 обладал способностью ферментировать рамнозу и сахарозу, в отличие от отрицательных реакций на данные сахара у других штаммов. В свою очередь, штамм *Pantoea* sp. 3.5.2 не ферментировал мелибиозу и амигдалин, и не обладал способностью использовать цитрат в качестве единственного источника углерода, в отличие от других штаммов.

Идентификацию штаммов проводили путем считывания шкалы API 20E, отметив каждый тест выставленным баллом в триплетах с использованием базы данных биохимической идентификации “ABIS” (табл. 3). Изоляты *Pantoea* sp. 3.1 и *Pantoea* sp. 3.6.1, обладающие одинаковым биохимическим профилем, идентифицированы как *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* (88 и 91% идентичности). Единственный штамм, ферментирующий рамнозу и сахарозу, *Pantoea* sp. 3.2, был идентифицирован как *P. ananatis* (91%). Изолят *Pantoea* sp. 3.5.2, не использующий цитрат как единственный источник углерода и не ферментирующий мелибиозу и амигдалин, идентифицирован как *Pantoea agglomerans* (83%) (табл. 3). Процент точности идентификации видов бактерий с помощью ABIS считается допустимым в диапазоне от 88 до 99%.

Идентификация штаммов в системе API 20E часто оказывается на уровне предположительной и требует дополнительной верификации (Афанасьев и соавт., 2014). При использовании системы API 20E существует ряд ограничений в интерпретации результатов: оценка изменения цвета ячейки может быть субъективной, длительная ручная обработка изолятов, усложненная система архивации и поиска информации в оценочных листах API. Например, при идентификации 58 штаммов *Burkholderia pseudomallei* и 23 штаммов *B. mallei* с использованием данной системы корректное определение вида наблюдалось лишь в 60% случаев (Glass, Popovic, 2005). Для более достоверной идентификации видов необходимо дополнительно применение других молекулярно-генетических методов.

Филогенетический анализ. Идентификацию изолятов проводили путем анализа гена, кодирующего 16S рРНК. Последовательность гена 16S рРНК исследуемых штаммов имела высокую степень гомологии (более 99%) с генами других видов рода *Pantoea*: 99.8% со штаммами *P. agglomer-*

Таблица 2. Биохимические свойства исследуемых штаммов *Pantoea* sp. 3.1, *Pantoea* sp. 3.2, *Pantoea* sp. 3.5.2, *Pantoea* sp. 3.6.1

Тест	Обозначение теста	<i>Pantoea</i> 3.1	<i>Pantoea</i> 3.2	<i>Pantoea</i> 3.5.2	<i>Pantoea</i> 3.6.1	<i>Pantoea bremeri</i> sp. nov.
ONPG	Фермент β -галактозидаза	+	+	+	+	+
ADH	Декарбоксилирование аргинина	-	-	-	-	-
LDC	Декарбоксилирование лизина	-	-	-	-	-
ODC	Декарбоксилирование орнитина	-	-	-	-	-
CIT	Использование цитрата как единственного источника углерода	+	+	-	+	-
H ₂ S	Производство сероводорода	-	-	-	-	-
URE	Фермент уреазы	-	-	-	-	-
TDA	Фермент триптофан-деаминаза	+	+	+	+	
IND	Производство индола	-	-	-	-	-
VP	Производство ацетоина	+	+	+	+	+
GEL	Разжижение желатина	+	+	+	+	+
Ферментация сахаров:						
GLU	Глюкоза	+	+	+	+	+
MAN	Манноза	+	+	+	+	+
INO	Инозит	+	+	+	+	+
SOR	Сорбит	-	-	-	-	-
RHA	Рамноза	-	+	-	-	+
SAC	Сахароза	-	+	-	-	-
MEL	Мелибиоза	+	+	-	+	-
AMY	Амигдалин	+	+	-	+	
ARA	Арабиноза	+	+	+	+	+
OX	Тест на цитохром с оксидазу	-	-	-	-	-

Таблица 3. Идентификация почвенных изолятов с помощью базы данных "ABIS"

Почвенный изолят	Штамм	Процент идентичности
<i>Pantoea</i> 3.1	<i>P. stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	88
<i>Pantoea</i> 3.2	<i>P. ananatis</i>	91
<i>Pantoea</i> 3.5.2	<i>P. agglomerans</i>	83
<i>Pantoea</i> 3.6.1	<i>P. stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	91

ans, 99.6% со штаммами *P. vagans*, 99.4% со штаммами *P. ananatis*, *P. conspicua* и 99.2% со штаммами *P. anthophila*. Таким образом, анализ последовательности генов, кодирующих 16S рРНК штаммов 3.1, 3.2, 3.5.2, 3.6.1 позволил подтвердить принадлежность выделенных микроорганизмов к семейству *Erwiniaceae*, роду *Pantoea*, но не позволил однозначно определить вид исследуемых изолятов. Установлено, что порог сходства генов для классификации видов составляет 98.7–99% (Stackebrandt et al., 2006). Предыдущие исследования показали ограничения последовательности гена 16S рРНК как единственного маркера для сравнительных филогенетических исследований – 16S рРНК часто имеет слабую дискриминационную силу, может не отражать общие взаимосвязи и может быть неточным в идентификации некоторых видов (Janda et al., 2007). Полученные нами результаты демонстрируют, что разнообразие 16S рРНК внутри рода *Pantoea* выше данного значения, подтверждая, что ген 16S рРНК не содержит достаточных вариаций для дифференциации видов в пределах данного рода.

Мультилокусный анализ (MLSA) был предложен как лучший альтернативный подход к определению филогении новых изолятов (Palmer et al., 2017; Tambong et al., 2019), в частности, видовую идентификацию внутри рода *Pantoea*. Уровень генетического полиморфизма в генах домашнего хозяйства достаточно высок для оценки филогенетического родства между микроорганизмами (Maiden, 2006). Ген *leuS* кодирует лейцил-тРНК-синтетазу, ген *pyrG* кодирует СТР-синтазу; ген *rpoB* кодирует β -субъединицу РНК-полимеразы, ген *gyrB* является структурным геном для β -субъединицы ДНК-гиразы, ген *fusA* кодирует фактор элонгации белковой цепи (EFG) (Holmes et al., 2004). Мультилокусный филогенетический анализ был основан на сравнении последовательностей пяти генов домашнего хозяйства – *fusA*, *leuS*, *pyrG*, *gyrB* и *rpoB* (Tambong et al., 2014). Кроме вышеперечисленных генов, были секвенированы локусы гены *rplB*, однако использовать их для филогенетического анализа не удалось, поскольку последовательности этого гена в базе данных представлены лишь для 28 штаммов из 55 используемых представителей.

Для четырех исследуемых штаммов были получены частичные последовательности пяти кодирующих белок генов, которые впоследствии были объединены в следующем порядке: *fusA* (588 п.н.), *leuS* (642 п.н.), *pyrG* (372 п.н.), *rpoB* (409 п.н.) и *gyrB* (774 п.н.). Таким образом, общая длина конкатенированной последовательности составила 2785 п.н. Сравнение с помощью BLAST NCBI объединенных последовательностей исследуемых и типовых штаммов рода *Pantoea* позволило провести идентификацию изолятов. Процент гомологии среди штаммов варьировал от

80.0 до 99% (табл. S2). При этом все четыре штамма показали высокий процент гомологии с типовым штаммом вида *P. brenneri* LMG 5343 – более 99%.

Филогенетическое дерево, полученное при сравнении выровненных объединенных последовательностей генов по методу максимального правдоподобия (ML), показало наличие четырех основных филогенетических подгрупп рода *Pantoea* – *P. stewartii*, *P. ananatis*, *P. agglomerans* и *P. vagans* (рис. 1). При этом исследуемые штаммы образовали отдельный кластер с представителями вида *P. brenneri* – *P. brenneri* B024858 и *P. brenneri* B016381, который четко отделен от остальных филогрупп, демонстрируя процент достоверности узла равный 91%. Кроме того, степень достоверности данного узла так же была подтверждена построением филогенетического дерева по методу присоединения соседей (NJ) (рис. 1).

Ранее, при сравнении филогенетических деревьев, построенных на основе одного гена, с деревьями, полученными на основе сцепленных последовательностей, было выявлено, что ген *leuS* является надежным филогенетическим маркером для идентификации новых штаммов рода *Pantoea* (Tambong et al., 2014). Исходя из этого, нами дополнительно было построено филогенетическое дерево на основе гена домашнего хозяйства *leuS*, с использованием методов NJ и ML. Дерево в целом демонстрирует схожую топологию с деревом на основе сцепленных последовательностей, однако есть штаммы, которые меняют свое местоположение (рис. S1). В данном случае исследуемые штаммы образовали обособленный кластер со всеми представителями вида *P. brenneri*, используемыми в данном исследовании. Это различие в топологии штаммов может быть следствием различных процессов эволюции, которые претерпевают гены, используемые в мультилокусном анализе. Тем не менее, исходя из полученных данных, можно предположить, что исследуемые изоляты являются представителями вида *P. brenneri*.

Идентификация изолятов с помощью тест-системы API 20E не подтверждается результатами филогенетического анализа. Виды *P. stewartii* subsp. *indologenes*, *P. ananatis* и *P. agglomerans* образуют отдельные филогенетические кластеры, которые не включают в себя изучаемых изолятов (рис. 1). Биохимические свойства штаммов значительно отличаются друг от друга и от типового штамма *P. brenneri* (табл. 2). Однако известно, что представителям рода *Pantoea* присуща биохимическая гетерогенность даже в рамках одного вида. Например, в геноме *P. vagans* C9-1 обнаружены два кластера генов для утилизации сорбитола, которые отсутствуют у других штаммов *P. vagans* (Smits et al., 2011). Следовательно, эти дан-

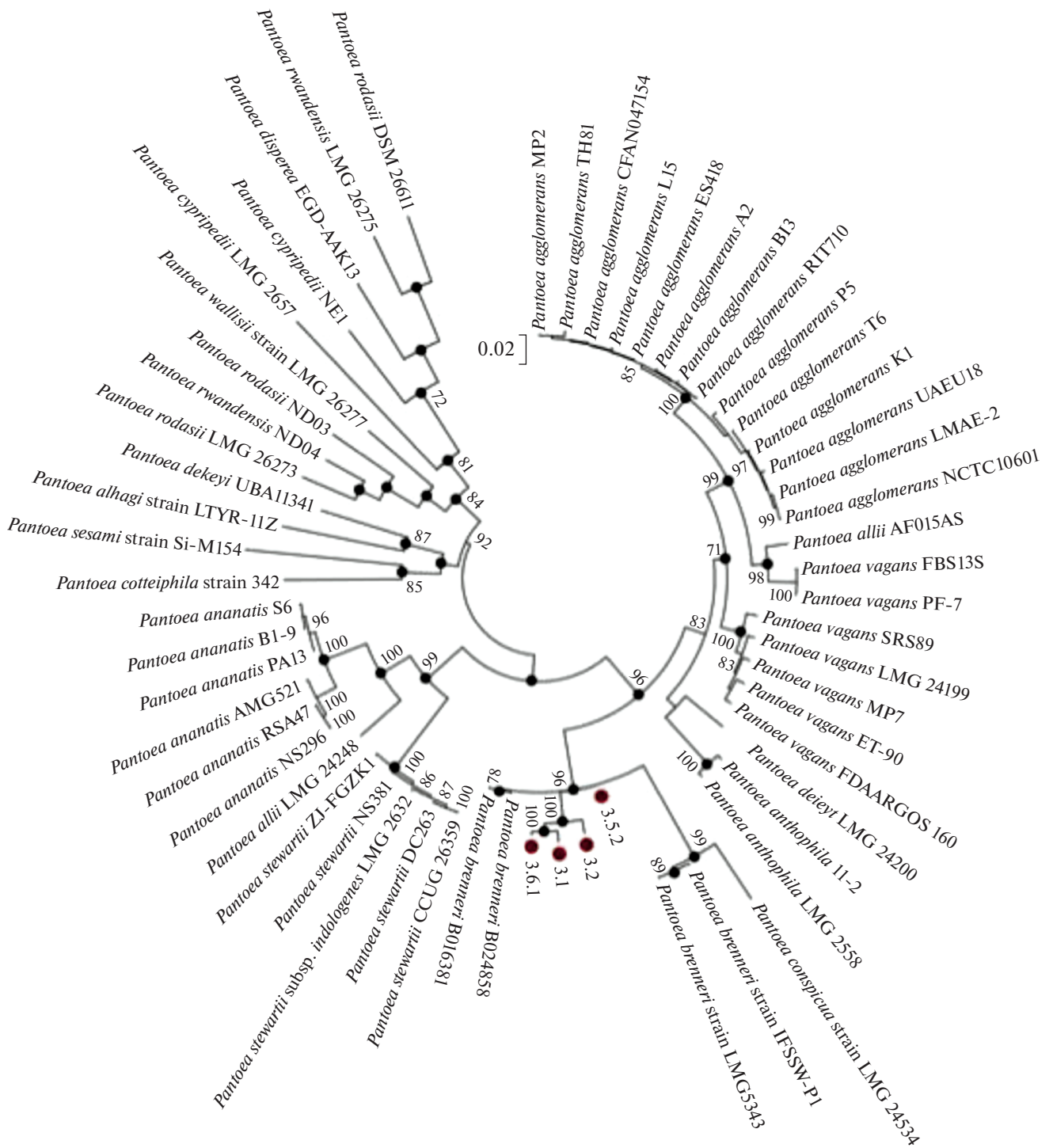


Рис. 1. Филогенетическое дерево 59 представителей рода *Pantoea*, основанное на анализе объединенных последовательностей генов *fusA*, *leuS*, *pyrG*, *gyrB* и *rpoB*. Дерево построено в программе MEGA7 методом максимального правдоподобия (ML). Черными кругами обозначены узлы, которые подтверждены алгоритмом присоединения соседей (NJ). Цифрами в узлах филогенетического дерева показана достоверность ветвления на основе бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев (в %), при этом значащими признаются значения больше 70%. Шкала масштаба показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2 заменам на каждые 100 нуклеотидов.

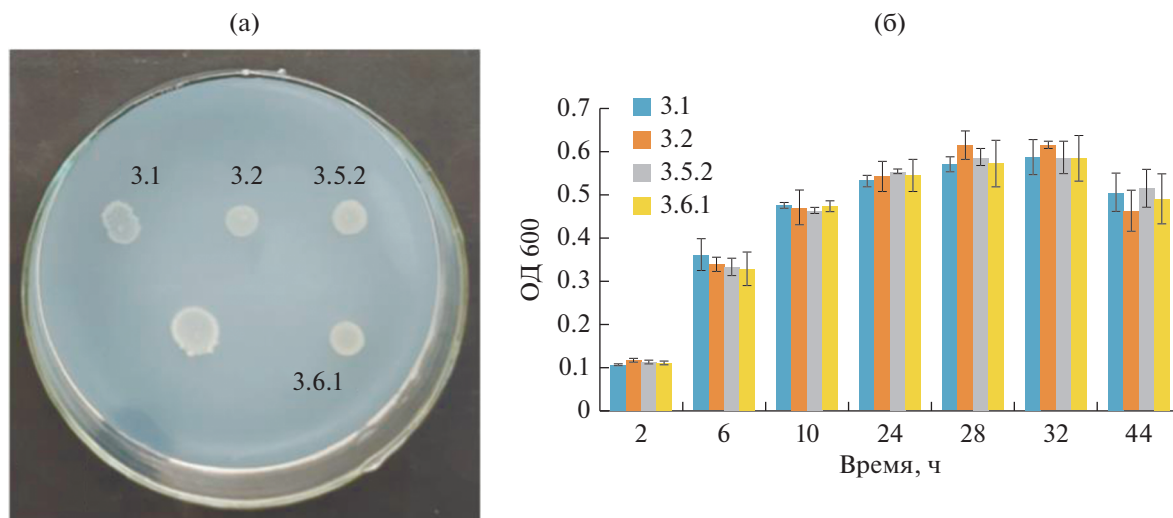


Рис. 2. Рост бактериальных штаммов *Pantoea* sp. на дифференциальной питательной среде Эшби: а – образование колоний на агаризованной среде; б – динамика роста бактерий на жидкой безазотной среде Эшби.

ные не противоречат идентификации выделенных штаммов как *P. brenneri*.

Способность штаммов к фиксации атмосферного азота. Изучали способность четырех бактериальных штаммов *P. brenneri* к фиксации атмосферного азота с помощью дифференциальной питательной среды Эшби. Рост колоний был зафиксирован через 12 ч культивирования при 37°C, что говорит о способности штаммов к использованию молекулярного азота, поскольку источник азота в питательной среде отсутствовал. Исследуемые бактерии при росте на твердой питательной среде Эшби образуют плоские, блестящие, гладкие с ровными краями колонии (рис. 2а). На данной питательной среде пигмент не образовывался, все колонии были кремового цвета.

Для подтверждения способности штаммов *P. brenneri* к азотфиксации изучали динамику накопления биомассы на жидкой безазотной среде Эшби, используя в качестве инокулятов 12-часовые культуры штаммов на этой же среде. Все исследуемые штаммы успешно росли в жидкой безазотной среде, демонстрируя стандартную кривую роста (рис. 2б). В течении первых 10 ч культивирования наблюдался активный рост культуры, затем бактерии переходили в длительную стационарную фазу, после которой происходило снижение уровня накопления биомассы. Аналогичная кривая роста с активным накоплением биомассы в первые часы культивирования наблюдалась у штамма *P. agglomerans* на безазотной среде Эшби (Doty et al., 2009).

Таким образом, с помощью фенотипических методов установили, что исследуемые бактерии можно отнести к группе азотфиксирующих бактерий (дiazотрофы) (Quispel, 1988). Способность

к фиксации азота бактериями рода *Pantoea* отмечается несколькими авторами (Loiret et al., 2004; Dutkiewicz et al., 2016). Была отмечена способность к фиксации азота штаммом *P. agglomerans*. Бактериальный штамм способен фиксировать азот как в чистой культуре, так и в сочетании с растениями пшеницы в гидропонике (Merbach et al., 1997).

В заключение отметим, что только с помощью MLSA на основе частичных последовательностей генов *fusA*, *pyrG*, *leuS*, *gyrB* и *rpoB* нам удалось произвести идентификацию почвенных изолятов до вида – *P. brenneri*. Установлено, что штаммы *P. brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1, помимо гидролиза почвенных фитатов, также обладают способностью к фиксации молекулярного азота, что может способствовать росту и развитию растений за счет увеличения доступности макроэлементов. Соответственно, штаммы *P. brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2 и 3.6.1 могут быть рассмотрены в качестве кандидатов для создания экологически чистого биопрепарата, заменяющего ряд химических удобрений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РНФ 19-76-00020.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* // Мол. генет., микробиол. вирусол. 2014. № 3. С. 22–28.
- Brady C., Cleenwerck I., Venter S., Vancanneyt M., Swings J., Coutinho T. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA) // Syst. Appl. Microbiol. 2008. V. 31. P. 447–460.
- Chen C., Xin K., Liu H., Cheng J., Shen X., Wang Y., Zhanga L. *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat // Sci. Rep. 2017. V. 7. Art. 41564.
- Deletoile A., Decre D., Courant S., Passet V., Audo J., Grumont P., Arlet G., Brisse S. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing // Bacteriology. 2009. V. 47. P. 300–310.
- Doty S.L., Oakley B., Xin G., Kang J.W., Singleton G., Khan Z., Vajzovic A., Staley J.T. Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow // Symbiosis. 2009. V. 47. P. 23–33.
- Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M.K., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects // Ann. Agric. Environ. Med. 2016. V. 23. P. 206–222.
- Gavini F., Mergaert J., Beji A., Mielcarek C., Izard D., Kerster S.K., De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1989. V. 39. P. 337–345.
- Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L., Swings J. Re-evaluating prokaryotic species // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. P. 733–739.
- Glass M.B., Popovic T. Preliminary evaluation of the API 20NE and RapID NF Plus Systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* // Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 479–483.
- Gonzalez A.J., Cleenwerck I., De Vos P., Fernandez-Sanz A.M. *Pseudomonas asturiensis* sp. nov., isolated from soybean and weeds // Syst. Appl. Microbiol. 2013. V. 36. P. 320–324.
- Herrera C., Koutsoudis M., Wang X., Bodman S. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* exhibits surface motility, which is a critical aspect of Stewart's wilt disease development on maize // Mol. Plant Microbe Interact. 2008. V. 21. P. 1359–1370.
- Holmes D.E., Nevin K.P., Lovley D.R. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family *Geobacteraceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1591–1599.
- Janda J.M., Abbott S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. P. 2761–2764.
- Johnson K.B., Stockwell V.O., McLaughlin R., Sugar D., Loper J.E., Roberts R.G. Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control // Phytopathology. 1993. V. 83. P. 995–1002.
- Loiret F.G., Ortega E., Kleiner D., Ortega-Rodes P., Rodes R., Dong Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane // J. Appl. Microbiol. 2004. V. 97. P. 504–511.
- Maiden M.C. Multilocus sequence typing of bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2006. V. 60. P. 561–588.
- Manulis S., Gafni Y., Clark E., Zutra D., Ophir Y., Barash I. Identification of a plasmid DNA probe for detection of strains of *Erwinia herbicola* pathogenic on *Gypsophila paniculata* // Phytopathology. 1991. V. 81. P. 54–57.
- Merbach W., Ruppel S., Schulze J. Dinitrogen fixation of microbe-plant associations as affected by nitrate and ammonium supply // Isotopes Environ. Health Stud. 1997. V. 33. P. 67–73.
- Palmer M., Steenkamp E.T., Coetzee M.P., Chan W.Y., van Zyl E., De Maayer P., Coutinho T.A., Blom J., Smits T.H., Duffy B., Venter S.N. Phylogenomic resolution of the bacterial genus *Pantoea* and its relationship with *Erwinia* and *Tatumella* // Antonie van Leeuwenhoek. 2017. V. 110. P. 1287–1309.
- Pileggi M., Pileggi S.A., Olchanheski L.R., Silva P.A., Munoz A.M., Koskinen W.C., Barber B., Sadowsky M.J. Isolation of mesotriene-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil // Chemosphere. 2012. V. 86. P. 1127–1132.
- Quispel A. Hellriegel and Wilfarth's discovery of (symbiotic) nitrogen fixation hundred years ago // Nitrogen Fixation: Hundred Years after / Eds. Bothe H., de Bruijn F.J., Newton W.E. Stuttgart–N.Y.: Gustav Fischer Verlag, 1988. P. 3–12.
- Smits T.H.M., Rezzonico F., Kamber T., Blom J., Goesmann A., Ishimaru C.A., Frey J.E., Stockwell V.O., Duffy B. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1 // PLoS One. 2011. V. 6. Art. e22247.
- Suleimanova A.D., Beinbauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1 // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 6790–6799.

Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // Microbiol. Today. 2006. V. 33. P. 152–155.

Subba R. Soil Microorganisms and Plant Growth. Oxford and IBH Publishing Co., India, 1977. 287 p.

Tambong J.T., Xu R., Kaneza C.A., Nshogozabahizi J.C. An in-depth analysis of a multilocus phylogeny identifies *leuS* as a reliable phylogenetic marker for the genus *Pantoea* // Evol. Bioinform. 2014. V. 10. P. 115–125.

Tambong J.T. Taxogenomics and systematics of the genus *Pantoea* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 24–63.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 4673–4680.

Walterson A.M., Stavriniades J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae* // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39. P. 968–984.

Identification of *Pantoea* Phytate-Hydrolyzing Rhizobacteria Based on Their Phenotypic Features and Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

A. D. Suleimanova¹,*, D. L. Itkina¹, D. S. Pudova¹, and M. R. Sharipova¹

¹Kazan (Volga region) federal university, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: aliya.kzn@gmail.com

Received May 3, 2020; revised August 21, 2020; accepted August 28, 2020

Abstract—Accurate strain identification within the *Pantoea* genus is difficult due to homologous recombination, which may affect the species boundaries. An integrated approach is presently the most effective one in determining the species of bacteria. Biochemical identification using the API20E system, phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences, and MLSA analysis based on partial sequences of the *fusA*, *pyrG*, *leuS*, *gyrB*, and *rpoB* genes showed that the soil phytate-hydrolyzing isolates belonged to the genus *Pantoea*, specifically to the species *Pantoea brenneri*. It was also established that phytate-hydrolyzing activity of the strains was accompanied by their ability to fix atmospheric nitrogen.

Keywords: *Pantoea*, identification, MLSA, API20E, nitrogen fixation

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА И ЛИПИДА А *PANTOEA AGGLOMERANS* П324

© 2021 г. Э. Л. Здоровенко^а, А. А. Кадыкова^{а, б}, А. С. Шашков^а,
Л. Д. Варбанец^с, Т. В. Булыгина^с, Ф. В. Тоукач^а

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

^бРоссийский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Высший химический колледж РАН, Москва, 125047 Россия

^сИнститут микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

*e-mail: tati20@ukr.net

Поступила в редакцию 08.05.2020 г.

После доработки 08.07.2020 г.

Принята к публикации 08.08.2020 г.

Из *Pantoea agglomerans* П324 выделен и охарактеризован липополисахарид (ЛПС), в результате мягкого кислотного гидролиза которого были получены фракции липида А и О-специфического полисахарида (ОПС). Исследования методом масс-спектрометрии HR ESI с отрицательными ионами показали гетерогенность липида А, основной формой которого является гексаацелированное производное, содержащее бифосфорилированный дисахарид GlcN, четыре остатка 14:0 (3-OH), один остаток 18:0 и один остаток 12:0 жирных кислот. На основании моносакхаридного состава, спектров ЯМР и расчетных методов показано, что ОПС представлен дисахаридными повторяющимися единицами: $\rightarrow 3$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow). ЛПС *P. agglomerans* П324 оказывал токсическое и пирогенное действие. Изучение влияния ЛПС и его структурных компонентов на активность пептидаз *Bacillus* показало, что ОПС и липид А играют значительную роль в гидролизе фибрина протеазами *Bacillus*, но не влияют на активность протеазы 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7465 и протеазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324. Гидролиз эластина усиливался в присутствии ОГ-кора и липида А, в то время как отмечено ингибирующее влияние отдельных фракций на гидролиз коллагена по сравнению с действием нативного ЛПС.

Ключевые слова: *Pantoea agglomerans*, липополисахарид, структура О-специфического полисахарида и липида А, ЯМР, активность пептидаз *Bacillus*

DOI: 10.31857/S0026365621010134

Pantoea agglomerans является одним из самых распространенных микроорганизмов, по меньшей мере, на территории, заселенной людьми. Эти бактерии могут конкурировать и выживать в различных средах, что делает их полезными для биоконтроля, биоремедиации и биодеградации. Первоначально, представители этого вида были обнаружены в растениях (Walterson, Stavrinides, 2015), позднее — в воздухе, почве, воде, пыли, продуктах животного происхождения, теле членистоногих и других животных, а иногда и в крови человека, ранах и внутренних органах (Völksch, et al., 2009; Walterson, Stavrinides, 2015). Представители данного вида бактерий могут быть как полезными, в частности, стимулировать выработку веществ, эффективных при лечении рака и других заболеваний (Kohchi et al., 2006), так и патогенными для человека, вызывая заболевания у людей, которые вдыхают органическую пыль (Rylander, Burrell, 1987).

Структура макромолекулы липополисахарида (ЛПС), представленная липидом А, олигосахаридом кора и О-специфическим полисахаридом (ОПС), определяет ее разнообразную функциональную и биологическую активность. Кроме характерных для ЛПС свойств, таких как антигенность, токсичность, пирогенность, способность индуцировать цитокины и т.д., в литературе встречаются сообщения о влиянии ЛПС на активность ферментов, таких как бактериальные протеазы (Jackson, Smith, 1993). Эти данные были в основном посвящены влиянию ЛПС на ompT белки (КФ 3.4.23.49, семейство аспарататпротеаз) внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Данные белки включают *Escherichia coli* OmpT и OmpP, *Shigella flexneri* SopA, *Salmonella enterica* PgtE и активатор плазминогена *Yersinia pestis*. R.A. Kramer и соавт. обнаружили, что ЛПС необходим для активации интегральной протеазы OmpT внешней мембраны *E. coli* (Kramer et al., 2002). Авторы показали,

что связывание молекулы ЛПС с белком приводит к конформационным изменениям белка, необходимым для получения активной формы протеазы. Остается неизвестным, почему ЛПС необходим для ферментативной активности *ompT*in белков. Другие авторы (Elif, Bert, 2012) показали, что ЛПС необходим для активности активатора плазминогена у *Yersinia pestis*, важного при развитии как бубонной, так и легочной форм чумы. Физиологической функцией активатора плазминогена является расщепление (активация) человеческого плазминогена с образованием пламина.

Известно (Novak et al., 2009), что как ЛПС грамотрицательных бактерий, так и протеазы являются одними из факторов микробной агрессии. При этом протеазы обеспечивают протеолитическое расщепление антимикробных факторов белковой природы, таких как иммуноглобулины, лизоцим и др., а ЛПС способствует проникновению через клеточные барьеры. Это приводит к снижению антимикробного потенциала клетки, что предполагает активацию механизма заражения. Согласно литературным данным (Tagawa et al., 2012), на поверхности грамотрицательных бактерий протеаза С активируется только после взаимодействия с ЛПС. Способность ЛПС индуцировать протеолитическую активность показана исследованиями *in vitro* клеток крови одиночной асцидии, *Ciona intestinalis* (Jackson, Smith, 1993).

Поскольку влияние ЛПС на активность протеаз бактерий практически не изучалось, целью данной работы было выделить и охарактеризовать ЛПС *P. agglomerans* П324, а также оценить его влияние на ферментативную активность протеаз *Bacillus*. Взаимодействие этих биополимеров представляет интерес, поскольку *Pantoea agglomerans* – это фитопатогенный вид, представители которого вместе с растительной пищей могут попадать в организм человека и сельскохозяйственных животных, а представители различных видов *Bacillus* входят в состав широко используемых в пищу пробиотических препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выращивание бактерий, выделение ЛПС, липида А и ОПС. *Pantoea agglomerans* П324 (изолирован из пшеницы, Херсонская область, Украина) был получен из коллекции живых культур отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Культуру выращивали на картофельной агаризованной среде при 28°C в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием (20 мин, 5000 g) и высущивали обработкой ацетоном и диэтиловым эфиром. Экстракцию ЛПС проводили водно-фенольным методом (Westphal, Jann, 1965). Очистку от нуклеиновых кислот осуществляли осаждением с помощью 50% водного раствора

CCl₃COOH, а также ультрацентрифугированием при 105000 g (4 ч, 3 раза). Очищенный ЛПС лиофилизировали. Для получения отдельных структурных компонентов молекулы ЛПС расщепляли 2% уксусной кислотой (100°C, 2 ч). Осадок липида А получали ультрацентрифугированием (25000 g, 40 мин), а супернатант концентрировали до объема 10 мл и фракционировали на колонке (70 × 30 см) с сефадексом G-50 в 0.025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4.5. В результате получали фракции О-специфического полисахарида (ОПС) и олигосахарида кора (ОГ-кор). Фракции лиофилизировали.

Содержание в препаратах углеводов, нуклеиновых кислот, белков и 2-кето-3-дезоксиманноновой кислоты определяли количественно, как описано ранее (Zdorovenko et al., 2017).

Идентификацию нейтральных моносахаридов проводили после гидролиза препаратов в 2 М CF₃COOH (2 ч, 120°C) и анализировали в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ (Albershein et al., 1976) на ГХ Maestro 7820 GC (“Интерлаб”, Россия), оборудованном колонкой HP-5MS с пламенно-ионизационным детектором, используя градиент температуры от 160°C (1 мин) до 290°C при 7°C/мин. Идентификацию моносахаридов осуществляли путем сравнения времени удерживания ацетатов полиолов исследуемых образцов со стандартными. Количественные соотношения моносахаридов выражали в % к общей сумме площадей пиков.

Абсолютные конфигурации моносахаридов определяли методом ГЖХ ацетилированных (S)-2-октилглицозидов, как описано в работе (Leontein, Lonngren, 1993).

Определение жирнокислотного состава осуществляли путем гидролиза образца в растворе хлористого ацетила (1.5%) в метаноле (100°C, 4 ч). Идентификацию жирных кислот проводили в виде метиловых эфиров на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert, колонка HP-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 нм), температурный режим 150–250°C, градиент температуры 4°C/мин; гелий использовали в качестве газа-носителя при скорости потока через колонку 1.2 мл/мин. Температура испарителя составляла 250°C, распределение потока – 1 : 100. Идентификацию жирных кислот проводили с помощью базы данных персонального компьютера, а также стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот. Количественное соотношение жирных кислот выражали в % к общей сумме площадей пиков.

ЯМР спектроскопия. Образцы дважды лиофилизировали из D₂O и затем исследовали в 99.9% растворе D₂O. ¹H и ¹³C ЯМР спектры снимали на спектрометре Bruker Avance II 600 MHz (Германия) при 30°C. В качестве внутреннего стандарта использовали 3-триметилсилилпропаноат натрия-2,2,3,3-d₄

(TSP, δH 0.0, δC 1.6). Программное обеспечение Bruker TopSpin 2.1 использовалось для сбора и обработки данных ЯМР. Время смешивания TOCSY и ROESY экспериментов – 200 мс. При записи HMBSC спектров использовали 60 мс задержку.

Химические сдвиги ^{13}C ЯМР были проанализированы и сравнены с опубликованными значениями сервисом моделирования ЯМР GODDESS, в которой обобщены известные структурные воздействия на химические сдвиги ^{13}C ЯМР (Караев et al., 2014). Уточнение структуры проведено с помощью службы определения структуры ЯМР GRASS, реализованной на платформе базы данных по структуре углеводов (Carbohydrate Structure Database) (Toukach, Egorova, 2016).

Масс-спектрометрия. Прибор Bruker micrOTOF II использовали для записи масс-спектра ESI с высоким разрешением в режиме отрицательных ионов (Belyakov et al., 2010). Напряжение на капиллярной границе раздела составляло 3200 В, диапазон масс составлял от m/z 50 до 3000 Да, в качестве сухого газа использовали азот, скорость потока составляла 3 мкл/мин, температура интерфейса была установлена на уровне 180°C. Шприц для инъекций использовали для растворов ацетонитрил/вода/ Et_3N в соотношении 1 : 1 : 0.1. Калибрующий раствор для электрораспыления (“Fluka”) использовали для внутренней калибровки.

Биологический анализ. При исследовании биологической и функциональной активности использовали следующие концентрации ЛПС: 500 мкг/0.2 мл, 250 мкг/0.2 мл, 125 мкг/0.2 мл, 62.5 мкг/0.2 мл (токсичность); минимальная пирогенная доза – 7.5×10^{-3} мкг/мл на 1 кг веса животного (пирогенность); от 0.5 до 3 мг/мл (процессы адгезии); 1 мг/мл (серологические исследования). Работа проводилась в соответствии с “Общими этическими принципами экспериментов на животных”.

Определение чувствительности микробной культуры к полимиксину В. Чувствительность микробных культур *P. agglomerans* к полимиксину В определяли диско-диффузионным методом (Wainstein, 2019). Зону ингибирования роста бактериальной культуры вокруг диска с антибиотиком измеряли с точностью до 1 мм.

Определение токсичности ЛПС. Токсичность ЛПС исследовали на здоровых белых беспородных мышах обоих полов весом 19–21 г, которые ранее не использовались для каких-либо экспериментов. Для сенсibilизации всем мышам внутрибрюшинно вводили 0.5 мл 3.2% раствора гидрохлорида D-галактозамина в 0.9% апирирогенном стерильном растворе NaCl. Сразу после этого внутрибрюшинно вводили 0.2 мл ЛПС в изотоническом стерильном апирирогенном физиологическом растворе, нагретом до 37°C, со скоростью

0.1 мл/с. В серии разведений ЛПС определяли LD_{50} и его значение использовали для оценки токсичности ЛПС. Контрольная и экспериментальная группы состояли из 10 мышей в каждой. Контрольным мышам вводили 0.2 мл стерильного 0.9% раствора NaCl вместе с гидрохлоридом D-галактозамина. Животных наблюдали в течение 48 ч. LD_{50} рассчитывалась, как описано в работе (Muthannan, 2016).

Определение пирогенности ЛПС. Пирогенность ЛПС определяли на кроликах (порода шиншилла, возраст 1.0–1.5 года) массой 2.0–3.5 кг, как описано в работе (Bennett, 1948). Использовали животных с начальной разницей температуры в диапазоне 0.2°C. Температуру измеряли с 30-мин интервалами перед инъекцией и с 1-ч интервалами после инъекции. Тестируемый ЛПС считали не пирогенным, если сумма повышения температур у трех кроликов была меньше или равна 1.4°C; если эта сумма превышала 2.2°C – пирогенным.

Серологические исследования. Для получения O-антисыворотки использовали прогретые клетки *P. agglomerans* (2.5 ч, кипящая водяная баня). Кроликов иммунизировали внутривенно пятикратно с интервалом 4 сут, концентрация клеток составляла 2×10^9 /мл (от 0.1 до 1 мл). Антигенную активность ЛПС исследовали методом двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони (Ouchterlony, 1962).

Адгезивную активность изучали экспресс-методом (Brilis, et al., 1968) на свежих эритроцитах кролика. Индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ) представляет собой среднее количество микробных клеток, прикрепленных к одному эритроциту, вовлеченному в процесс адгезии. Этот параметр был определен для 50 эритроцитов под микроскопом.

Влияние ЛПС *P. agglomerans* П324 и его структурных компонентов на активность протеаз *Bacillus*. Основными объектами исследования были протеазы из штамма *Bacillus thuringiensis* ИМВ В-7324 (полученного путем химического мутагенеза), *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 (выделен из Черного моря в районе острова Змеиный и любезно предоставленный сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Одесского национального университета им. И.И. Мечникова) и *Bacillus* sp. ПЗ (выделен из перифитона вольеров с дельфинами в Научно-исследовательском центре Вооруженных Сил Украины “Государственный океанариум”). Выделение и очистка протеаз описаны ранее (Matseliukh et al., 1999).

Были использованы протеазы со следующей специфической активностью:

– протеаза 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7465 с эластолитической (442 ед./мг белка) и коллагеназной (212.7 ед./мг белка) активностью;

– протеаза 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7465 с фибринолитической (250 ед./мг белка), эластолитической (289.5 ед./мг белка) и коллагеназной (345.8 ед./мг белка) активностью;

– протеаза 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 с фибринолитической (100 ед./мг белка), эластолитической (197.3 ед./мг белка) и коллагеназной (106 ед./мг белка) активностью;

– протеаза 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 с фибринолитической (88.75 ед./мг белка) и коллагеназной (187 ед./мг белка) активностью;

– протеазы 1 и 2 *Bacillus* sp. ПЗ с фибринолитической (13.3 и 5.6 ед./мг белка), эластолитической (38.5 и 62.5 ед./мг белка) и коллагеназой (58 ед./мг белка) активностью.

При исследовании коллагеназной активности (Mandl, 1970) инкубационную смесь, содержащую 10 мг коллагена, 2.5 мл 0.01 *трис*-НСI буфера (рН 9.0–10.0) и 1 мл исследуемого препарата, выдерживали на водяной бане в течение 3 ч при 37°C. После этого реакцию смесь центрифугировали при 10000 *g* 5 мин и 0.1 мл супернатанта переносили в пробирки, содержащие 0.5 мл 4% раствора нингидрина в ацетоне и равный объем 0.2 М цитратного буфера. Инкубирование проводили в течение 20 мин на горячей бане, после чего к охлажденной смеси добавляли 5 мл 50% раствора *n*-пропанола и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Продукты расщепления определяли с использованием спектрофотометра DeNovix DS-11 при длине волны 600 нм. По стандартной кривой, построенной для свободного L-лейцина, определяли эквивалентное количество мкмоль высвободившихся в процессе гидролиза аминокислот. Одна единица активности эквивалентна 1 мкмоль L-лейцина, высвобождаемого из коллагена в течение 3 ч гидролиза при 37°C.

Эластолитическую активность определяли путем колориметрического измерения интенсивности окраски раствора, содержащего конго-красный эластин в качестве субстрата для фермента (Matseliukh et al., 1999). Инкубационная смесь содержала 2.5 мл 0.01 М *трис*-НСI буфера (рН 7.5), 5 мг эластина, окрашенного 0.002% раствором конго-красного и 1 мл раствора фермента. Смесь выдерживали 3 ч при 37°C. Реакцию останавливали, выдерживая пробирки с реакционным раствором на ледяной бане в течение 30 мин. Не гидролизованный эластин отделяли центрифугированием при 10000 *g*, 5 мин. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре DeNovix DS-11 при длине волны 515 нм. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мг эластина за 1 мин.

Фибринолитическую активность определяли по методу Масады (Masada, 2004). В качестве субстрата использовали фибрин, полученный из плазмы крови человека. Реакционная смесь содержала 1 мг

фибрина, 1.8 мл 0.01 М *трис*-НСI буфера (рН 7.5) с добавлением 0.005 М CaCl₂ и 0.2 мл раствора исследуемого препарата. Инкубационную смесь выдерживали 30 мин при 37°C. Продукты гидролиза определяли на спектрофотометре SF-26 при длине волны 275 нм. Единицу фибринолитической активности определяли как количество фермента, которое увеличивало оптическую плотность реакционной смеси на 0.01 единицы за 1 мин в условиях эксперимента.

Обработку протеаз штаммов *Bacillus* ЛПС в конечной концентрации 0.01% проводили в течение 60 мин при комнатной температуре. Все эксперименты повторяли 5–8 раз.

Статистический анализ. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента (*t*). Все результаты представлены как среднее значение величин ± стандартная ошибка (SEM). Различия со значением *P* < 0.05 считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ЛПС *P. agglomerans* П324 показало, что его выход из клеток составлял 5.3%, что несколько ниже, чем у типового штамма *P. agglomerans* 8674^T (6.8%), однако соответствует средним показателям, характерным для представителей *Enterobacteriaceae*. Очищенный ЛПС содержал значительное (45.0%) количество углеводов и незначительное (2.7%) – нуклеиновых кислот.

Анализ моносахаридного состава показал, что преобладающими моносахаридами ЛПС *P. agglomerans* П324 были глюкоза (41.2%) и рамноза (25.2%), а также обнаружено незначительное содержание галактозы (4.6%). Характерными компонентами ЛПС грамотрицательных бактерий являются 2-кето-3-дезоксиманноктоновая кислота (КДО) и гептозы, содержание которых в ЛПС *P. agglomerans* П324 составляло 0.13 и 12.3% соответственно.

Анализ жирнокислотного состава ЛПС *P. agglomerans* П324 показал присутствие жирных кислот с длиной цепи от 12 до 18 атомов углерода, включая 14:0 (3-ОН) кислоту в качестве преобладающего компонента (38.96%). Кроме насыщенных, были обнаружены мононенасыщенные кислоты 16:1 и *цис*- и *транс*-изомеры 18:1, которые не являются характерными компонентами липида А, но могли образоваться при отщеплении воды от оксикислот.

В результате мягкой кислотной деградации ЛПС *P. agglomerans* П324 были получены структурные компоненты: ОПС и липид А.

Исследование структуры липида А с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (HR ESI) в режиме отрицательных ионов показало присут-

Таблица 1. Химические сдвиги ЯМР ^1H и ^{13}C (δ , м.д.) О-полисахарида *P. agglomerans* П324

Остатки моносахаридов и положение	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow		
A1	101.7	4.95, s
A2	68.4	4.19, s
A3	77.0	3.83, m
A4	71.4	3.58, t (9.4)
A5	70.5	4.08, m
A6	17.9	1.30, d (6.2)
$\rightarrow 4$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow		
B1	96.7	5.08, d (3.7)
B2	72.9	3.61, m
B3	72.9	3.88, t (9.4)
B4	78.4	3.63, t (9.6)
B5	72.0	4.07, m
B6	61.1	3.76, 3.82, m

S – синглет, d – дублет, t – триплет, m – мультиплет.

ствии в масс-спектре двух основных пиков: 1854.4900 Да и 1360.8135 Да, которые были отнесены к дифосфорилированному дисахариду GlcN с четырьмя 14:0 (3-ОН), одним 18:0 и одним 12:0 ацильными заместителями (расчетная масса 1854.5219 Да) и тетраацилированному дисахариду, в котором отсутствует один 14:0 (3-ОН) и один 18:0 заместители (расчетная масса 1360.8277 Да). Эти данные согласуются с данными, опубликованными ранее (Zdorovenko et al., 2017, 2018, 2019). Несколько других незначительных пиков были определены как другие гексаацилированные производные с замещением 18:0 на 16:0 или 14:0 ($\Delta m = 28.03$ Да). Масс-спектр показал гетерогенность липида *A. P. agglomerans* П324, но основная форма была гексаацилированная. В отличие от ранее изученных штаммов (Zdorovenko et al., 2017, 2018, 2019), производные гексаацилированного липида *A. P. agglomerans* П324 содержали 18:0 кислоту.

Анализ моносахаридного состава ОПС методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) производных ацетатов полиолов, полученных путем полного кислотного гидролиза, показал присутствие глюкозы и рамнозы. ГЖХ ацетилированных (S)-2-октилглицеридов свидетельствует о том, что рамноза имеет L-конфигурацию. Абсолютная конфигурация Glc была определена как D по эффектам гликозилирования на основании данных ^{13}C ЯМР химических сдвигов, как суммировано и рассчитано сервисом моделирования ЯМР GODDESS (Караев, Toukach, 2014).

^{13}C ЯМР спектр О-полисахарида содержал 12 сигналов, характерных для регулярного поли-

мера. Их химические сдвиги были заданы в системе GRASS (Караев et al., 2018). Мономерный состав был представлен двумя моносахаридами (Glc, Rha). Поиск структурных гипотез привел к единственной гипотезе, соответствующей экспериментальному ^{13}C ЯМР спектру и имеющей критерий адекватности ниже 0.5 м.д.: $\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow 4$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow (критерий адекватности 0.33 м.д., среднее квадратическое отклонение моделирования по сравнению с экспериментом 0.42 м.д., линейная корреляция 1.000, достоверность прогноза 90%; параметры подробно описаны в работе Караев et al., 2018).

Структурная гипотеза, приведенная выше, была подтверждена полным отнесением ЯМР спектров, выполненных с помощью 2D ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY и ^1H , ^{13}C HSQC экспериментам (табл. 1). Соответственно, ^1H ЯМР спектр ОПС (табл. 1) содержал сигналы для двух аномерных протонов при δ 4.95–5.08, одной группы $\text{CH}_3\text{—C}$ (H-6 Rha) при δ 1.30, других протонов моносахаридного цикла при δ 3.58–4.19. ^{13}C ЯМР спектр ОПС (табл. 1) содержал сигналы для двух аномерных атомов углерода при δ 96.7–101.7, одной группы $\text{CH}_3\text{—C}$ (C-6 Rha) при δ 17.9, одной группы $\text{HOCH}_2\text{—C}$ (C-6 Glc) при δ 61.1 и других углеродов пиранозного цикла при δ 68.4–78.4.

Спиновые системы в ^1H и ^{13}C ЯМР спектрах были идентифицированы для двух моносахаридных остатков (A, B) на основании корреляции в двухмерных ЯМР спектрах и значений констант $^3J_{\text{H, H}}$.

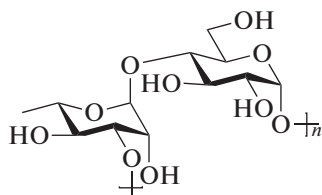


Рис. 1. Структура О-специфического полисахарида *P. agglomerans* П324.

Аномерная конфигурация остатков Rha и Glc была подтверждена значением химических сдвигов С-5 (по сравнению с опубликованными данными соответствующими α - и β -пиранозидов (Lipkind et al., 1988), усредненными сервисом моделирования ЯМР GODDESS (Караев et al., 2018). α -Конфигурация моносахаридов также подтверждается наличием Н-1/Н-2 корреляций в ROESY спектре.

Смещения в слабое поле сигналов С-3 остатка А и С-4 остатка В по сравнению с типичными значениями для незамещенных моносахаридов (Lipkind et al., 1988) показывали положение замещения в повторяющемся звене. Единственно возможная последовательность моносахаридов была подтверждена корреляциями в спектре ROESY А Н-1/В Н-4, В Н-1/А Н-3.

В результате была установлена (рис. 1) следующая структура О-специфического полисахарида *P. agglomerans* П324: $\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow).

Согласно систематическому поиску в базе данных по структуре углеводов (Carbohydrate Structure Database), (Toukach, Egorova, 2016) эта структура была впервые обнаружена для представителей вида *P. agglomerans*. Ранее такая же структура была обнаружена (Knirel, 2011) для О-антигенов представителей двух семейств (*Burkholderiaceae* и *Enterobacteriaceae*): *Burkholderia cepacia* O1, O9 (CSDB 31598, 108499, 126042), *Serratia marcescens* S1254, O27 (CSDB 179 и 255) и *Klebsiella pneumoniae* i28/94 (CSDB 3608).

Известно, что различные виды биологической активности ЛПС, в частности, устойчивость бактерий к антибиотикам связаны с наличием заряженных групп в липиде А. Установлено, что заместители, такие как 4-амино-4-дезоксид-арабиноза, при 4'-фосфате липида А могут вызывать устойчивость бактерий к некоторым поликатионным антибиотикам, например, полимиксину В (Trent et al., 2001). Как было показано с помощью диско-диффузионного метода, полимиксин В задерживал рост клеток *P. agglomerans* П324 (зона ингибирования роста составляла 20 мм) (рис. 2). Данный результат указывает на чувствительность бактериальных клеток к полимиксину В, и можно предположить, что липид А ЛПС *P. agglomerans*, выделенный из этого штамма, не содержал

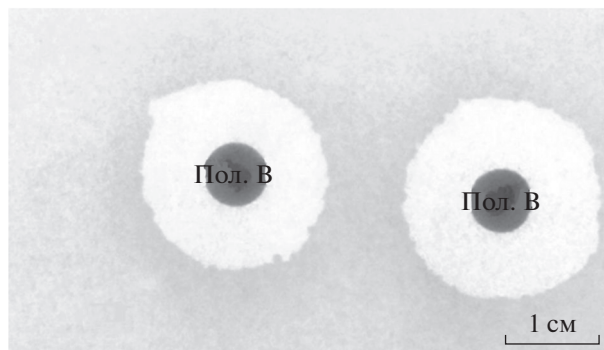


Рис. 2. Чувствительность микробной культуры *P. agglomerans* П324 к полимиксину В.

4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозу в качестве заместителя. Это предположение согласуется с данными ESI масс-спектрометрии липида А ЛПС, описанными выше.

Липид А отвечает за такие эндотоксические активности, как токсичность и пирогенность. В качестве стандарта при определении токсичности ЛПС мы использовали токсичность ЛПС *E. coli* O55:B5, известного как классический эталонный штамм ($LD_{50} = 0.012$ мкг/мышь или 0.48 мкг/кг) (Vorob'eva et al., 2006). Летальная токсичность ЛПС *P. agglomerans* П324 ($LD_{50} = 53$ мкг/мышь или 2.12 мг/кг) в экспериментах на мышах, сенсibilизированных D-галактозамином, была в 4400 раз ниже, чем у *E. coli*. Таким образом, ЛПС *P. agglomerans* П324 можно отнести к малотоксичным веществам. Хотя он продемонстрировал более высокий уровень токсичности, чем ЛПС других исследованных представителей вида *P. agglomerans* (Zdorovenko et al., 2017, 2018, 2019).

ЛПС исследуемого штамма оказывал пирогенное действие (рис. 3): введение раствора ЛПС в течение первого часа привело к резкому повышению температуры у экспериментальных животных (уровень повышения температуры был почти в два раза выше, чем после введения пирогенала — фармацевтического препарата, используемого для повышения температуры у пациентов).

Патогенность грамотрицательных бактерий зависит от способности макромолекул ЛПС прикрепляться к клеткам. Было показано (рис. 4), что изученный ЛПС уменьшал ИАМ: чем выше была концентрация ЛПС в реакционной смеси, тем меньше происходило взаимодействий между поверхностными структурами эритроцитов и клетками *E. coli* ATCC 25922. Под влиянием ЛПС *P. agglomerans* П324 в концентрации 3 мг/мл ИАМ составлял ~ 2.2 ед.

Известно, что серологическая специфичность микробных клеток зависит от состава ЛПС и наличия антигенных детерминант, распознаваемых

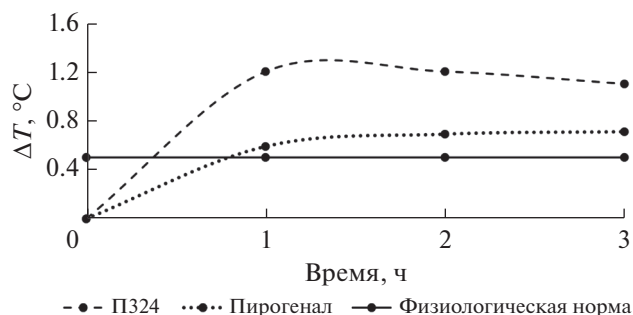


Рис. 3. Пирогенность ЛПС *P. agglomerans* П324. Данные представлены как среднее значение величин \pm стандартная ошибка (SEM).

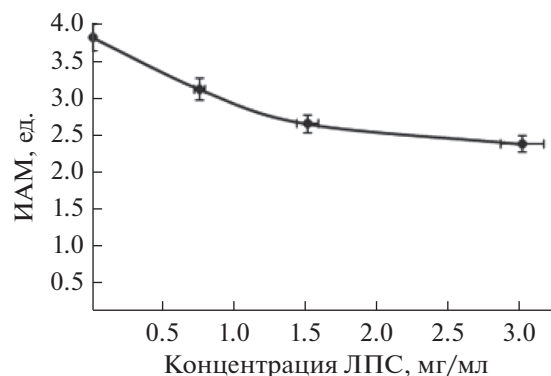


Рис. 4. Влияние различных концентраций ЛПС *P. agglomerans* П324 на индекс адгезивности *E. coli*. Данные представлены как среднее значение величин \pm SEM.

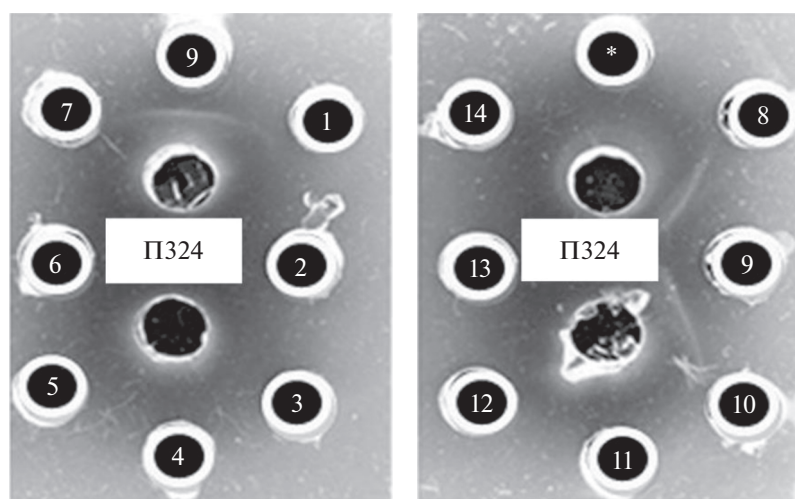


Рис. 5. Реакция двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони О-антисыворотки к *P. agglomerans* П324 (две центральные лунки) и ЛПС *P. agglomerans* 7960а (1), 7969 (2), 8456 (3), 8488 (4), 8490 (5), 8606 (6), 8674 (7), П1а (8), П324 (9), 7406 (10), 7604 (11), 9637 (12), 9649 (13), 9668 (14), * – пустая ячейка.

клетками высших организмов. Поликлональная О-антисыворотка была получена путем иммунизации кроликов прогретой культурой исследуемого штамма *P. agglomerans* П324. Антигенами для серологических исследований служили ЛПС, выделенные из 14 штаммов *P. agglomerans* (*P. agglomerans* 7960а, 7969, 8456, 8488, 8490, 8606, 8674, П1а, П324, 7406, 9637, 9649 и 9668). Реакцией двойной иммунодиффузии в агаре было показано, что антисыворотка к *P. agglomerans* П324 реагировала только с гомологичным ЛПС. Серологических перекрестных реакций антисыворотки к *P. agglomerans* П324 с ЛПС других исследованных штаммов обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии общих антигенных детерминант, то есть о принадлежности *P. agglomerans* П324 к иной серогруппе (рис. 5).

Имеются сообщения о влиянии ЛПС на активность некоторых ферментов высших животных (каспазы-1, интерлейкин-1 конвертирующего фермента, Schumann et al., 1998; ферментов системы комплимента и ферментов в макрофагах мыши, Salimuddin, et al., 1999). Что касается микроорганизмов, существует только несколько работ о влиянии ЛПС на активность ферментов, в частности, авторы одной из них (Kramer et al., 2002) считают, что для активации интегральной протеазы OmpT наружной мембраны кишечной палочки необходим ЛПС, который вызывает тонкие конформационные изменения в структуре OmpT, тем самым изменяя свойства активного центра таким образом, что он становится способным к гидролизу субстратов. Показаны сайты связывания молекулы ЛПС с аминокислотами фермента.

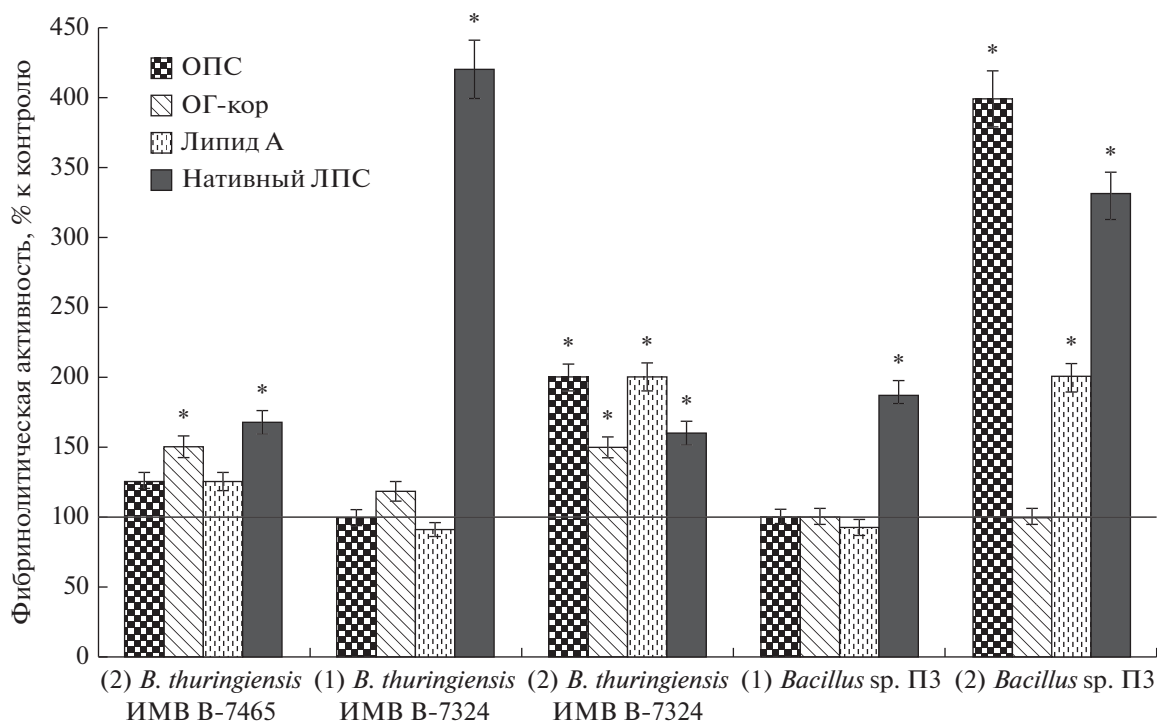


Рис. 6. Влияние отдельных фракций ЛПС *P. agglomerans* П324 на фибринолитическую активность протеаз *Bacillus*. Сплошная линия – активность пептидазы без добавления ЛПС (уровень контроля). Данные представлены как среднее значение величин \pm SEM. Величины, значительно ($P < 0.05$) отличные от контроля, обозначены (*).

Ранее нами было показано, что ЛПС *P. agglomerans* П324 оказывал наибольшее стимулирующее влияние на активность протеаз *Bacillus* (Dzyublyuk et al., 2018). Он повышал фибринолитическую активность протеазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 более чем в четыре раза, а протеазы 2 *Bacillus* sp. ПЗ более чем в три раза. Поскольку каждый компонент полифункциональной макромолекулы ЛПС вносит определенный вклад в ее биологическую активность, в данной работе мы изучили влияние отдельных структурных компонентов ЛПС *P. agglomerans* П324 на активность протеаз *Bacillus*. Было показано (рис. 6), что ОПС проявлял наибольшее стимулирующее влияние на фибринолитическую активность протеазы 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 (в два раза по сравнению с контролем) и протеазы 2 *Bacillus* sp. ПЗ (в четыре раза по сравнению с контролем). Можно предположить, что в активации этих ферментов ЛПС *P. agglomerans* П324 важную роль играет углеводная часть молекулы, а именно ОПС. Наряду с этим липид А также повышает активность тех же протеаз, но в меньшей степени (только в два раза). Олигосахарид кора активировал протеазу 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7465 и протеазу 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 (50 и 18% по отношению к контролю, соответственно). Фибринолитическая ак-

тивность протеазы 1 *Bacillus* sp. ПЗ существенно не изменялась под влиянием отдельных фракций ЛПС. Аналогичный эффект имел место в случае протеазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324.

Исследования эластолитической активности показали, что нативный ЛПС либо не влиял на данную активность, либо подавлял ее почти в два раза (рис. 7). Действие отдельных компонентов ЛПС на эластолитическую активность показало наибольший стимулирующий эффект липида А (в 1.5–2.5 раза в зависимости от штамма).

Показано (рис. 8), что отдельные фракции ЛПС, в отличие от нативного, незначительно ингибируют активность коллагеназы.

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии как нативного ЛПС, так и отдельных его структурных компонентов на активность исследуемых ферментов. Можно предположить, что значительная активация исследуемых протеаз нативным ЛПС является следствием совместного действия трех его структурных компонентов (О-специфического полисахарида, олигосахаридов кора и липида А).

Вместе с тем имеются незначительные сведения о том, что особенности строения ЛПС могут влиять на активность ферментов. Так, показано

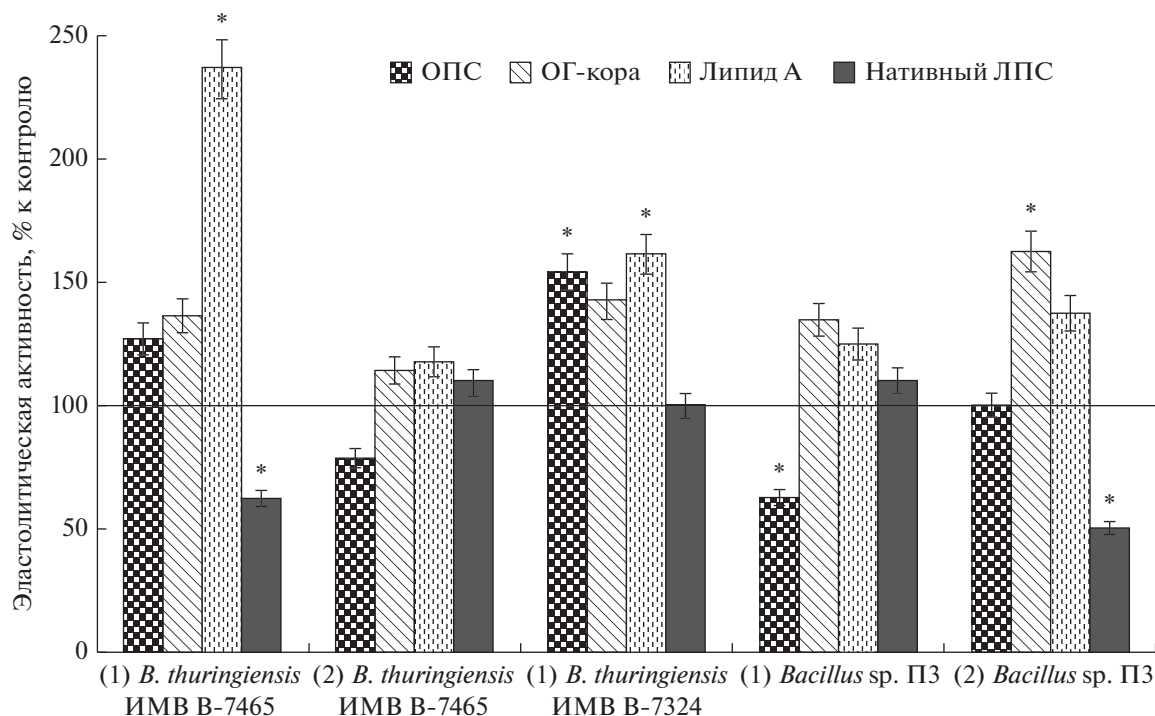


Рис. 7. Влияние отдельных фракций ЛПС *P. agglomerans* П324 на эластолитическую активность протеаз *Bacillus*. Сплошная линия – активность пептидазы без добавления ЛПС (уровень контроля). Данные представлены как среднее значение величин \pm SEM. Величины, значительно ($P < 0.05$) отличные от контроля, обозначены (*).

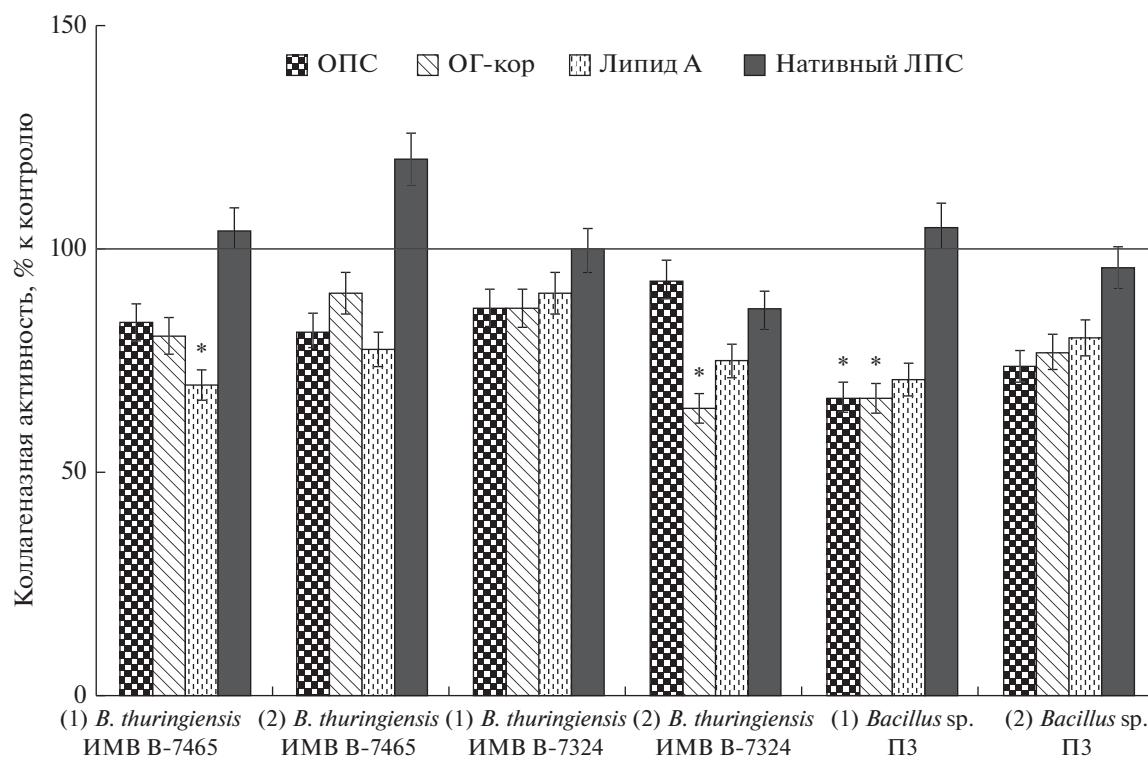


Рис. 8. Влияние отдельных фракций ЛПС *P. agglomerans* П324 на коллагеназную активность протеаз *Bacillus*. Сплошная линия – активность пептидазы без добавления ЛПС (уровень контроля). Данные представлены как среднее значение величин \pm SEM. Величины, значительно ($P < 0.05$) отличные от контроля, обозначены (*).

(Dentovskaya et al., 2007), что укорочение олигосахарида кора приводит к ингибированию фибринолитической и плазмокоагуляционной активностей активатора плазминогена *Yersinia pestis*, тогда как снижение степени ацилирования липида А на их активность не влияет. Sugiyama, Minami, Ishii и Amano (Sugiyama et al., 2013) показали важную роль фосфатных группы липида А в ингибировании Lon протеазы *E. coli*.

Таким образом, из *P. agglomerans* П324 выделен ЛПС и его структурные компоненты, которые химически охарактеризованы. По составу жирных кислот липида А исследуемый ЛПС сходен с ЛПС других представителей *Enterobacteriaceae*. Структура липида А *P. agglomerans* П324, как и липидов А других исследованных штаммов этого вида, характеризуется гетерогенностью, обусловленной разной степенью ацилирования, однако, в отличие от других липидов А, содержит С18:0 кислоту. ОПС *P. agglomerans* П324 отличается структурой повторяющегося звена от установленных до настоящего времени структур других штаммов этого вида. Интересным представляется аналогия структур ОПС *P. agglomerans* П324 со структурами представителей семейства *Burkholderiaceae*: *Burkholderia cepacia* O1, O9 (CSDB 31598, 108499, 126042), а также *Enterobacteriaceae*: *Serratia marcescens* S1254, O27 (CSDB 179 и 255) и *Klebsiella pneumoniae* i28/94 (CSDB 3608). Поскольку серологическими исследованиями нами показано отсутствие общих антигенных детерминант в ЛПС *P. agglomerans* П324 и других изученных нами штаммах *P. agglomerans*, нам представляется перспективными дальнейшие исследования по установлению серологических взаимосвязей между *P. agglomerans* П324 и бактериями с аналогичной структурой ОПС. Полученные нами результаты о способности ЛПС исследуемого штамма влиять на активность протеаз с различной специфичностью ожидают дальнейшего обсуждения с точки зрения целесообразности такого взаимодействия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Александру Чижову (Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия) за регистрацию спектра ESI MS липида А *P. agglomerans* П324.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Компьютерная интерпретация данных ЯМР и выяснение структуры ОПС была поддержана грантом Российского научного фонда № 18-14-00098.

СОКРАЩЕНИЯ

COSY, корреляционная спектроскопия; CSDB, База данных по структуре углеводов; ГЖХ, газо-жидкостная хроматография; GODDESS, эмпирическое моделирование на основе баз данных, оптимизированное для гликанов; GRASS, генерация, ранжирование и назначение моносахаридных структур; HSQC, гетероядерная одноканальная корреляция; HR ESI MS, электрораспылительная ионизационная масс-спектрометрия высокого разрешения; ЛПС, липополисахарид; ЯМР, ядерный магнитный резонанс; OPS, О-специфический полисахарид; ROESY, спектроскопия Оверхаузера с вращающейся рамой; TOCSY, тотальная корреляционная спектроскопия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Albershein P., Nevis D.J., English P.D., Karr A., A method for analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography // Carbohydr. Res. 1976. P. 340–345.
- Belyakov P.A., Kadentsev V.I., Chizhov A.O., Kolotyorkina N.G., Shashkov A.S., Ananikov V.P. Mechanistic insight into organic and catalytic reactions by joint studies using mass spectrometry and NMR spectroscopy // Mendeleev Commun. 2010. V. 20. P. 125–131.
- Bennett I.L. A study of the relationship between the fevers caused by bacterial pyrogens and by the intravenous injection of the sterile exudates of acute inflammation // J. Exper. Med. 1948. V. 88. P. 279–284.
- Brilis V., Briline T., Lencner H., Lencner A. A method for investigation of the adhesive process in microorganisms // Laboratornoe delo. 1968. № 4. P. 210–212.
- Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Bakhteyeva I.V., Anisimov A.P. Presence of the full lipopolysaccharide core structure is necessary for activation of plasminogen by *Yersinia pestis* // Probl. Espec. Danger. Infect. 2007. V. 93. P. 49–51.
- Dzyublyuk N.A., Varbanets L.D., Bulyhina T.V. Influence of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharides on the activity of *Bacillus* proteases // Mikrobiol. Z. 2018. V. 80. P. 27–35.
- Elif E., Bert B. Structural basis for activation of lipopolysaccharide // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 23971–23976.
- Jackson A.D., Smith V.J. LPS-sensitive protease activity in the cells of the solitary ascidian, *Ciona intestinalis* (L) // Compar. Biochem. Physiol. Part B. 1993. V. 106. P. 505–512.

- Kapaev R.R., Toukach P.V.* GRASS: semi-automated NMR-based structure elucidation of saccharides // *Bioinformatics*. 2018. V. 34. P. 957–963.
- Kapaev R.R., Egorova K.S., Toukach P.V.* Carbohydrate structure generalization scheme for database-driven simulation of experimental observables, such as NMR chemical shifts // *J. Chem. Inform. Model*. 2014. V. 54. P. 2594–2611.
- Knirel Y.A.* Structure of O-antigens // *Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells* / Eds. Knirel Y.A., Valvano M.A. Wien: Springer-Verlag, 2011. P. 41–115.
- Kohchi C., Inagawa H., Nishizawa T., Yamaguchi T., Nagai S., Soma G.* Applications of lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory // *J. Biosci. Bioeng*. 2006. V. 102. P. 485–496.
- Kramer R.A., Brandenburg K., Vandeputte-Rutten L., Werkhoven M., Gros P., Dekker N., Egmond M.R.* Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT // *Eur. J. Biochem*. 2002. V. 269. P. 1746–1752.
- Leontein K., Lonngren J.* Determination of the absolute configuration of sugars by gas-liquid chromatography of their acetylated 2-octyl glycosides // *Methods Carbohydr. Chem*. 1993. V. 9. P. 87–89.
- Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K.* A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of ^{13}C -n.m.r. data // *Carbohydr. Res*. 1988. V. 175. P. 59–75.
- Mandl I.* Collagenase // *Science*. 1970. V. 169. P. 1234–1238.
- Masada M.* Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // *Food Style*. 2004. V. 8. P. 92–95.
- Matseliukh O.V., Nidialkova N.A.* *Bacillus thuringiensis* elastases with insecticide activity // *Ukrainskyi biokhimichnyi zhurnal*. 1999. V. 84. P. 25–36.
- Muthannan A.R.* Determination of 50% endpoint titer using a simple formula // *World J. Virol*. 2016. V. 5. P. 85–86.
- Novak V.L., Oborin O.M.* Endogenous intoxication syndrome, sepsis and multiple organ failure: pathophysiological and clinical aspects of the problem (literature review) // *Zhurnal of AMN of Ukraine*. 2009. V. 15. P. 263–275.
- Ouchterlony O.* Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II // *Progr. Allergy*. 1962. V. 6. P. 30–154.
- Rylander R., Burrell R.* Endotoxins in inhalation research. Summary of conclusions of a workshop held at Clearwater, Florida, U.S.A., 28–30 September 1987 // *Annals Occupat. Hyg*. 1987. V. 32. P. 553–556.
- Salimuddin, Nagasaki A., Gotoh T., Isobe H., Mori M.* Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide // *Amer. J. Physiol*. 1999. V. 277. e110–e117.
- Schumann R.R., Belka C., Reuter D., Lamping N., Kirschning C.J., Weber J.R., Pfeil D.* Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells // *Blood*. 1998. V. 91. P. 577–584.
- Sugiyama N., Minami N., Ishii Y., Amano F.* Inhibition of Lon protease by bacterial lipopolysaccharide (LPS) through inhibition of ATPase // *Adv. Biosci. Biotechnol*. 2013. P. 590–598.
- Tagawa K., Yoshihara T., Shibata T., Kitazaki K., Endo Y., Fujita T., Koshihara T., Kawabata S.* Microbe-specific C3b deposition in the horseshoe crab complement system in a C2/factor B-dependent or -independent manner // *PLoS One*. 2012. V. 7. e36783.
- Toukach P.V., Egorova K.S.* Carbohydrate Structure Database merged from bacterial, archaeal, plant and fungal parts // *Nucl. Acids Res*. 2016. V. 44. P. D1229–D1236.
- Trent M.S., Ribeiro A.A., Lin S., Cotter R.J., Raetz C.R.* An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 43122–43131.
- Völksch B., Thon S., Jacobsen I.D., Gube M.* Polyphasic study of plant- and clinic associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential // *Infect. Genet. Evol*. 2009. V. 9. P. 1381–1391.
- Vorob'eva E.V., Krasikova I.N., Solov'eva T.F.* Influence of lipopolysaccharides and lipids A from some marine bacteria on spontaneous and *Escherichia coli* LPS-induced TNF- α release from peripheral human blood cells // *Biochemistry*. 2006. V. 71. P. 936–944.
- Wainstein M.P.* M100. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (29th ed.). Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- Walterson A.M., Stavrinides J., Pantoea:* insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae* // *FEMS Microbiol. Rev*. 2015. V. 39. P. 968–984.
- Westphal O., Jann K.* Bacterial lipopolysaccharide-extraction with phenol water and further application of procedure // *Methods in Carbohydrate Chemistry* / Ed. Roy L. Whistler. New York: Academic Press, Inc., 1965. V. 5. P. 83–91.
- Zdorovenko E.L., Kadykova A.A., Shashkov A.S., Varbanets L.D., Bulyhina T.V., Knirel Y.A.* Lipopolysaccharide of *Pantoea agglomerans* 7969: Chemical identification, function and biological activity // *Carbohydr. Polym*. 2017. V. 165. P. 351–358.
- Zdorovenko E.L., Kadykova A.A., Shashkov A.S., Varbanets L.D., Bulyhina T.V., Knirel Y.A.* Lipopolysaccharides of *Pantoea agglomerans* 7604 and 8674 with structurally related O-polysaccharide chains: Chemical identification and biological properties // *Carbohydr. Polym*. 2018. V. 181. P. 386–393.
- Zdorovenko E.L., Kadykova A.A., Shashkov A.S., Varbanets L.D., Bulyhina T.V.* *Pantoea agglomerans* P1a lipopolysaccharide: Structure of the O-specific polysaccharide and lipid A and biological activity // *Carbohydr. Res*. 2019. V. 484. P. 1067–1077.

Structure and Biological Properties of the O-Specific Polysaccharide and Lipid A from *Pantoea agglomerans* P324

E. L. Zdorovenko¹, A. A. Kadykova^{1,2}, A. S. Shashkov¹, L. D. Varbanets³,
T. V. Bulyhina^{3,*}, and P. V. Toukach¹

¹Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, High Chemical College, Moscow, 125047 Russia

³Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences, Kiev, 03143 Ukraine

*e-mail: tati20@ukr.net

Received May 8, 2020; revised July 8, 2020; accepted August 8, 2020

Abstract—The lipopolysaccharide (LPS) of a new *Pantoea agglomerans* strain P324 was studied by chemical and biological methods. Mild acid hydrolysis of the LPS resulted in lipid A and O-specific polysaccharide (OPS) fractions. Studies by negative-ion mode HR ESI mass spectrometry showed heterogeneity of the lipid A, the major form being a hexa-acylated derivative containing biphosphorylated GlcN disaccharide, four 14:0 (3-OH), one 18:0, and one 12:0 residues. The following structure of the OPS was elucidated by chemical, NMR, and computational methods: $\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow . The *P. agglomerans* P324 LPS showed a medium level of toxic and pyrogenic activities. Structural components of the LPS exhibited varying effects on the activity of *Bacillus* peptidases. Thus, the OPS and lipid A played a significant role in fibrin hydrolysis by *Bacillus* proteases but did not affect the activity of protease 2 of *B. thuringiensis* IMV B-7465 and protease 1 of *B. thuringiensis* IMV B-7324. Hydrolysis of elastin was intensified by the core oligosaccharide and lipid A. Hydrolysis of collagen in the presence of the isolated fractions was accompanied by inhibition of activity as compared to the native LPS.

Keywords: *Pantoea agglomerans*, lipopolysaccharide, structures of the O-specific polysaccharide and lipid A, NMR, activity of *Bacillus* peptidases

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ГАЛАКТОФУРАНАН КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ АКТИНОБАКТЕРИЙ
РОДА *PAENARTHROBACTER*

© 2020 г. Н. В. Потехина^{a, *}, А. С. Шашков^b, Е. М. Тульская^a, Е. В. Арискина^c,
Л. В. Дорофеева^c, Л. И. Евтушенко^c

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119192 Россия

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

^cВсероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: potekhina56@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2020 г.

После доработки 17.06.2020 г.

Принята к публикации 25.06.2020 г.

Изучен состав и структура гликополимеров клеточных стенок представителей рода *Paenarthrobacter* — *P. aurescens* ВКМ Ас-1105^T, *P. histidinovorans* ВКМ Ас-1978^T и *P. nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T, относившихся ранее к роду *Arthrobacter*. У всех исследованных штаммов выявлен нейтральный полисахарид — (1 → → 6)-связанный β-D-галактофуранан, почти полностью замещенный по гидроксилу при С-2 галактозы остатками 2,3-диацетиамидо-2,3-дидезокси-α-глюкопиранозы (α-GlcP-NAc3NAc). Кислотные гидролизаты клеточных стенок содержали галактозу, глюкозу, арабинозу, глюкозамин и галактозамин. Исследования проводили химическими и ЯМР-спектроскопическими методами. Структура галактофуранана не была описана ранее для представителей других родов актинобактерий. Полученные данные расширяют представления о химическом строении клеточных стенок микроорганизмов и могут быть востребованы в систематике актинобактерий, в частности, для дифференциации на уровне фенотипа и обоснования описания новых родов в составе семейства *Micrococcaceae*.

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

DOI: 10.31857/S0026365620060154

Изучение гликополимеров клеточных стенок микроорганизмов представляет интерес для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в том числе, таксономии микроорганизмов. Хотя система классификации прокариот во все большей мере базируется на данных геномики, сведения о фенотипических характеристиках, в частности, хемотаксономических, отражающих химический состав клеток и клеточных стенок, по-прежнему актуальны (Nouioui et al., 2018; Chun et al., 2018). Основным гликополимером клеточных стенок

грамположительных бактерий, как известно, является пептидогликан, характеризующийся высокой степенью структурного разнообразия (Schleifer, Kandler, 1972; Schumann, 2011). Типы (вариации) структур этого полимера являются важнейшими хемотаксономическими признаками таксонов актинобактерий различного ранга (Schumann, 2011; Schumann et al., 2009; Busse, 2016).

Помимо пептидогликана, клеточная стенка грамположительных бактерий обычно содержит гликополимеры иных типов, ковалентно связанные с пептидогликаном, которые часто называют вторичными гликополимерами (“secondary cell wall glycopolymers”) (Kohler et al., 2009; Schade, Weidenmaier, 2016). Последние представлены фосфатсодержащими гликополимерами — тейхоевыми кислотами и поли(гликозилфосфатами), а также бесфосфатными — тейхуроновыми и тейхулозоновыми кислотами или полисахаридами других типов (Kohler et al., 2009; Potekhina et al., 2011; Тульская и соавт., 2011; Schade, Weidenmaier, 2016;

Принятые сокращения: HSQC — протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; *J* (КССВ) — константа спин-спиновой взаимоделимости; ROESY — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY — корреляционная спектроскопия; TOCSY — тотальная корреляционная спектроскопия; НМВС — гетероядерная корреляция через несколько связей; TSP — натриевая соль 3-(триметилсил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты; δ_C, δ_H — значения химических сдвигов атомов ¹³C и ¹H соответственно.

Шашков и соавт., 2020а). Показано, что набор и структура вторичных гликополимеров являются специфичными для ряда изученных видов, родов и таксонов актинобактерий более высокого уровня (Takeuchi et al., 1990; Potekhina et al., 2011; Evtushenko, Ariskina, 2015; Magee, Ward, 2015; Goodfellow, 2015; Goodfellow, Jones, 2015; Nouioui et al., 2018; Busse, 2020; Шашков и соавт., 2020а).

Род *Paenarthrobacter* (семейство *Micrococcaceae*) включает 6 видов, которые ранее входили в состав рода *Arthrobacter* (группа “*Arthrobacter nicotinovorans*”) (Busse, 2016). Род предложен на основе филогенетической обособленности (16S рРНК) вошедших в него видов и их отличий от *Arthrobacter sensu stricto* и других близких родов по фенотипическим признакам, главным образом, хемотаксономическим (структура пептидогликана, состав изопреноидных хинонов и полярных липидов) (Busse, 2016). Представители рода *Paenarthrobacter* имеют пептидогликан АЗ α типа, вариация А11.17 (L-лизин в тетрапептидной цепочке, межпептидный мостик L-Ala–L-Thr–L-Ala) (Schumann et al., 2011; Busse, 2016). Сведения о вторичных гликополимерах этого рода фрагментарны. Для штаммов двух видов (*P. aurescens* и *P. ureafaciens*) показано отсутствие тейхоевых кислот и наличие нейтральных полисахаридов, структуры которых не установлены (Takeuchi, Yokota, 1989).

Целью настоящей работы было изучение структур вторичных гликополимеров клеточных стенок типовых штаммов трех видов рода *Paenarthrobacter* – *P. aurescens* (типовой вид рода), *P. histidinovorans* и *P. nicotinovorans*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы для исследований (*P. aurescens* ВКМ Ас-1105^T, *P. histidinovorans* ВКМ Ас-1978^T, *P. nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T и *Paenarthrobacter* sp. ВКМ Ас-2576) были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (www.vkm.ru).

Культуры выращивали аэробно при температуре 28°C до середины фазы логарифмического роста на пептонно-дрожжевой среде (г/л): пептон – 5, дрожжевой экстракт – 3, K₂HPO₄ – 0.2, глюкоза – 5; рН 7. Клеточные стенки получали методом дифференциального центрифугирования из клеток, разрушенных на ультразвуковом дезинтеграторе UP100H (“Hielscher”, Германия) при 30 кГц, 3–5 × 10 мин в ледяной воде; гликополимеры экстрагировали из клеточных стенок 10% ТХУ при 4°C (Potekhina et al., 2011).

Продукты кислотного гидролиза (2 М HCl, 3 ч, 100°C) препаратов клеточной стенки и гликополимеров идентифицировали методами хроматографии на бумаге и электрофореза с использованием различных систем растворителей и специфиче-

ских красителей (реактив Ишервуда, нингидрин, AgNO₃, анилин-фталат) (Potekhina et al., 2011).

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

ЯМР-спектры снимали на спектрометре Avance 600 (“Bruker”, Германия) для растворов препаратов в 99.96% D₂O при 30°C. Для отсчета химических сдвигов использовали внутренние стандарты TSP (δ_H 0.0) и ацетон (δ_C 31.45) при температуре 313 К. Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения фирмы “Bruker” (“Bruker Optik GmbH”, Германия). Время спин-лока в экспериментах ¹H, ¹H TOCSY составляло 100 мс. ¹H, ¹³C НМВС эксперименты были оптимизированы для КССВ 8 Гц.

Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование и анализ последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК штамма ВКМ Ас-2576 проводили как описано ранее (Ryzhmanova et al., 2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В кислотных гидролизатах клеточных стенок изученных штаммов (*P. aurescens* ВКМ Ас-1105^T, *P. histidinovorans* ВКМ Ас-1978^T, *P. nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T) и выделенных из них препаратов гликополимеров обнаружены в разных соотношениях галактоза, глюкоза, арабиноза, а также глюкозамин и галактозамин. Фосфорные эфиры глицерина и других полиолов или сахаров обнаружены не были, что указывало на отсутствие тейхоевых кислот и поли(гликозилфосфатов) и наличие бесфосфатных гликополимеров.

Препараты гликополимеров из клеточных стенок всех трех вышеупомянутых штаммов, исследованные методами ЯМР-спектроскопии, показали полную идентичность. Развернутое описание ЯМР-спектрометрического анализа приводится для препарата штамма *P. nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T.

Спектр ЯМР ¹³C (рис. 1) препарата гликополимера штамма ВКМ Ас-1988^T содержал в области резонанса аномерных атомов углерода три сигнала при δ_C 109.1 м.д. (минор), 107.3 м.д. и 97.3 м.д. В области резонанса атомов углерода, связанных с азотом, имелись два сигнала при δ_C 53.6 и 53.1 м.д. В сильном поле идентифицированы два сигнала метильных групп N-ацетатов (δ_C 23.0 и 23.3 м.д.), им соответствовали два сигнала карбонильных атомов углерода при δ_C 176.1 и 175.4 м.д. Остальные сигналы находились в области δ_C 88–62 м.д. В области резонанса протонов при аномерных атомах углерода в спектре ЯМР ¹H были видны два

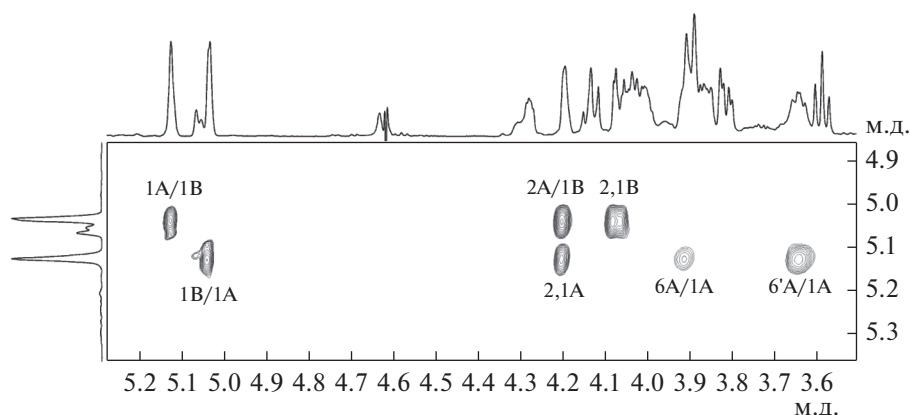


Рис. 2. Часть спектра $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY галактофурана из клеточной стенки *P. nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T. Соответствующие части ^1H ЯМР спектра показаны вдоль осей. Арабские цифры отнесены к атомам в остатках сахаров, обозначенных заглавными латинскими буквами, как показано в табл. 1.

Таким образом, все исследованные штаммы рода *Paenarthrobacter*, относящиеся к трем видам — *P. aurescens* (типовой вид рода), *P. histidinovorans* и *P. nicotinovorans*, и штамм Ас-2576, сходный по последовательности нуклеотидов гена 16S РНК с *P. aurescens* ВКМ Ас-1105^T, содержат в качестве вторичного гликополимера клеточной стенки галактофуранан с α -диаминоглюкозой в боковой цепи. Структура этого полимера установлена до настоящего времени только у представителей *Paenarthrobacter* и не описана у других прокариотных микроорганизмов. При этом, как отмечалось ранее (Takeuchi, Yokota, 1989) и показано нами, штаммы видов *Paenarthrobacter* (*P. aurescens*, *P. histidinovorans*, *P. nicotinovorans*, *P. ureafaciens*) не имеют

тейхоевых кислот или других фосфатсодержащих полимеров.

Интересно также отметить, что в клеточной стенке других видов *Paenarthrobacter* (*P. ilicis*, *P. nitroguaajacolicus* и *P. ureafaciens*), как и у штаммов, изученных в данной работе, содержится в значительном количестве галактоза (Keddie, Cure, 1978; Takeuchi, Yokota, 1989). Это может указывать как на наличие у них аналогичного галактофурана, так и другого галактозосодержащего полимера. Дальнейшее исследование представителей этих видов позволит выяснить, характерен ли идентифицированный галактофуранан для всех видов рода или он свойствен лишь части его видов.

Таблица 1. Химические сдвиги в спектрах ^{13}C и ^1H ЯМР галактофурана из клеточной стенки *P. nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T

Остаток	Химические сдвиги ^{13}C (δ_{C} ацетон 31.45) и ^1H (δ_{H} TSP 0.0)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6.6'
$\rightarrow 6)$ -D- β -Gal f -(1 \rightarrow 2) A	107.3 5.12	87.5 4.20	76.7 4.28	83.7 4.02	70.4 4.01	70.4 3.90, 3.64
\uparrow α -D-Glc p NAc3NAc-(1 B	97.3 5.03	52.8 ^a 4.06	53.3 ^b 4.13	68.9 3.58	74.0 3.86	61.7 3.86, 3.82
$\rightarrow 6)$ -D- β -Gal f -(1 \rightarrow A'	109.1 5.06	82.3 4.13	78.2 4.06	84.5 4.00	70.8 3.96	70.4 3.87, 3.81

^a NAc: δ_{C} 23.3; 176.1, δ_{H} 1.98.

^b NAc: δ_{C} 23.0; 175.4, δ_{H} 1.98.

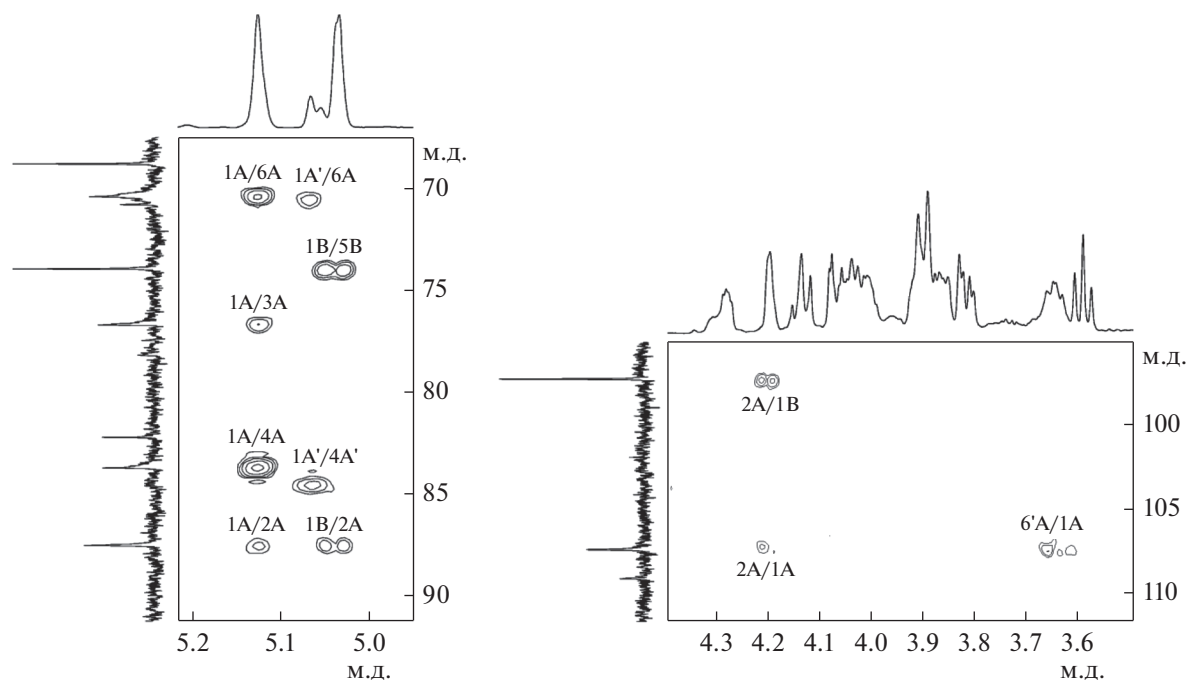


Рис. 3. Часть спектра ^1H , ^{13}C HMBC галактофуранана из клеточной стенки *P. nicotinovorans* ВКМ Ас-1988^T. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР спектров показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после — к углеродам в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами, как показано в табл. 1.

Немногочисленные изученные к настоящему времени представители ревизованного рода *Arthrobacter* (*A. globiformis*, *A. pascens*, *A. ramosus*) (Busse, 2016) и вид *Pseudarthrobacter oxydans* (ранее *A. oxydans*), имеющие, как и *Paenarthrobacter*, пептидогликан А3 α , также характеризуются наличием бесфосфатных полисахаридов (структуры которых не установлены) (Naumova et al., 1988; Takeuchi, Yokota, 1989). Исключение составляет *A. crystallopoietes*, содержащий в клеточной стенке тейхоевые кислоты (Naumova et al., 1988; Takeuchi, Yokota, 1989). Этот вид, однако, весьма удален филогенетически от типового вида рода, *A. globiformis* и, по данным Busse (2016), может рассматриваться как представитель нового рода.

В отличие от вышеупомянутых *Paenarthrobacter* и *Arthrobacter*, исследованные представители родов *Glutamicibacter* и *Paeniglutamicibacter* (ранее принадлежавшие к *Arthrobacter*) имеют пептидогликан А4 α типа и содержат в качестве вторичных гликополимеров тейхоевые кислоты и/или поли(гликозилфосфаты) (*G. mysorens*, *G. nicotiana*, *P. sulfureus*, *G. uratoxydans*, *G. protophormiae*) (Naumova et al., 1988; Takeuchi, Yokota, 1989; Потехина и соавт., 2012; Шашков и соавт., 20206).

Таким образом, в результате проведенных исследований получены новые данные о химическом составе клеточных стенок трех видов *Paenarthrobacter*.

У представителей рода обнаружен галактофуранан с α -диаминоглюкозой в боковой цепи, не описанный ранее у других прокариотных организмов. Показано, что этот полимер и набор сахаров кислотных гидролизатов клеточных стенок (галактоза, глюкоза, арабиноза, глюкозамин и галактозамин), а также отсутствие тейхоевых кислот и других фосфатсодержащих полимеров, характерны для трех изученных видов *Paenarthrobacter*. Полученные результаты могут быть востребованы в систематике прокариот для дифференциации родов актинобактерий на уровне фенотипа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Потехина Н.В., Шашков А.С., Сенченкова С.Н., Дорофеева Л.И., Евтушенко Л.И. Структура гексасахарид-1-фосфатного полимера *Arthrobacter uratoxydans* VKM Ac-1979^T // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 1546–1555.
- Potekhina N.V., Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Structure of hexasaccharide 1-phosphate polymer from *Arthrobacter uratoxydans* VKM Ac-1979^T cell wall // Biochemistry (Moscow). 2012. V. 77. P. 1294–1302.
- Тулская Е.М., Шашков А.С., Стрешинская Г.М., Сенченкова С.Н., Потехина Н.В., Козлова Ю.И., Евтушенко Л.И. Тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты актиномицетов // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 904–913.
- Tul'skaya E.M., Shashkov A.S., Streshinskaya G.M., Senchenkova S.N., Potekhina N.V., Kozlova Yu I., Evtushenko L.I. Teichuronic and teichulosonic acids of Actinomycetes // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 736–744.
- Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитренко А.С., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискунова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Рамноманнаны и тейхуроновая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T // Биохимия. 2020а. Т. 85. С. 428–437.
- Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Piskunkova N.F., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Rhamnomannans and teichuronic acid from cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T // Biochemistry (Moscow). 2020а. V. 85. P. 369–377.
- Шашков А.С., Тульская Е.М., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И., Потехина Н.В. Гликозил-1-фосфатные полимеры и тейхулозоновая кислота из клеточной стенки *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104^T // Биохимия. 2020б. Т. 85. С. 736–742.
- Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Potekhina N.V. Two glycosyl 1-phosphate polymers and teichulosonic acid from *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104^T cell wall // Biochemistry (Moscow). 2020b. V. 85. P. 629–635.
- Bock K., Pedersen C. Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
- Busse H.J. Family I. *Corynebacteriaceae* // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edn. / Eds. Whitman W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K.-I., Parte A. N.Y.: Springer-Verlag, 2012. V. 5. P. 244–245.
- Busse H.J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 9–37.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahall 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.
- Evtushenko L.I., Ariskina E.V. *Nocardioideaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. 2015. P. 1–18. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00042>
- Goodfellow M. *Nocardiaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. 2015. P. 1–5. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00014>
- Goodfellow M., Jones A.L. *Corynebacteriales* ord. nov. // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. 2015. P. 1–14. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00009>
- Keddie R.M., Cure G.L. Cell wall composition of coryneform bacteria // Special Publications of the Society for General Microbiology I. Coryneform Bacteria / Eds. Bousfield I.J., Cally A.G., London: Academic Press, 1978. P. 47–83.
- Kohler T., Xia G., Kulauzovic E., Peschel A. Teichoic acids, lipoteichoic acids, and related cell wall glycopolymers of Gram-positive bacteria // Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications / Eds. Moran A., Holst O., Brennan P., von Itzstein M. Amsterdam: Elsevier, 2009. P. 75–91.
- Lipkind G.M., Shashkov A.S., Mamyan S.S., Kochetkov N.K. The nuclear Overhauser effect and structural factors determining the conformations of disaccharide glycosides // Carbohydr. Res. 1988. V. 181. P. 1–12.
- Magee J.G., Ward A.C. *Mycobacterium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. 2015. P. 1–84. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00029>
- Naumova I.B. The teichoic acids of actinomycetes // Microbiol. Sci. 1988. V. 5. P. 275–279.
- Nouioui I., Carro L., Garcia-Lopez M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpidis N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Goker M. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
- Potekhina N.V., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Shashkov A.S. Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria // Taxonomy and Characterization, Methods in Microbiology / Eds. Rainey F.A., Oren A. London: Academic Press, 2011. V. 38. Ch. 6. P. 132–164.
- Ryzhmanova Y., Oshurkova V., Troshina O., Abashina T., Ariskina E., Avtukh A., Shcherbakova V. *Anoxynatronum buryatiense* sp. nov., an anaerobic alkaliphilic bacterium from a low mineralization soda lake in Buryatia, Russia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 4704–4709.
- Schade J., Weidenmaier C. Cell wall glycopolymers of firmicutes and their role as nonprotein adhesins // FEBS Lett. 2016. V. 590. P. 3758–3771.
- Schäffer C., Messner P. The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together // Microbiology (SGM). 2005. V. 151. P. 643–651.
- Shashkov A.S., Potekhina N.V., Kachala V.V., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. A novel galactofuranan from the cell wall of *Arthrobacter* sp. VKM Ac-2576 // Carbohydr. Res. 2012. V. 352. P. 215–218.

Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // *Bacteriol. Rev.* 1972. V. 36. P. 407–477.

Schumann P. Peptidoglycan structure // *Taxonomy of Prokaryotes, Methods in Microbiology* / Eds. Rainey F.A., Oren A. London: Academic Press, 2011. Ch. 6. V. 38. P. 101–129.

Schumann P., Kämpfer P., Busse H.J., Evtushenko L.I. Proposed minimal standards for describing new genera and

species of the suborder *Micrococccineae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 1823–1849.

Takeuchi M., Yokota A. Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1989. V. 35. P. 233–252.

Takeuchi M., Yokota A., Misaki A. Comparative structures of the cell-wall polysaccharides of four species of the genus *Microbacterium* // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1990. V. 36. P. 255–271.

Cell Wall Galactofuranan of the *Paenarthrobacter* Actinobacteria

N. V Potekhina^{1, *}, A. S. Shashkov², E. M. Tul'skaya¹, E. V. Ariskina³,
L. V. Dorofeeva³, and L. I. Evtushenko³

¹*Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119191 Russia*

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

³*All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: potekhina56@mail.ru

Received May 19, 2020; revised June 17, 2020; accepted June 25, 2020

Abstract—The composition and structure of cell wall glycopolymers of *Paenarthrobacter* species (*P. aurescens* VKM Ac-1105^T, *P. histidinovorans* Ac-1978^T, and *P. nicotinovorans* VKM Ac-1988^T, previously assigned to the genus *Arthrobacter*) was studied. All strains under study were found to contain a neutral polysaccharide, (1→6)-linked β-D-galactofuranan with the 2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-α-glucopyranose (α-Glc_pNAc₃NAc) residues that glycosylate most of the hydroxyl groups at C-2 of galactofuranose. Acid hydrolysates of the cell walls contained galactose, glucose, arabinose, glucosamine, and galactosamine. The polysaccharide structure was established by chemical and NMR spectroscopic methods. The galactofuranan structure has not been previously described for representatives of other *Actinobacteria* genera. The data obtained expand our understanding of the chemical structure of microbial cell walls and may be used in taxonomy of actinobacteria, especially to differentiate at the phenotype level and to justify the description of new genera in the family *Micrococcaceae*.

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