### СОДЕРЖАНИЕ

### Том 91, номер 3, 2022

#### **ОБЗОРЫ**

| пустыня деште-лут и ее микрооное разноооразие, недавние |  |
|---|--|
| и предполагаемые исследования                           |  |
|   |  |

Р. А. Федоров, И. В. Рыбакова, Н. Л. Белькова, Н. А. Лаптева

| М. С. Ширсалимиан, С. М. Мазиди, М. А. Амузегар   | 263 |
|---|-----|
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ  |     |
| Новый взгляд на механизм автотрофной ассимиляции $CO_2$ у зеленых серных бактерий   |     |
| Р. Н. Ивановский, Н. В. Лебедева, Т. П. Турова  | 274 |
| Геномные и физиологические характеристики галофильных бактерий родов <i>Halomonas</i> и <i>Marinobacter</i> из нефтяных пластов   |     |
| Т. П. Турова, Д. Ш. Соколова, Е. М. Семенова, А. П. Ершов, Д. С. Груздев, Т. Н. Назина  | 285 |
| Генетические детерминанты утилизации ксилана у планктомицета класса <i>Phycisphaerae</i> , <i>Humisphaera borealis</i> $M1803^T$  |     |
| Д. Г. Наумов, И. С. Куличевская, С. Н. Дедыш  | 300 |
| Гликополимеры клеточной стенки как диагностический признак Arthrobacter crystallopoietes  |     |
| Н. В. Потехина, Е. В. Арискина, А. С. Шашков, Е. М. Тульская, Л. И. Евтушенко   | 312 |
| Эффекты гормонов адреналина, норадреналина и эстрадиола на образование персистеров в культурах стафилококков, представителей микробиоты человека, и их устойчивость к голоданию и стрессу новой среды |     |
| Т. А. Панкратов, Ю. А. Николаев, А. В. Ганнесен, Г. И. Эль-Регистан   | 321 |
| Действие наночастиц углеродной природы с различной структурной организацией на биологические системы штамма <i>Escherichia coli</i> K12 TGI   |     |
| Е. В. Сорокина, Е. А. Образцова   | 334 |
| Биодеградация азокрасителя Methyl Red метаногенными микробными сообществами, выделенными из донных отложений реки Волга   |     |
| Ю. В. Тактарова, Л. И. Ширинкина, А. С. Будённая, М. А. Гладченко, И. Б. Котова   | 341 |
| Каскадная биоконверсия фитостерина в тестостерон штаммами<br>Mycolicibacterium neoaurum ВКМ Ac-1815Д и Nocardioides simplex ВКМ Ac-2033Д  |     |
| Д. Н. Текучева, В. В. Фокина, В. М. Николаева, А. А. Шутов, М. В. Карпов, М. В. Донова  | 353 |
| Анализ микробного сообщества манускрипта XI века культуральными и не использующими культивирование методами   |     |
| Н. Раисния, Е. Арефян, М. А. Амузегар   | 364 |
| Структурно-функциональная характеристика бактериальных обрастаний тростника южного <i>Phragmites australis</i> (Cav.) в Рыбинском водохранилище   |     |

376

### **Contents**

#### Vol. 91, No. 3, 2022

| Reviews   |     |
|---|-----|
| The Lut Desert and Its Microbial Diversity: Recent Studies and Future Research  |     |
| M. S. Shirsalimian, S. M. Mazidi, and M. A. Amoozegar   | 263 |
| Experimental Articles   |     |
| A New Approach to the Mechanism of Autotrophic CO <sub>2</sub> Assimilation in Green Sulfur Bacteria  |     |
| R. N. Ivanovsky, N. V. Lebedeva, and T. P. Tourova  | 274 |
| Genomic and Physiological Characterization of Halophilic Bacteria of the Genera <i>Halomonas</i> and <i>Marinobacter</i> from Petroleum Reservoirs  |     |
| T. P. Tourova, D. S. Sokolova, E. M. Semenova, A. P. Ershov, D. S. Grouzdev, and T. N. Nazina   | 285 |
| Genetic Determinants of Xylane Utilization in <i>Humisphaera borealis</i> M1803, a Planctomycete of the Class <i>Phycisphaerae</i>  |     |
| D. G. Naumoff, I. S. Kulichevskaya, and S. N. Dedysh  | 300 |
| Cell Wall Glycopolymers as a Diagnostic Trait of Arthrobacter crystallopoietes  |     |
| N. V. Potekhina, E. V. Ariskina, A. S. Shashlov, E. M. Tul'skaya, and L. I. Evtushenko  | 312 |
| Effect of Epinephrine, Norepinephrine, and Estradiol on Persister Formation in the Cultures of Staphylococci from the Human Microbiota and Their Resistance to Starvation and New Medium Stresses |     |
| T. A. Pankratov, Yu. A. Nikolaev, A. V. Gannesen, and G. I. El'-Registan  | 321 |
| Effect of Carbon Nanoparticles with Different Structural Organization on the Biological Systems of <i>Escherichia coli</i> K12 TGI  |     |
| E. V. Sorokina and E. A. Obraztsova   | 334 |
| Biodegradation of the Methyl Red Azo Dye by Methanogenic Microbial Communities Isolated from Volga River Sediments  |     |
| Yu. V. Taktarova, L. I. Shirinkina, A. S. Budennaya, M. A. Gladchenko, and I. B. Kotova   | 341 |
| Cascade Biotransformation of Phytosterol to Testosterone by <i>Mycolicibacterium neoaurum</i> VKM Ac-1815D and <i>Nocardioides simplex</i> VKM Ac-2033D Strains                                   |     |

Microbial Community of an 11th Century Manuscript by Both Culture-Dependent and Independent Approaches

N. Raeisnia, E. Arefian, and M. A. Amoozegar 364

353

376

Structural and Functional Characterization of Bacterial Biofilms Formed on *Phragmites australis* (Cav.) in the Rybinsk Reservoir

R. A. Fedorov, I. V. Rybakova, N. L. Belkova, and N. A. Lapteva

D. N. Tekucheva, V. V. Fokina, V. M. Nikolaeva, A. A. Shutov,

M. V. Karpov, and M. V. Donova

## ПУСТЫНЯ ДЕШТЕ-ЛУТ И ЕЕ МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ: НЕДАВНИЕ И ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2022 г. М. С. Ширсалимиан<sup>а</sup>, С. М. Мазиди<sup>b</sup>, М. А. Амузегар<sup>c, \*</sup>

<sup>a</sup>Quality Control Department, Production and Development of Cyclotron Radiopharmaceuticals, Pars Isotope Company, Karaj, Iran

<sup>b</sup>Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

<sup>c</sup>Extremophiles Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

> \*e-mail: amozegar@khayam.ut.ac.ir Поступила в редакцию 21.01.2022 г. После доработки 28.01.2022 г. Принята к публикации 30.01.2022 г.

Пустыни покрывают значительную часть земной поверхности. Несмотря на стрессовые условия, в пустынях могут обитать разнообразные микробные популяции, в том числе экстремофилы. Замечательные адаптивные возможности экстремофилов привели к их широкому использованию в биотехнологии и медицине. Изучение микробного разнообразия в аридных местообитаниях может также привести к открытию новых источников биологически активных метаболитов. Пустыня Деште-Лут в восточной части Ирана — одно из самых сухих и жарких мест в мире, где присутствуют уникальные геологические феномены. Настоящий обзор описывает предыдущие работы по изучению микробного разнообразия в пустыне Деште-Лут и их возможное практическое применение.

**Ключевые слова:** аридные местообитания, пустыня Деште-Лут, микробное разнообразие, экстремофилы

**DOI:** 10.31857/S0026365622300012

Аридные местообитания находятся в числе самых распространенных биомов на земной суше (свыше 47.2%) (Neilson et al., 2012). Эти местообитания характеризуются низкой доступностью воды, определяемой как соотношение количества осадков (Р) и потенциальной эвапотранспирации (ЕТ) (Rao et al., 2016). В полупустынных районах величина Р/РЕТ обычно составляет 0.2—0.5, а в пустынных 0.2—0.05. В экстремально аридных зонах значения Р/РЕТ ниже 0.05 при среднегодовом количестве осадков менее 25 мм (Azua-Bustos et al., 2012; Wierzchos et al., 2012; Rao et al., 2016).

Помимо недостатка воды, для аридных местообитаний (пустынь) часто характерны и другие виды экстремальных условий, включая перепады температур, высокий уровень инсоляции, низкая концентрация органического вещества и высокая соленость (Chanal et al., 2006). Однако микробная жизнь сумела адаптироваться к экстремальным условиям пустынь, и микроорганизмы были обнаружены в различных экологических нишах, включая литобионтные местообитания (Wierzchos et al., 2012), почву и поверхностные пески (Rainey et al., 2005; Chanal et al., 2006; Drees et al., 2006; Neilson et al., 2012; Rao et al., 2016), а также галитные эвапориты (Shirsalimian et al., 2017).

Экстремофилы — это организмы, адаптированные к условиям экстремальных местообитаний, враждебным или даже смертельным для других форм жизни. Их можно подразделить на две категории: собственно экстремофилы, для роста которых требуется один или несколько экстремальных факторов, и экстремотолерантные организмы, способные переносить воздействие экстремальных факторов, но требующие "нормальных" условий для оптимального роста. Разнообразные экстремофилы принадлежат ко всем трем доменам: Васteria, Archaea и Eukarva; последние в основном представлены микроорганизмами (Orellana et al., 2018). Жаркие сухие пустыни находятся в числе экосистем, откуда часто выделяют экстремофилы, включая ксерофилы, термофилы, галофилы и микроорганизмы, устойчивые к ионизирующей радиации.

Большая часть современных исследований по микробиологии аридных местообитаний проводилась в пустыне Атакама (север Чили), старейшей и самой сухой пустыне в мире (Azua-Bustos et al., 2012). Кроме того, в нескольких обзорах описаны

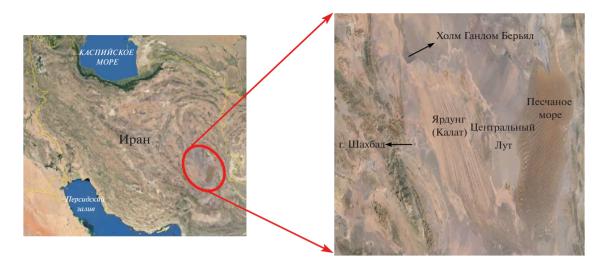


Рис. 1. Пустыня Деште-Лут (обозначена овалом) и окружающие области.

микробное разнообразие и абиотические условия других пустынь (Rainey et al., 2005; Chanal et al., 2006; Rao et al., 2016).

Пустынные регионы Ирана занимают приблизительно 0.33 млн квадратных километров, т.е. 20% от общей площади страны (Emadodin et al., 2019). Две главные пустыни Ирана — это Деште-Кевир и Деште-Лут. Пустыня Деште-Лут имеет площадь примерно 51 800 км<sup>2</sup> и известна исключительной сухостью: менее 30 мм осадков в год (Azarderakhsh et al., 2019; Lyons et al., 2020). Πο классификации Worldwide Bioclimatic Classification System (WBCS), пустыня Деште-Лут принадлежит к числу тропических гиперпустынных (tropical hyperdesertic) местообитаний — самых сухих и жарких в мире (Lyons et al., 2020). В последние годы несколько работ было посвящено изучению микроорганизмов, адаптированных к экстремальным условиям пустыни Деште-Лут. Большое внимание в этот период уделялось и изучению биоразнообразия животных в пустыне Деште-Лут (Zamani, Marusik, 2018; Schwentner et al., 2020).

Цель данного обзора — описать разнообразие экстремофильных микроорганизмов в этой пустыне и сравнить его с микроорганизмами, выделенными из иных гипераридных местообитаний.

#### ГЕОЛОГИЯ ПУСТЫНИ ДЕШТЕ-ЛУТ

Пустыня Деште-Лут расположена между 28° и 32° с.ш. на юго-востоке Ирана. Название "Деште-Лут" означает "голый, лишенный растительности". Она граничит с провинциями Южный Хорасан, Систан и Белуджистан и Керман (рис. 1). В пустыне Деште-Лут находятся замечательные пустынные геоморфологические феномены (Yazdi et al., 2014). В 2016 г. пустыня Деште-Лут была включена в список Всемирного наследия

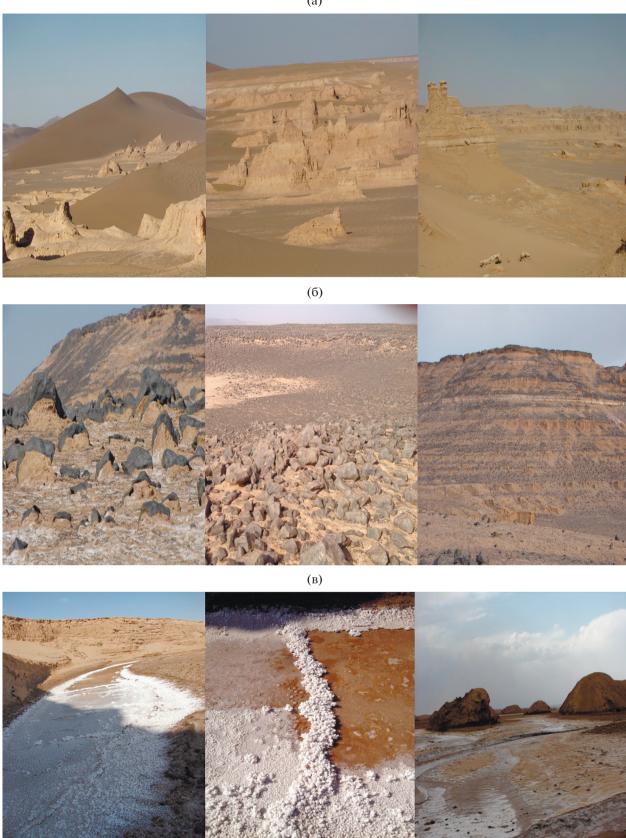
ЮНЕСКО в качестве первого природного объекта в Иране.

#### Геологические феномены

Центральная часть пустыни Деште-Лут расположена между Песчаным морем (Rig-e Yalan) на востоке и ярдангами (Калат) на западе. В этом районе находится нижняя точка страны (185 м выше уровня моря). Самые большие ярданги в мире расположены в западной части центрального Лута, в 43 км от г. Шахбад в провинции Керман (рис. 2). Ярданги представляют собой крупные образования из песчаника, возникающие в засушливых местностях в результате ветровой и водной эрозии. Большую роль в их образовании играют сильные местные ветры восточной части Ирана (120-дневный ветер). Издали Калат напоминают чужую планету. Набхи – это покрытые растительностью выпуклые песчаные дюны, образующиеся при захвате песка корнями деревьев. Они встречаются на западном краю пустыни Деште-Лут, где уровень подземных вод высок или достаточно влаги, чтобы поддерживать рост растений. В пустыне Деште-Лут набхи достигают высоты до 10 м и, возможно, являются крупнейшими в мире. Кроме того, одна из крупнейших песчаных дюн находится в восточной части Центрального Лута (Yazdi et al., 2014).

Покрытое лавой плато Гандом Берьян (Gandom Beryan) — это большой черный холм площадью около 200 км<sup>2</sup>, расположенный в 80 км к северу от города Шахдад. Скалы плато происходят из окружающих его вулканических кратеров. Черный цвет пород приводит к тому, что плато Гандом Берьян поглощает значительное количество солнечного излучения (Shirsalimian et al., 2018). В результате чего температура варьирует от 65°С в

(a)



**Рис. 2.** Геологические зоны пустыни Деште-Лут Desert: Калат, западная часть центрального Лута (а); плато Гандом Берьян, черный холм, покрытый лавой (б); Руд-э Шур, соленая река в пустыне Деште-Лут (в). Фотографии М.А. Amoozegar и M.S. Shirsalimian.

тени до примерно 100°C на черных вулканических породах в летнее время (Yazdi et al., 2014). Постоянная соленая река с местным названием Руд-э Шур (Rud-e Shoor) протекает в сердце пустыни Деште-Лут. Эта река берет начало на северо-западе региона, пересекает окраины Калата и заканчивается в солевой шахте в Шахбаде (Yazdi et al., 2014; Lyons et al., 2020) (рис. 2).

#### Самое жаркое место на Земле

Пустыня Деште-Лут — один из кандидатов на звание "самого жаркого места на Земле". По данным температуры земной поверхности (LST), полученным с помощью спектрорадиометра умеренного разрешения (MODIS), установленного на спутнике "Аква" (HACA), в 2005 г. поверхность некоторых участков пустыни Деште-Лут к востоку от Калата имела температуру свыше 70°С (Yazdi et al., 2014; Azarderakhsh et al., 2019; Lyons et al., 2020). Более позднее исследование (2018 г.) показало еще более высокие значения LST с максимумом 80.83°С (Azarderakhsh et al., 2019).

#### ЭКСТРЕМОФИЛЫ ПУСТЫНИ ДЕШТЕ-ЛУТ

#### Плато Гандом Берьян

Плато Гандом Берьян — лишь одно из числа геологических феноменов пустыни Деште-Лут. Физико-химические свойства почвы плато Гандом Берьян были описаны ранее. Общее содержание органического углерода (ТОС) было очень низко (1430 мкг/г), то есть условия в этой области были олиготрофными (Shirsalimian et al., 2018). Значения ТОС для образцов из других пустынь — Атакама (Чили), Мохаве (США) и Сахара (Африка) — составляли соответственно 560—765, 7000 и 1700 мкг/г (Lester et al., 2007).

При исследовании разнообразия культивируемых радиационно-устойчивых бактерий использовали устойчивость к обезвоживанию в качестве селективного фактора. На основании анализа последовательностей их 16S рРНК генов, два изолята неспорообразующих пигментированных бактерий, выделенные из грунта и поверхностных песков плато Гандом Берьян, были идентифицированы как Modestobacter muralis (штамм A2) и Maritalea mobilis (штамм В9) (Shirsalimian et al., 2018). Род *Modestobacter* принадлежит к семейству Geodermatophilaceae, члены которого способны колонизировать такие экологические ниши, как почвы Антарктиды и жарких пустынь, высокогорные почвы и породы, и исторические памятники (Busarakam et al., 2016). Уровень устойчивости к обезвоживанию (до 8 нед. в эксикаторе с силикагелем) для *Modestobacter* sp. A2 выживания) был даже выше, чем для Deinococcus radiodurans R1, классического организма, устойчивого к обезвоживанию (15% выживания).

Сравнение устойчивости к обезвоживанию у штамма A2 и штамма Modestobacter multiseptatus ВС501, изолированного из Каррарской пещеры в Италии (Gtari et al., 2012), показало значительно большую устойчивость штамма А2 в сравнении со штаммом BC501 (10% выживания). Modestobacter sp. А2 был умеренно устойчив к у-излучению, со значениями  $D_{10}$  от 3 до 4 кГр. Значение  $D_{10}$  для микроорганизмов определяется как доза радиации, вызывающая 90% снижение числа колониеобразующих единиц. Бактерии с  $D_{10} > 1$  кГр считаются радиационно-устойчивыми (Guesmi et al., 2020). Штамм Maritalea sp. В9 сохранял жизнеспособность после 8 нед. обезвоживания (0.15% выживания) и был умеренно устойчив к ү-излучению, со значениями  $D_{10}$  от 2 до 3 кГр. Это было первое сообщение об устойчивости члена рода Maritalea (семейство Hyphomicrobiaceae) к ү-излучению и обезвоживанию (Shirsalimian et al., 2018).

Еще один бактериальный штамм, устойчивый к у-излучению и обезвоживанию (А10), был выделен в работе Shirsalimian et al. (2016). Анализ последовательностей 16S pPHK гена штамма A10 показал, что его ближайшим родственником является Kocuria polaris. Этот штамм сохранял жизнеспособность (0.7% выживших клеток) после 4 нед. обезвоживания. Величина  $D_{10}$  для *Косигіа* sp. А10 составляла 4.5-5 кГр. При у-облучении (2 кГр) уровень устойчивости штамма *Kocuria* sp. A10 был в 5 раз выше, чем у штамма Kocuria sp. ASB 107, выделенного из радиоактивного источника Аб-э Сшах в Рамсаре, Мазандаран, Иран (Asgarani et al., 2012; Shirsalimian et al., 2016). Θκвивалентная доза в окрестностях источника составляла примерно  $13.48 \text{ мк}3\text{в ч}^{-1}$  (Dabbagh et al., 2007). Сравнение уровней радиационной устойчивости двух штаммов Kocuria указывает на то, что условия в пустыне Деште-Лут в большей мере способствовали эволюции радиационно-устойчивых бактерий, чем условия радиоактивного источника Аб-э Сиах. Иными словами, эти результаты можно рассматривать как очередное подтверждение "гипотезы адаптации к обезвоживанию". Она предполагает, что обезвоживание создает эволюционное давление, благоприятствующее развитию устойчивого к радиации фенотипа, поскольку пустыни встречаются на поверхности Земли чаще, чем местообитания с повышенным уровнем ионизирующей радиации (Mattimore, Battista, 1996; Kottemann et al., 2005; Slade, Radman, 2011). Как ионизирующее излучение, так и обезвоживание приводят к образованию активных форм кислорода (АФК), что вызывает оксидативный стресс. Ключевую роль в ответе на оксидативный стресс играют разнообразные защитные механизмы, включая эффективные системы репарации ДНК, пигменты (например, каротиноиды), антиоксидантные ферменты (каталаза, суперок-

**Устойчивость** Устойчивость Микроорганизм Источник Ссылка к ү-излучению к обезвоживанию  $D_{10} = 4.5 - 5 \text{ } \text{K}\text{Tp}$ <1% выживания\* Песчаные дюны пустыни Shirsalimian et al., Kocuria polaris A10 Деште-Лут, Иран 2016 Rainey et al., 2005 Kocuria sp. Выделен из почвы H.o. Почва пустыни Сонора, после облучения США 5-9 кГр  $D_{10} = 2.9 \text{ kFp}$ Kocuria rhizophila PT10 77.3% выживания\*\* Guesmi et al.. Облученные корни ксерофита Panicum turgidum, 2020 Сахара, Тунис

**Таблица 1.** Устойчивость к ү-излучению и обезвоживанию для штаммов *Kocuria*, выделенных из пустынь

Н.о. – не определяли.

сид дисмутаза, пероксидазы) и Mn<sup>2+</sup>-содержащие антиоксидантные комплексы (Slade, Radman, 2011). Профили устойчивости штаммов *Косигіа* выделенных из пустынных субстратов приведены в табл. 1.

В другой работе сообщается о выделении двух устойчивых к радиации штаммов *Deinococcus* spp., (LD4 и LD5) из образца почвы, отобранного в пустыне Деште-Лут. Эти штаммы были устойчивы к  $\gamma$ -излучению (>15 кГр). Значения  $D_{10}$  для штаммов LD4 и LD5 были, соответственно, 7.15 и 5.94 кГр. Оба штамма были также устойчивы к УФ излучению в дозах >600 Дж м $^{-2}$  (Mohseni et al., 2014). Эти значения сопоставимы с описанными для других пустынных штаммов *Deinococcus* (табл. 2).

Биотехнологическое использование термофильных микроорганизмов, растущих при температурах выше 45°C, привлекает в наше время все большее внимание. Преимущества промышленного применения термофилов, продуцирующих термостабильные внеклеточные ферменты, включают меньший риск микробного загрязнения, лучшую растворимость субстратов при повышенных температурах и более высокие массообменные характеристики. Пустыни и подобные аридные экосистемы считаются местообитаниями, благоприятствующими выделению термофильных микроорганизмов (Orellana et al., 2018). Shahsavari et al. (2021) выделили термофильный штамм Bacillus licheniformis на плато Гандом Берьян и охарактеризовали его. Эта бактерия проявляла целлюлолитическую, амилолитическую, липолитическую, протеолитическую и аспарагинолитическую активность при 55°C. Максимальная продукция целлюлазы (17.5 ед./мл) наблюдалась при рН 7-8 на агаре с 1% карбоксиметил целлюлозы после 72 ч культивирования. Максимальная амилолитическая активность (4 ед./мл) наблюдалась в щелочных условиях (рН 9) спустя 72 ч на агаризованной среде с крахмалом. Исследование липолитической активности при различных значениях рН выявило оптимум при рН 8.5 (19 ед./мл). Наибольшая активность протеиназы (117 ед./мл) была отмечена при рН 10 после 48 ч культивирования на молочном агаре. Было показано, что оптимальная продукция аспарагиназы происходила при рН 8 после 72 ч культивирования (4 ед./мл) (Shahsavari et al., 2021).

#### Руд-э Шур

Галофилы — микроорганизмы, адаптированные к существованию при высоких концентрациях соли. Галофилы подразделяются на группы в соответствии с оптимальными концентрациями соли для их роста. Почти все экстремальные галофилы принадлежат к галофильным археям (галоархеям) из семейства Halobacteriaceae; их наилучший рост происходит при концентрациях NaCl от 2.5 до 5.2 М (насыщение) (Oren, 2008). Гиперсоленые местообитания типичны для аридных условий. Кроме высокой концентрации соли, на их биоразнообразие влияют такие факторы, как высокая либо низкая температура, осмотическое давление, низкая доступность питательных веществ, ограниченный доступ кислорода, циклы обезвоживания/регидратации и солнечное излучение (Ventosa, 2006).

Хотя биоразнообразие микробных сообществ в соленых экосистемах Ирана изучено сравнительно хорошо (Safarpour et al., 2018), первое исследование микроорганизмов Руд-э Шур с использованием культуральных методов было выполнено Shirsalimian et al. в 2017 г. Общая соленость в Руд-э Шур составляет 134.3 г л<sup>-1</sup>, что в 4 раза выше солености морской воды. Основными ионами являются Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> (Shirsalimian et al., 2017). Экстремальные галофилы были выделены из засоленной почвы и кристаллов соли с использованием среды, содержащей 23% соли. Было получено 219 колоний галофильных архей. Применение устойчивости к

<sup>\* 4</sup> нед. в эксикаторе с силикагелем.

<sup>\*\* 4</sup> нед. в эксикаторе с безводным CaSO<sub>4</sub>.

| мира                          |  |
|-------------------------------|--|
| устынь.                       |  |
| из п.                         |  |
| s, выделенных из пустынь мира |  |
| ccus                          |  |
| Деіпосс                       |  |
| у штаммов Л                   |  |
| Ф-излучению                   |  |
| УФ-                           |  |
| /- И                          |  |
| вость к                       |  |
| Устойчи                       |  |
| a 2. )                        |  |
| Таблиц                        |  |
|                               |  |

| -  | •   |   |                                      |                       |
|--|---|---|--------------------------------------|-----------------------|
| Микроорганизм  | Устойчивость к ү-излучению                                    | Устойчивость к УФ излучению   | Пустыня                              | Ссылка                |
| Deinococcus sp. LD4  | $>15 \text{ K} \Gamma p \ (D_{10} = 7.15 \text{ K} \Gamma p)$ | $>600  \mathrm{Lm}  \mathrm{m}^{-2}$  | Деште-Лут                            | Mohseni et al., 2014  |
| Deinococcus sp. LD5  | $>15 \text{ K}\Gamma p \ (D_{10} = 5.94 \text{ K}\Gamma p)$   | $>600  \mathrm{Lm}  \mathrm{m}^{-2}$  | Деште-Лут                            | Mohseni et al., 2014  |
| Deinococcus hohokamensis KR- $40^{\mathrm{T}}$                           | >10 кГр   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus navajonensis KR-114 <sup>T</sup>                             | >10 KГp   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus apachensis KR-36 <sup>T</sup>                                | >10 KГp   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus hopiensis KR-140 <sup>T</sup>                                | >10 кГр   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus sonorensis KR-87 <sup>T</sup>                                | >10 KГp   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus yavapaiensis KR-236 <sup>T</sup>                             | >10 кГр   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus papagonensis KR-241 <sup>T</sup>                             | >10 кГр   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus pimensis KR-235 <sup>T</sup>                                 | >10 KГp   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus maricopensis LB-34 <sup>T</sup>                              | >10 KГp   | Н.о.  | Сонора, США                          | Rainey et al., 2005   |
| Deinococcus gobiensis $I$ - $0^{T}$                                      | >15 кГр   | $>600  \mathrm{Дm}  \mathrm{m}^{-2}$  | Гоби, КНР                            | Yuan et al., 2009     |
| Deinococcus deserti VCD115 <sup>T</sup>                                  | 23.0% выживших при 7.5 кГр                                    | 73.0% выживания при 250 Дж м $^{-2}$ >1.0% выживания при 750 Дж м $^{-2}$       | Сахара, Марокко и Тунис              | de Groot et al., 2005 |
| Deinococcus deserti VCD117   | 6.0% выживших при 7.5 кГр                                     | $11.0\%$ выживания при 250 Дж м $^{-2}$   | Сахара, Марокко и Тунис              | de Groot et al., 2005 |
| Deinococcus sp. VCT102   | $D_{10}=11\;\kappa\Gamma p$                                   | Н.о.  | Татавин, юг Туниса                   | Chanal et al., 2006   |
| Deinococcus sp. VCT111   | $D_{10} = 12 \text{ kTp}$                                     | Н.о.  | Татавин, юг Туниса                   | Chanal et al., 2006   |
| Deinococcus sp. RCML-5   | $D_{10}=7~\text{k}\Gamma p$                                   | Н.о.  | Такла-макан, КНР                     | Yu et al., 2015       |
| Deinococcus taklimakanensis $X-121^T$ 7.0% выживших при $10 \text{ кГр}$ | 7.0% выживших при 10 кГр                                      | $2.3\%$ выживания при 460 Дж м $^{-2}$  | Такла-макан, КНР                     | Liu et al., 2017      |
| Deinococcus peraridilitoris KR- $200^{ m T}$                             | >10 KΓp   | Н.о.  | К северу от Антофагасты,<br>Чили     | Rainey et al., 2007   |
| Deinococcus xinjiangensis X-82 $^{\mathrm{T}}$                           | 1-0.5% выживания при 5 кГр                                    | $1-0.5\%$ выживания при $5~{ m KFp}$ $1.7\%$ выживания при $810~{ m Дж~m}^{-2}$ | Такла-макан, КНР                     | Peng et al., 2009     |
| Deinococcus saudiensis YIM F-302 <sup>T</sup>                            | 44.0% выживших при 5 кГр                                      | 33.5% выживания при 5 Дж м $^{-2}$  | Я́нбу-эль-Бахр,<br>Саудовская Аравия | Hussain et al., 2016  |
| Deinococcus saudiensis YIM F-235   | 14.0% выживших при 5 кГр                                      | 25.6% выживания при 5 Дж м $^{-2}$  | Я́нбу-эль-Бахр,<br>Саудовская Аравия | Hussain et al., 2016  |
| Н.о. – не определяли.  |   |   |                                      |                       |

МИКРОБИОЛОГИЯ том 91 № 3 2022

обезвоживанию для скрининга устойчивых к радиации штаммов выявило, что 11 изолятов сохраняли жизнеспособность после 35 сут в эксикаторе с силикагелем. Три из них, принадлежавшие к видам Haloterrigena jeotgali (штамм MS2), Natrialba aegyptia (штамм MS17) и Natrinema pallidum (штамм MS50), выживали после 8 нед. в эксикаторе с силикагелем и были устойчивы к ү-излучению ( $D_{10}$  от 2 до 3 кГр). Штамм MS17 выдерживал до 6 кГр, а штаммы MS2 и MS50 теряли жизнеспособность после дозы облучения 5 или 6 кГр. Это ниже, чем значение  $D_{10}$ , известное для хорошо изученной галофильной археи Halobacterium sp. NRC-1 (5 кГр). В отличие от изолятов галофильных архей из Руд-э Шур, выживаемость штамма Halobacterium sp. NRC-1 медленно снижалась (до 25%) после 20 сут в печи с 36 г высушивающего средства Drierite (Kottemann et al., 2005).

Относительно обезвоживания было установлено, что галофильные археи лучше адаптированы к периодическому и продолжительному обезвоживанию, чем Deinococcus radiodurans: после 7 сут в эксикаторе выживаемость последнего резко снизилась (<10%), в то время как у всех трех штаммов архей выживаемость почти не менялась даже в течение следующих 49 сут. Члены семейства Halobacteriacaea или их 16S рРНК гены часто выявляли в древних соляных залежах возрастом в миллионы лет (Mattimore, Battista, 1996; Schubert et al., 2010; Stan-Lotter, Fendrihan, 2015). Клетки галофильных архей, выявленные во включениях рассола в кристаллах соли, были адаптированы к экстремальным условиям: очень высокая ионная сила, обезвоживание и недостаток питательных веществ (Stan-Lotter, Fendrihan, 2015). Включения рассола в гиперсоленых местообитаниях создают защитный барьер против у-излучения (Kottemann et al., 2005). Важно отметить, что каждое открывание и закрывание эксикатора запускает очередной цикл обезвоживания/регидратации (Mattimore, Battista, 1996). Периодическое испарение воды с последующим отложением солей подвергает галофильные микроорганизмы обезвоживанию и вызывает повреждения ДНК (Kottemann et al., 2005). Ответственность за устойчивость *Halobac*terium sp. NRC-1 к окислительному стрессу, вызванному обезвоживанием или ү-излучением, возлагали на мембранные пигменты (бактериоруберин), высокую внутриклеточную концентрацию КС1 и эффективные системы репарации ДНК (Shahmohammadi et al., 1998; Kottemann et al., 2005).

В ходе аналогичного исследования разнообразные галофильные сообщества были выделены из пустыни Саганд на северо-западе пустыни Деште-Лут. Анализ последовательностей 16S рРНК генов выявил принадлежность изолятов галофильных архей к родам *Natrinema* и *Haloarcula*; га-

лофильные бактерии принадлежали к родам *Halomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus* и *Gracilibacillus*.

Таким образом, пустыня Деште-Лут может считаться идеальным местом для изучения полиэкстремофилов (Salari et al., 2020).

# ПУСТЫННЫЕ ПОЧВЫ КАК ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Поиск новых биологически активных соединений привлекает все возрастающий интерес. Аридные экосистемы относятся к предпочтительным для выделения новых микроорганизмов, продуцирующих природные метаболиты. Одной из наиболее многочисленных групп микроорганизмов в почвах пустынь являются *Actinobacteria*, производящие 45% всех биологически активных метаболитов (Ouchari et al., 2019).

В нашей работе (Mazkour et al., 2017) актиномицеты были выделены из трех локаций плато Гандом Берьян; для семи штаммов была изучена антимикробная активность. Бесклеточные супернатанты культур этих штаммов оказались неэффективны против исследованных патогенных бактерий (Escherichia coli, Salmonella typhimurium и Staphylococcus aureus), а их максимальное ингибирующее действие на Bacillus cereus, определенное методом диффузии в агаре, составляло  $33.1 \pm 1.19\%$  (Mazkour et al., 2017).

Fatahi-Bafghi et al. (2019) исследовали пустыню Деште-Лут в целях поиска новых актиномицетов продуцентов антибиотиков. Из 24 локаций были выделены 42 штамма актиномицетов с использованием различных сред: агар для выделения актиномицетов, крахмал-казеиновый агар, мясо-пептонный агар и среда Сабуро с декстрозой. Из 42 изолятов, 8 были идентифицированы с помощью секвенирования 16S pPHK генов как члены родов Micromonospora (5 изолятов), Streptomyces (1 изолят), Saccharothrix (1 изолят) и Cellulomonas (1 изолят). Эти изоляты проявляли активность в отношении антибиотикоустойчивых микроорганизмов, включая Enterococous faecium, Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae и метициллин-устойчивого Staphylococcus aureus. Авторы заключили, что в пустыне Деште-Лут, с ее огромными неисследованными территориями, возможно выделение разнообразных актиномицетов, продуцирующих антибиотики (Fatahi-Bafghi et al., 2019).

В ходе исследования соленых и гиперсоленых регионов Ирана (Abbasi, Emtiazi, 2020), термоста-бильный галоцин был обнаружен у нового штам-ма *Halarchaeum acidiphilum*, выделенного в пустыне Деште-Лут. Очищенный препарат был эффективен против некоторых грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*) и грамотрицательных бактерий (*Pseudo-*

monas aeruginosa, Escherichia coli), а также против некоторых архей (Halobacterium salinarium). Галоцин сохранял антимикробную активность после инкубации при высокой температуре (до 100°С в течение 15 мин) и в кислой среде (рН 2.8 в течение 2 ч) (Abbasi, Emtiazi, 2020).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия в пустыне Атакама, самом сухом месте на Земле, были поставлены многочисленные эксперименты. Самые сухие участки пустыни Атакама получают <2 мм осадков в год. Несмотря на эти экстремальные условия, было показано существование там многих различных типов микробной жизни (Azua-Bustos et al., 2012; Neilson et al., 2012). Полная геологических чудес пустыня Деште-Лут также считается одним из самых сухих и жарких мест в мире (Yazdi et al., 2014; Azarderakhsh et al., 2019). Исследование пустынных микроорганизмов, потенциальных источников новых метаболитов и генов создает великолепные возможности в биоремедиации, терапии рака и астробиологии (Slade, Radman, 2011). Разнообразие микроорганизмов в пустыне Деште-Лут до сих пор изучено недостаточно. Ее экстремальные климатические условия и труднодоступность делают пустыню Деште-Лут самым неизученным регионом Ирана. Исследование биоразнообразия, включая выделение и идентификацию новых микроорганизмов из разнообразных местообитаний, может существенно расширить генетические ресурсы для будущих работ.

Окислительный стресс возникает из-за дисбаланса между продукцией АФК и антиоксидантными защитными механизмами. Оксидативный стресс играет важную роль в развитии рака, возрастных заболеваний и в старении. Поэтому стратегии, направленные на снижение оксидативного стресса или усиление антиоксидантных защитных механизмов, могут помочь в борьбе со старением и раком (Slade, Radman, 2011). Известно, что комплексы двухвалентных ионов марганца (Mn<sup>2+</sup>) и некоторыми распространенными клеточными метаболитами (например, ортофосфатом, пептидами и нуклеотидами) являются важнейшими радиозащитными компонентами в клетках Deinococcus radiodurans. Комплексы марганца, действующие поглотители АФК, вероятно, защищают белки от оксидативного стресса, вызванного радиацией (Daly et al., 2010). Поэтому предполагается, что, манипулируя метаболизмом с целью повысить накопление Mn<sup>2+</sup> комплексов, можно развить устойчивость к радиации в животных клетках (Slade, Radman, 2011). Большая работа была проделана по идентификации антиоксидатных агентов в клетках Deinococcus radiodurans. Грубый экстракт вторичных метаболитов этого организма

содержал разнообразные биологически активные антиоксиданты, способные к очистке от свободных радикалов (Maqbool et al., 2019, 2020). Недавно была описана противораковая активность дейноксантина, уникального каротиноида, выделенного из *Deinococcus radiodurans* и вызывающего апоптоз в трех линиях раковых клеток человека (HepG2, PC-3 и HT-29) (Choi et al., 2014). Недавние работы обнаружили роль внеклеточного полисахарида *Deinococcus* (DeinoPol) в реакции на оксидативный стресс путем обезвреживания АФК (Lin et al., 2020). Поэтому использование антиоксидантов из радиоустойчивых микроорганизмов может представлять интерес для профилактики и терапии рака.

В промышленной биотехнологии уделяется особое внимание *Deinococcus radiodurans* в связи с его замечательным потенциалом в биоремедиации (Gerber et al., 2015). Штаммы *Deinococcus radiodurans*, полученные методами генной инженерии, стали идеальными кандидатами для биоремедиации радиоактивных местообитаний, загрязненных тяжелыми металлами (Brim et al., 2006; Misra et al., 2012; Shukla, Rao, 2017), ураном и прочими радионуклидами (Manobala et al., 2019) и токсичными органическими веществами, например, толуолом (Lange et al., 1998).

Галофильные и галотолерантные микроорганизмы находят применение в различных отраслях биотехнологии. В настоящее время галофилы успешно используются в таких процессах, как производство бактериородопсина, β-каротина и эктоина. Их также традиционно используют в различных регионах мира для производства разнообразных пищевых продуктов. Другие потенциальные области применения галофилов включают производство биополимеров (биосурфактантов и экзополисахаридов) и ферментов, биотоплива, а также биодеградацию ароматических поллютантов в соленых местообитаниях (Oren, 2010).

Если на Марсе существует либо существовала жизнь, галофильные археи – это те организмы, которые могли бы расти/выживать в таких условиях. Существуют свидетельства существования соли и жидких рассолов на Mapce (Fendrihan et al., 2006; Oren, 2014). Класс *Halobacteria* привлекал внимание астробиологов в течение нескольких последних десятилетий в связи с их замечательными свойствами, включая несколько видов анаэробного метаболизма (Oren, 2014), выживание в условиях космоса (Kottemann et al., 2005; Oren, 2014; Leuko et al., 2015), при обезвоживании (Kottemann et al., 2005; Stan-Lotter, Fendrihan, 2015) и низких температурах (Oren, 2014), а также способность сохраняться в покоящемся состоянии внутри соляных кристаллов (Fendrihan et al., 2006; Oren, 2014; Stan-Lotter, Fendrihan, 2015).

Хотя в пустыне Деште-Лут было проведено несколько работ, детальное изучение микробного разнообразия в этом регионе требует дальнейших исследований. В настоящем обзоре показано, что микроорганизмы, выделенные из этой пустыни, могут быть перспективны для практического использования. В пустыне Деште-Лут существует еще много неисследованных местообитаний, и будущие исследования должны концентрироваться на выделении и идентификации микроорганизмов, особенно экстремофилов, а также на перспективах их применения в биотехнологии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Abbasi S., Emtiazi G.* MALDI-TOF analysis of a novel extremophile peptide purified from *Halarchaeum acidiphilum* ASDL78 with antiarchaeal and antibacterial activities // J. Basic Microbiol. 2020. V. 60. P. 920–930.

Asgarani E., Soudi M.R., Borzooee F., Dabbagh R. Radio-resistance in psychrotrophic *Kocuria* sp. ASB 107 isolated from Ab-e-Siah radioactive spring // J. Environ. Radioact. 2012. V. 113. P. 171–176.

Azarderakhsh M., Prakash S., Zhao Y., Agha Kouchak A. Satellite-based analysis of extreme land surface temperatures and diurnal variability across the hottest place on Earth // IEEE Geoscience and Remote Sensing Letters. 2019. V. 17. P. 2025–2029.

*Azua-Bustos A., Urrejola C., Vicuna R.* Life at the dry edge: microorganisms of the Atacama desert // FEBS Lett. 2012. V. 586. P. 2939–2945.

Brim H., Osborne J.P., Kostandarithes H.M., Fredrickson J.K., Wackett L.P., Daly M.J. Deinococcus radiodurans engineered for complete toluene degradation facilitates Cr(VI) reduction // Microbiology (SGM). 2006. V. 152. P. 2469–2477.

Busarakamm K., Bull A.T., Trujillo M.E., Riesco R., Sangal V., van Wezel G.P., Goodfellow M., Modestobacter caceresii sp. nov., novel actinobacteria with an insightinto their adaptive mechanisms for survival in extreme hyper-arid Atacama Desert soils // Syst. Appl. Microbiol. 2016. V. 39. P. 243–251.

Chanal A., Chapon V., Benzerara K., Barakat M., Christen R., Achouak W., Barras F., Heulin T., The Desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. P. 514–525.

Choi Y.J., Hur J.M., Lim S., Jo M., Kim D.H., Choi J.I. Induction of apoptosis by deinoxanthin in human cancer cells // Anticancer Res. 2014. V. 34. P. 1829–1835.

Dabbagh R., Ghafourian H., Baghvand A., Nabi G., Riahi H. Bioaccumulation and biosorption of stable strontium and <sup>90</sup>Sr by *Oscillatoria homogenea* cyanobacterium // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2007. V. 272. P. 53–59.

Daly M.J., Gaidamakova E.K., Matrosova V.Y., Kiang J.G., Fukumoto R., Lee D.Y., Wehr N.B., Viteri G.A., Berlett B.S., Levine R.L. Small-molecule antioxidant proteome-shields in Deinococcus radiodurans // PLoS One. 2010. V. 5. e12570

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012570

de Groot A., Chapon V., Servant P., Christen R., Saux M.F., Sommer S., Heulin T. Deinococcus deserti sp. nov., a gammaradiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 2441–2446.

*Drees K.P., Neilson J.E., Betancourt J.L., Quade J., Henderson D.A., Pryor B.M., Maier R.M.*, Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert Chile // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 7902–7908.

*Emadoddin I., Reinsch T., Taube O.F.* Drought and desertification in Iran // Hydrology. 2019. V. 6(3). https://doi.org/10.3390/hydrology6030066

Fatahi-Bafghi M., Rasouli-nasab M., Yasliani-Fard S., Habibnia S., Gharehbaghi F., Eshraghi S.S., Kabir K., Heidarieh P. Diversity and antimicrobial activity of Actinomycetes isolated from Lut desert: The extremely arid climatic zones of Iran // Int. J. Pept. Res. Ther. 2019. V. 25. P. 1201–1207.

Fendrihan S., Legat A., Pfaffenhuemer M., Gruber C., Weidler G., Gerbl F., Stan-Lotter H. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 2006. V. 5. P. 203–218.

Gerber E., Bernard R., Castang S., Chabot N., Coze F., Dreux-Zigh A., Hauser E., Hivin P., Joseph P., Lazarelli C., Letellier G., Olive J., Leonetti J.P. Deinococcus as new chassis for industrial biotechnology: biology, physiology and tools // J. Appl. Microbiol. 2015. V. 119. P. 1–10.

Gtari M., Essoussi I., Maaoui R., Sghaier H., Boujmil R., Gury J., Pujic P., Brusetti L., Chouaia B., Crotti E., Daffonchio D., Boudabous A., Normand P. Contrasted resistance of stonedwelling Geodermatophilaceae species to stresses known to give rise to reactive oxygen species // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 80. P. 566–577.

Guesmi S., Pujic P., Nouioui I., Dubost A., Najjari A., Ghedira K., Igual J.M., Miotello G., Cherif A., Armengaud J., Klenk H.P., Normand P., Sghaier H. Ionizing-radiation-resistant Kocuria rhizophila PT10 isolated from the Tunisian Sahara xerophyte Panicum turgidum: Polyphasic characterization and proteogenomic arsenal // Genomics. 2020. V. 113. P. 317–330.

Hussain F., Khan I.U., Habib N., Xian W.D., Hozzein W.N., Zhang Z.D., Zhi X.Y., Li W.J. Deinococcus saudiensis sp. nov., isolated from desert // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 5106–5111.

Kottemann M., Kish A., Iloanusi C., Bjork S., DiRuggiero J. Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC1 to desiccation and gamma irradiation // Extremophiles. 2005. V. 9. P. 219–227.

Lange C.C., Wackett L.P., Minton K.W., Daly M.J. Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments // Nat. Biotechnol. 1998. V. 16. P. 929–933.

*Lester E.D., Satomi M., Ponce A.* Microflora of extreme arid Atacama Desert soils // Soil Biol. Biochem. 2007. V. 39. P. 704–708.

Leuko S., Domingos C., Parpart A., Reitz G., Rettberg P. The survival and resistance of Halobacterium salinarum NRC-1, Halococcus hamelinensis, and Halococcus morrhuae to simulated outer space solar radiation // Astrobiology. 2015. V. 15. P. 987–997.

Lin S.M., Baek C.Y., Jung J.H., Kim W.S., Song H.Y., Lee J.H., Ji H.J., Zhi Y., Kang B.S., Bahn Y.S., Seo H.S., Lim S. Anti-

oxidant activities of an exopolysaccharide (DeinoPol) produced by the extreme radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 55. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56141-3

Liu Z., Kim M.C., Wang L., Zhu G., Zhang Y., Huang Y., Wei Z., Danzeng W., Peng F. Deinococcus taklimakanensis sp. nov., isolated from desert soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V 67. P. 4311–4316.

Lyons W.B., Welch S.A., Gardner C.B., Sharifi A., Agha-Kouchak A., Mashkour M., Djamali M., Matinzadeh Z., Palacio S., Akhani H. The hydrogeochemistry of shallow groundwater from Lut Desert, Iran: The hottest place on Earth // J. Arid Environ. 2020. V. 178.

https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104143

Maqbool I., Kandan P.V., Dhineshkumar E., Prasad N.R. Free radical scavenging potential and LC-MS based identification of secondary metabolites of *Deinococcus radiodurans* // Int. J. Sci. Technol. Res. 2019. V. 8. P. 1753–1762. Maqbool I., Sudharsan M., Kanimozhi G., Alrashood S.T., Khan H.K., Prasad N.R. Crude cell-free extract from Deinococcus radiodurans exhibit anticancer activity by inducing apoptosis in triple-negative breast cancer cells // Front. Cell Dev. Biol. 2020. V. 8. P. 807.

Manobala T., Shukla S.K., Rao T.S., Kumar M.D. A new uranium bioremediation approach using radio-tolerant *Deinococcus radiodurans* biofilm // J. Biosci. 2019. V. 44. P. 122.

Mattimore V., Battista J.R. Radioresistance of Deinococcus radiodurans: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 633–637.

Mazkour S., Hosseinzadeh S., Shekarforoush S.S. Evidence of heat-resistant microorganisms with a special emphasis on filamentous Actinomycetes in hyper-arid soils of Gandom Beryan area, Lut Desert, Iran // Iranian J. Microbiol. 2017. V. 9. P. 331–337.

Misra C.S., Appukuttan D., Kantamreddi V.S., Rao A.S., Apte S.K. Recombinant D. radiodurans cells for bioremediation of heavy metals from acidic/neutral aqueous wastes // Bioeng. Bugs. 2012. V. 3. P. 44–48.

Mohseni M., Abbaszadeh J., Nasrollahi Omran A. Radiation resistant of native *Deinococcus* spp. isolated from the Lout desert of Iran "the hottest place on Earth" // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2014. V. 11. P. 1939—1946.

Neilson J.W., Quade J., Ortiz M., Nelson W.M., Legatzki A., Tian F., LaComb M., Betancourt J.L., Wing R.A., Soderlund C.A., Maier R.M. Life at the hyperarid margin: novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama Desert, Chile // Extremophiles. 2012. V. 16. P. 553–566.

*Orellana R., Macaya C., Bravo G., Dorochesi F., Cumsille A., Valencia R., Rojas C., Seeger M.* Living at the frontiers of life: extremophiles in Chile and their potential for bioremediation // Front. Microbiol. 2018. V. 9.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309

*Oren A.* microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity // Saline Systems. 2008. V. 4(2). P. 1–13.

*Oren A.* Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms // Environ. Technol. 2010. V. 31. P. 825–834.

*Oren A.* Halophilic archaea on Earth and in space: growth and survival under extreme conditions // Phil. Trans. R.

Soc. A. 2014. V. 372. https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0194

Ouchari L., Boukeskasse A., Bouizgarne B., Ouhdouch Y. Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity // Biol. Open. 2019. V. 8.

https://doi.org/10.1242/bio.035410

*Peng F., Zhang L., Luo X., Dai J., An H., Tang Y., Fang C. Deinococcus xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 709–713.

Rainey F.A., Ferreira M., Nobre M.F., Ray K., Bagaley D., Earl A.M., Battista J.R., Gomez-Silva B., McKay C.P., da Costa M.S. Deinococcus peraridilitoris sp. nov., isolated from a coastal desert // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 1408–1412.

Rainey F.A., Ray K., Ferreira M., Gatz B.Z., Nobre M.F., Bagaley D., Rash B.A., Park M.J., Earl A.M., Shank N.C., Small A.M., Henk M.C., Battista J.R., Kämpfer P., da Costa M.S. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 5225–5235.

Rao S., Chan Y., Bugler-Lacap D.C., Bhatnagar A., Bhatnagar M., Pointing S.B. Microbial diversity in soil, sand dune and rock substrates of the Thar Monsoon Desert, India // Indian J. Microbiol. 2016. P. 56. P. 35—45.

Safarpour A., Amoozegar M.A., Ventosa A. Hypersaline environments of Iran: Prokaryotic biodiversity and their potentials in microbial biotechnology // Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications / Eds. Egamberdieva D., Birkeland N.K., Panosyan H., Li W.J. Singapore: Springer, 2018. P. 265–298.

Salari Z., Kazemi M.J., Shirsalimian M.S. Isolation and molecular identification of halophilic microorganisms from around Saghand uranium mine, Saghand Desert, Iran // Geomicrobiol. J. 2020. V. 37. P. 40–49.

Schubert B.A., Lowenstein T.K., Timofeeff M.N., Parker M.A. Halophilic Archaea cultured from ancient halite, Death Valley, California // Environ. Microbiol. 2010. V. 12. P. 440–454.

Schwentner M., Rudov A.V., Rajaei H. Some like it hot: Phallocryptus fahimii sp. n. (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae) from the Lut desert, the hottest place on Earth // Zoology in the Middle East. 2020. V. 66. P. 331–341.

Shahmohammadi H.R., Asgarani E., Terato H., Saito T., Ohyama Y., Gekko K., Yamamoto O., Ide H. Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of Halobacterium salinarium against DNA-damaging agents // J. Radiat. Res. 1998. V. 39. P. 251–262.

Shahsavari N., Kafilzadeh F., Kargar M. Isolation and identification of thermophiles bacteria from one of the Hottest Places on the Planet (Lut Desert, Iran) and measuring their enzyme activities // Geomicrobiol. J. 2021. V. 38. P. 1–9.

Shirsalimian M.S., Akhavan Sepahy A., Amoozegar M.A., Kalantar S.M., Dabbagh R. Isolation of a mesophilic and halotolerant strain of Kocuria polaris from Gandom Beryan area in the Lut Desert of Iran, moderately resistant to gamma radiation and desiccation // Biosci. Biotech. Res. Asia. 2016. V. 13. P. 2343–2350.

Shirsalimian M.S., Akhavan Sepahy A., Amoozegar M.A., Kalantar S.M., Dabbagh R. Isolation of two radiation resistant and desiccation tolerant bacteria, Modestobacter sp. A2 and Maritalea sp. B9, from Gandom Beryan Hill in the Lut Desert of Iran // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 363–371.

Shirsalimian M.S., Amoozegar M.A., Akhavan Sepahy A., Kalantar S.M., Dabbagh R. Isolation of extremely halophilic Archaea from a saline river in the Lut Desert of Iran, moderately resistant to desiccation and gamma radiation // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 403–411.

Shukla S.K., Rao T.S., The first recorded incidence of Deinococcus radiodurans R1 biofilm formation and its implications in heavy metals bioremediation // bioRxiv. 2017. Slade D., Radman M. Oxidative stress resistance in Deinococcus radiodurans // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2011. V. 75. P. 133–191.

Stan-Lotter H., Fendrihan S. Halophilic Archaea: life with desiccation, radiation and oligotrophy over geological times // Life. 2015. V. 5. P. 1487–1496.

Ventosa A., Unusual microorganisms from unusual habitats hypersaline environments // Prokaryotic Diversity —

Mechanisms and Significance / Eds. Logan N.A., Lappin-Scott H.M., Oyston P.C.F. Cambridge University Press, 2006. P. 223–254.

*Wierzchos J., De los Ríos A., Ascaso C.* Microorganisms in Desert Rocks: the edge of life on Earth // Int. Microbiol. 2012. V. 15. P. 173–183.

*Yazdi A., Emami M.H., Shafiee S.M.* Dashte Lut in Iran, the most complete collection of beautiful geomorphological phenomena of desert // Open J. Geology. 2014. V. 4. P. 249–261.

Yu L.Z., Luo X.S., Liu M., Huang Q. Diversity of ionizing radiation-resistant bacteria obtained from the Taklimakan Desert // J. Basic Microbiol. 2015. V. 55. P. 135–140.

Yuan M., Zhang W., Dai S., Wu J., Wang Y., Tao T., Chen M., Lin M. Deinococcus gobiensis sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 1513—1517.

Zamani A., Marusik Y.M. The first report on the spider fauna (Arachnida: Araneae) of the Lut Desert, Iran // Acta Arachnologica. 2018. V. 67(2). P. 67–75.

#### The Lut Desert and Its Microbial Diversity: Recent Studies and Future Research

M. S. Shirsalimian<sup>1</sup>, S. M. Mazidi<sup>2</sup>, and M. A. Amoozegar<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Quality Control Department, Production and Development of Cyclotron Radiopharmaceuticals, Pars Isotope Company, Karaj, Iran

<sup>2</sup>Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Extremophiles Laboratory, Department of Microbiology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

\*e-mail: amoozegar@ut.ac.ir

Received January 21, 2022; revised January 28, 2022; accepted January 30, 2022

**Abstract**—A significant proportion of the Earth surface is covered by deserts. Despite the stressful environmental conditions, deserts can host diverse microbial populations, especially extremophiles. Due to their remarkable adaptive capabilities, extremophiles have been used in biotechnology and medicine. Understanding microbial diversity in arid environments offers also potential sources of new natural bioactive metabolites. The Lut Desert, located in the eastern part of Iran, is one of the driest and hottest deserts around the world. It presents a collection of unique natural phenomena and geological records. In this review, we describe the previous efforts to show the microbial diversity in the Lut Desert and highlight their promising applications.

**Keywords:** arid environments, Lut Desert, microbial diversity, extremophiles

#### \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

# НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МЕХАНИЗМ АВТОТРОФНОЙ АССИМИЛЯЦИИ CO<sub>2</sub> У ЗЕЛЕНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2022 г. Р. Н. Ивановский<sup>а, \*</sup>, Н. В. Лебедева<sup>а</sup>, Т. П. Турова<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119191 Россия <sup>b</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия \*e-mail: mguru@mail.ru

Поступила в редакцию 19.01.2022 г. После доработки 25.01.2022 г. Принята к публикации 25.01.2022 г.

Автотрофная система фиксации  $CO_2$  у *Chlorobaculum limnaeum* штамм C состоит из двух топологически независимых ферментных комплексов: обращенного цикла трикарбоновых кислот (комплекс I), единственным продуктом которого является ацетил-КоА, и нециклического комплекса реакций (комплекс II). В реакциях, катализируемых ферментами комплекса II, из ацетил-КоА, синтезированного в обращенном цикле трикарбоновых кислот, синтезируются все субстраты, используемые для построения клеток. Комплекс I включает две реакции карбоксилирования, катализируемые 2-оксоглутаратсинтазой и изоцитратдегидрогеназой. Комплекс II включает две дополнительные реакции карбоксилирования, катализируемые пируватсинтазой и  $\Phi$ EП-карбоксилазой. Объединение ферментных комплексов I и II в единую систему автотрофной ассимиляции  $CO_2$  осуществляет цитратсинтаза, отсутствующая в каноническом варианте цикла Арнона-Бюкенана. Ген цитратсинтазы обнаруживается у всех исследованных зеленых серных бактерий и может быть отнесен к генам "домашнего хозяйства".

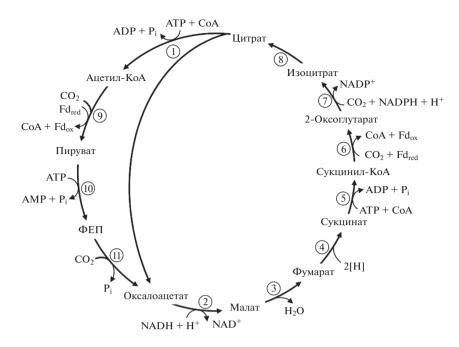
**Ключевые слова:** зеленые серные бактерии, восстановительный цикл трикарбоновых кислот, автотрофная ассимиляция  $CO_2$ 

**DOI:** 10.31857/S0026365622300024

Автотрофная ассимиляция СО<sub>2</sub> у исследованных зеленых серных бактерий осуществляется при участии восстановительного цикла лимонной кислоты (цикл Арнона-Бюкенана). Цикл был впервые описан в 1966 г. (Evans et al., 1966) и окончательно признан в 1980 г. после обнаружения у Chlorobium limicola его ключевого фермента: АТФзависимой цитратлиазы (Ivanovsky et al., 1980). В настоящее время существует консенсус относительно механизма этого процесса (рис. 1). Ассимиляцию СО2 через цикл Арнона-Бюкенана осуществляют филогенетически разнообразные автотрофные бактерии, в том числе: аноксигенные фототрофные бактерии (Chlorobi), сульфатредуцирующие бактерии (Desulfobacter), микроаэрофильные гипертермофильные водородокисляющие бактерии (Aquifex и Hydrogenobacter) (Hügler, Sievert, 2011). Цикл Арнона-Бюкенана включает четыре фермента. катализирующих реакцию карбоксилирования: 2-оксоглутаратсинтазу, изоцитратдегидрогеназу, пируватсинтазу и ФЕП-карбоксилазу и содержит три специфичных для него фермента: фумаратредуктазу, ферредоксин-зависимую оксоглутаратсинтазу и АТФ-цитратлиазу. В результате реакций цикла синтезируются предшественники

всех соединений, необходимых для построения клеток.

Характерной особенностью метаболизма зеленых серных бактерий является его высокая чувствительность к действию фторацетата. Фторацетат является эффективным ингибитором автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> (Sirevag, Ormerod, 1970; Ivanovsky et al., 1993). Наиболее вероятной мишенью ингибирующего действия фторацетата является аконитаза, ингибитором которой является фторцитрат (Villafranca, Platus, 1973; Proudfoot et al., 2006). Фторцитрат у зеленых серных бактерий может синтезироваться в цитратсинтазной реакции (ацетил-KoA + оксалоацетат  $\rightarrow$  цитрат) в результате замещения ацетил-КоА на фторацетил-КоА. Это предполагает участие цитратсинтазы в процессе автотрофной фиксации СО2. Однако в классическом варианте механизма автотрофной ассимиляции СО2 у зеленых серных бактерий цитратсинтазная реакция отсутствует. Синтез цитрата в цикле Арнона-Бюкенана происходит в реакции карбоксилирования 2-оксоглутарата: 2-оксоглутарат +  $CO_2 \rightarrow$  цитрат (рис. 1). Цитрат, синтезируемый в этой реакции, не содержит фто-



**Рис. 1.** Механизм автотрофной фиксации  $CO_2$  у зеленых серных бактерий (adapted from Evans M.C.W., Buchanan B.B., Arnon D.I., 1966). 1 — АТФ-цитратлиаза; 2 — малатдегидрогеназа; 3 — фумаратгидратаза; 4 — фумаратредуктаза; 5 — сукцинил-КоА синтаза; 6 — ферредоксин-зависимая кетоглутаратсинтаза; 7 — изоцитратдегидрогеназа; 8 — аконитатгидратаза; 9 — ферредоксин-зависимая пируватсинтаза; 10 — ФЕП-синтаза; 11 — ФЕП-карбоксилаза.

ра и, следовательно, не способен выполнять функцию эндогенного ингибитора автотрофной ассимиляции углекислоты и ингибировать рост зеленых серных бактерий в фотоавтотрофных условиях.

Задачей данной работы было предложить механизм автотрофной ассимиляции  $\mathrm{CO}_2$  у зеленых серных бактерий, предполагающий участие цитратсинтазы и позволяющий объяснить ингибирующее действие фторацетата.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактерии и условия их культивирования. Зеленую серную бактерию *Chlorobaculum limnaeum* штамм С (бывшая *Chlorobium limicola* штамм С) из коллекции кафедры микробиологии Московского государственного университета культивировали в фототрофных условиях на среде Ларсена (Larsen, 1952) с NaHCO<sub>3</sub> (3 г/л) и Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O (1 г/л). При выращивании бактерий в фотомиксотрофных условиях в качестве источников углерода использовали NaHCO<sub>3</sub> (3 г/л) + ацетат (1 г/л). Культуры выращивали при 25–28°C в 500 мл стеклянных сосудах, полностью заполненных средой.

Приготовление клеточного экстракта. Для получения бесклеточных экстрактов клетки, находящиеся в конце экспоненциальной фазы роста, отделяли от среды центрифугированием (9000 об./мин при 6—8°С) и отмывали 0.05 М Трис-НСІ буфером (рН 7.5). Полученную биомассу ресус-

пендировали в 7 мл используемого для определения активности фермента буфера и разрушали с помощью X-пресса ("LKB", Швеция) при избыточном давлении  $10 \text{ т/cm}^2$ . Неразрушенные клетки и крупные фрагменты отделяли центрифугированием при 35000 g в течение часа. Получившейся супернатант использовали для энзиматических исследований. Определение активности ферментов проводили при комнатной температуре. Содержание белка в опытах 0.5-2.0 мг/мл.

Ассимиляция клетками меченых субстратов. Эксперименты по ассимиляции [14C]-меченых субстратов суспензиями клеток проводили в медицинских шприцах на свету (2000 лк). Реакцию начинали добавлением NaH14CO<sub>3</sub> (5 мM, 0.04 МБк) и останавливали через соответствующие промежутки времени фильтрованием 1 мл клеточной суспензии через нитроцеллюлозные фильтры (0.45 мкм). Фильтры сушили и просчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике LKB RacBeta молель 1127.

Определение активности ферментов. Активность АТФ-цитратлиазы (ЕС 2.3.3.8) определяли по окислению НАДН в сопряженной реакции с малатдегидрогеназой. Реакционная смесь содержала 100 мМ *Tris*-HCl (рН 8.3), 5 мМ дитиотриэтола (DTE), 5 мМ мgCl<sub>2</sub>, 3 мМ АТФ, 0.5 мМ КоА, 0.4 мМ НАДН, 1 ед. малатдегидрогеназы и 3 мМ цитрата. Реакция начиналась добавлением цитрата.

Активность цитратсинтазы (EC 4.1.3.1) определяли по оксалоацетат-зависимому выделению КоА из ацетил-КоА. Накопление КоА определяли в реакции с DTNB. Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.8), 1 мМ DTNB, 0.2 мМ ацетил-КоА и 20 мМ цитрата. Реакция начиналась добавлением оксалоацетата.

Активность аконитазы (ЕС 4.2.1.3) определяли спектрофотометрически по накоплению  $\mu$ c-аконитата при 240 нМ ( $E_{240}-3.4~\mathrm{MM^{-1}~cm^{-1}}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ Tpuc-HCl (pH 7.5) и 10 мМ цитрата. Реакция начиналась добавлением клеточного экстракта.

Активность изоцтратдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.42) определяли по изоцитрат-зависимому восстановлению НАДФ. Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.5), 5 мМ DTE, 5 мМ Mg-Cl<sub>2</sub>, 1 мМ НАДФ и 10 мМ изоцитрата. Реакция начиналась добавлением изоцитрата.

Активность малатдегидрогеназы (ЕС 1.1.1.37) определяли по оксалоацетат-зависимому окислению НАДН. Реакционная смесь содержала 100 мМ Tpuc-HCl (pH 7.8), оксалоацетат 4 мМ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ DTT и 0.3 мМ НАДН. Реакция начиналась добавлением оксалоацетата.

Активность фумаратгидратазы (ЕС 4.2.1.2) измерялась спектрофотометрически при 240 нМ ( $E_{240}-2.440~{\rm M}^{-1}~{\rm cm}^{-1}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (рН 7.8), 30 мМ малата. Реакция начиналась добавлением клеточного экстракта.

Активность сукцинатдегидрогеназы (ЕС 1.3.5.1) определяли спектрофотометрически по сукцинат-зависимому восстановлению феррицианида при 420 нм ( $E_{420}-1.09~{\rm MM^{-1}~cm^{-1}}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (рН 7.5), 2.5 мМ феррицианида, 0.5 мМ сукцината. Реакция начиналась добавлением сукцината.

Активность изоцитратлиазы (EC 4.1.3.1) определяли спектрофотометрически по накоплению гидразона глиоксилата при 324 нм ( $E_{324}$  гидразона глиоксилата — 17 мМ $^{-1}$  см $^{-1}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ фенилгидразина, 1 мМ изоцитрата. Реакция начиналась добавлением изоцитрата.

Активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ЕС 1.2.4.2) определяли спектрофотометрически по восстановлению НАД при 340 нм ( $E_{340}-6.22~{\rm MM^{-1}}$  см $^{-1}$ ). Реакционная смесь содержала 100 мМ *Трис*-HCl (рН 7.5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ НАД, 0.5 мМ КоА, 10 мМ DTE, 0.5 мМ ТРР и 5 мМ 2-оксоглутарата. Реакция начиналась добавлением 2-оксоглутарата.

Активность 2-оксоглутаратсинтазы (ЕС 1.2.7.3), пируватсинтазы (ЕС 1.2.7.1) и фумаратредуктазы измеряли спектрофотометрически по восстановле-

нию метилвиологена при 578 нм ( $E_{578}-8\times10^3~{\rm M}^{-1}$  см $^{-1}$ ). Реакцию проводили в анаэробных условиях с  $N_2$  в газовой фазе. Реакционная смесь для КоАзависимых 2-оксоглутарат- и пируватсинтазы содержала: 100 мМ *Трис*-HCl (рН 7.8), 4 мМ DTE, 2 мМ MgCl $_2$ , 0.5 мМ СоА, 2 мМ MV и 3 мМ 2-оксоглутарата или пирувата. Реакционная смесь для фумаратредуктазы содержала: 100 мМ *Трис*-HCl (рН 7.8), 4 мМ DTE, 2 мМ MgCl $_2$ , 2 мМ MV и 1 мМ фумарата. Дитионит был добавлен шприцем из 5 мМ раствора до появления слабой фиолетовой окраски. Реакции начиналась добавлением 2-оксоглутарата, пирувата или фумарата.

Определение сульфида проводили по модифицированному методу, описанному ранее (Trueper, Schlegel, 1964). Белок измеряли по методу Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве контроля.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей. Сравнительный анализ генов 16S pPHK, aclB и gltA проводили с использованием баз данных GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) и PATRIC v.3.6.11. Редактирование и трансляцию секвенированных последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit (Hall, 1999). Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTALW v 1.75 (Thompson et al., 1994). Построение филогенетических деревьев исследуемых бактерий проводили с использованием алгоритма neighbor-joining (Saitou, Nei, 1987), реализованного в пакете программ TREECONW (Van de Peer, De Wachter, 1994) и алгоритма Maximum Likelihood, реализованного в пакете программ MEGA11 v 11.0.8.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность ферментов, принимающих участие в автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> у Cba. limnaeum C. Автотрофная ассимиляция CO<sub>2</sub> y Cba. limnaeum C происходит при участии четырех реакций карбоксилирования: пируватсинтазы, 2-оксоглутаратсинтазы, изоцитратдегидрогеназы и ФЕП-карбоксилазы (табл. 1). При выращивании Cba. limnaeum C в фотомиксотрофных условиях на среде, содержащей в качестве источников углерода бикарбонат и ацетат в качестве дополнительного источника углерода, происходит уменьшение активности пируватсинтазы, 2-оксоглутаратсинтазы и изоцитратдегидрогеназы по сравнению с их активностью у клеток, выросших в фотоавтотрофных условиях. В этих условиях *Cba. limnaeum* С включают ацетат в углеродный метаболизм в качестве готового строительного блока, снижая нагрузку на систему фиксации СО2. Активность ФЕП-карбоксилазы в этих условиях напротив увеличивается. Это объясняется ее участием в процессе ассимиляции эк-

**Таблица 1.** Активности ферментов, принимающих участие в ассимиляции CO<sub>2</sub> у штамма С *Cba. limnaeum* (в нмоль/мин/мг белка)

| *                                 | Условия выращивания |                         |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Фермент                           | $Na_2S + CO_2$      | $Na_2S + CO_2 + ацетат$ |
| Цитратсинтаза                     | 8.6                 | 7.5                     |
| АТФ-цитратлиаза                   | 31.5                | 8.5                     |
| Пируватсинтаза                    | 125.1               | 65.1                    |
| 2-Оксоглутаратсинтаза             | 21.4                | 14.1                    |
| Изоцитратдегидрогеназа            | 919.0               | 306.6                   |
| Цитратсиназа                      | 8.6                 | 7.5                     |
| Аконитаза                         | 6.5                 | 9.8                     |
| Сукцинатдегидрогеназа             | 19.8                | 29.7                    |
| Фумаратредуктаза                  | 64.3                | 44.6                    |
| Фумаратгидратаза                  | 112.2               | 83.3                    |
| Малатдегидрогеназа                | 109.7               | 130.3                   |
| 2-Оксоглутаратдегидрогеназа       | 0.0                 | 0.0                     |
| Изоцитратлиаза                    | 0.0                 | 0.0                     |
| Пируваткарбоксилаза               | <0.1                | <0.1                    |
| ФЕП-карбоксилаза                  | 3.6                 | 9.0                     |
| ФЕП-карбоксикиназа (ГТФ)          | 5.2                 | 6.6                     |
| ФЕП-карбоксикиназа (АДФ)          | <0.1                | <0.1                    |
| ФЕП-карбоксикиназа                | 0.9                 | 1.3                     |
| Пируваткиназа                     | 5.1                 | 3.2                     |
| Пируват-фосфат дикиназа           | 3.3                 | 1.2                     |
| Пируват-H <sub>2</sub> O дикиназа | <0.1                | <0.1                    |

зогенного ацетата в фотомиксотрофных условиях (рис. 1).

В дополнение к ферментам цикла Арнона—Бюкенана в клетках *Cba. limnaeum*, выросших как в фотоавтотрофных, так и фотомиксотрофных условиях на среде с ацетатом в качестве дополнительного источника углерода, детектируется активность цитратсиназы (табл. 1). Этот фермент отсутствует в классическом варианте цикла (рис. 1).

Рост, окисление сульфида и ассимиляция  $CO_2$  зелеными серными бактериями Cba. limnaem C в фотоавтотрофных и фотомиксотрофных условиях. Cba. limnaeum C. способен к фотоавтотрофному росту на среде, содержащей  $CO_2$  в качестве источника углерода и  $H_2S$ , как донора электронов, и к фотомиксотрофному на среде с ацетатом, в качестве дополнительного источника углерода. При росте в фотомиксотрофных условиях урожай клеток Cba. limnaeum увеличивается на 30-40%. Напротив, скорость фиксации  $CO_2$  и окисления сульфида снижается примерно в этой же пропорции (табл. 2). Эти данные служат дополнительным доказательством того, что ацетат в этих условиях

включается в метаболизм клеток  $\mathit{Cba}$ .  $\mathit{limnaeum}$  в качестве готового строительного блока, что снижает потребность клеток в  $\mathit{CO}_2$  и, следовательно, в сульфиде, как доноре электронов.

Механизм действия фторацетата на ассимиляцию СО<sub>2</sub>. Характерной особенностью процесса автотрофной ассимиляции  $\mathrm{CO}_2$  у зеленых серных бактерий является его высокая чувствительность к действию фторацетата. Фторацетат в фотоавтотрофных условиях выращивания клеток штамма Cba. limnaeum С более чем на 90% ингибирует фиксацию СО2, окисление сульфида и рост бактерий (табл. 2 и 3). Минимальная концентрация фторацетата, достаточная для 50% подавления автотрофной ассимиляции  $CO_2$  ( $IC_{50}$ ), равна 2 ×  $10^{-6}$  М и, соответственно,  $5 \times 10^{-6} \,\mathrm{M}$  для полного подавления фиксации СО2 (рис. 2). Наиболее вероятной мишенью ингибирующего действия фторацетата является аконитаза. Этот фермент является обязательным участником процесса ассимиляции СО<sub>2</sub> в цикле Арнона-Бюкенана (рис. 1). Истинным ингибитором аконитазаы является не фторацетат, а фторцитрат (Villafranca, Platus, 1973; Proudfoot et al., 2006). У зеленых серных бактерий он мо-

Таблица 2. Рост, окисление сульфида и ассимиляция бикарбоната клетками штамма С Cba. limnaeum

| Среда содержит:                     | Рост*,<br>мкг белка/мл | Потребление сульфида,<br>нм/мин/мг белка | Ассимиляция бикарбоната,<br>нм/мин/мг белка |
|-------------------------------------|------------------------|--|---|
| $H_2S + CO_2$                       | 92.0                   | 59.2                                     | 14.6  |
| $H_2S + CO_2 +$ ацетат              | 134.0                  | 42.1                                     | 10.0  |
| $H_2S + CO_2 + фторацетат$          | 0.6                    | 9.0                                      | 0.6   |
| $H_2S + CO_2 + фторацетат + ацетат$ | 119.0                  | 39.9                                     | 10.5  |

<sup>\*</sup> Скорость роста оценивалась по урожаю клеток за 36 ч культивирования (середина экспоненциальной фазы роста).

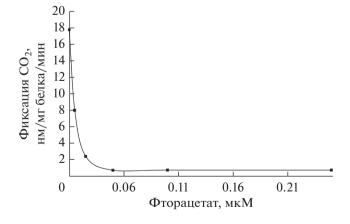
**Таблица 3.** Ассимиляция  $CO_2$  клетками штамма C *Cba. limnaeum*, выросшими в фотоавтотрофных условиях и среде с пируватом (в нмоль/мин/мг белка)

| C                                    | Среда культивирования |                          |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Состав среды в опыте                 | $Na_2S + CO_2$        | $Na_2S + CO_2 + пируват$ |
| $CO_2 + Na_2S$                       | 14.6                  | 18.0                     |
| $CO_2$ + $Na_2S$ + ацетат            | 10.0                  | 18.2                     |
| $CO_2$ + $Na_2S$ + F-ацетат          | 0.6                   | 1.8                      |
| $CO_2 + Na_2S + F$ -ацетат + ацетат  | 10.5                  | 19.0                     |
| $CO_2$ + $Na_2S$ +пируват            | 12.9                  | 27.1                     |
| $CO_2 + Na_2S + F$ -ацетат + пируват | 0.8                   | 2.0                      |

жет синтезироваться в шитратсинтазной реакшии: фторацетил-KoA + оксалоацетат  $\rightarrow$  2-фторцитрат + + КоА, что, в свою очередь, предполагает наличие у штамма *Cba. limnaeum* С цитратсинтазы, катализирующей реакцию синтеза фторцитрата, как эндоингибитора аконитазы. цитратсинтазы обнаруживается в клетках Cba. limпаеит С, выросших как в фотоавтотрофных, так и в фотомиксотрофных условиях (табл. 1). Однако эта реакция отсутствует в классическом варианте цикла Арнона-Бюкенана (рис. 1), что не позволяет адекватно интерпретировать механизм ингибирования фторацетатом фиксации СО2 у зеленых серных бактерий, оставаясь в рамках общепринятых представлений о механизме этого процесса. Наличие у штамма Сва. limnaeum С цитратсинтазы, катализирующей реакцию синтеза фторцитрата, как эндогенного ингибитора аконитазы, объясняет высокую чувствительность ассимиляции СО2 у зеленых серных бактерий к действию фторацетата.

Ацетат снимает ингибирующее действие фторацетата на автотрофную ассимиляцию  ${\rm CO}_2$  (табл. 2 и 3). Линейная зависимость восстановления скорости фиксации  ${\rm CO}_2$  от концентрации ацетата в присутствии фторацетата указывает на конкурентный характер их взаимодействия (рис. 3). Конкуренция между ацетатом и фторацетатом может осуществляться либо на уровне их транспорта в клетки бактерий, либо в процессе

их метаболизма. В пользу первого предположения свидетельствует тот факт, что пируват, получаемый в результате карбоксилирования экзогенного ацетата в пируватсинтазной реакции (рис. 1, табл. 1), и также другие продукты функционирования цикла Арнона-Бюкенана — 2-оксоглутарат, сукцинат, фумарат, малат, цитрат (данные не показаны) — не восстанавливали фиксации  $CO_2$  в присутствии фторацетата. Конкуренция ацетата и фторацетата за общую транспортную систему приводит к радикальному снижению внутриклеточной концентрации фторацетата, используе-



**Рис. 2.** Действие фторацетата на ассимиляцию бикарбоната.

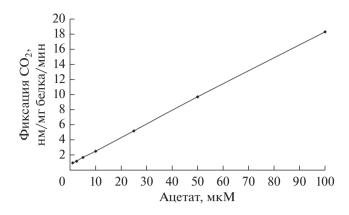


Рис. 3. Снятие ингибирующего действия фторацетата ацетатом.

мого в качестве субстрата для синтеза фторцитрата. В результате полностью блокируется синтез фторцитрата как эндогенного ингибитора аконитазы, и, как следствие, рост бактерий и их способность к автотрофной ассимиляции  $\mathrm{CO}_2$  полностью восстанавливаются.

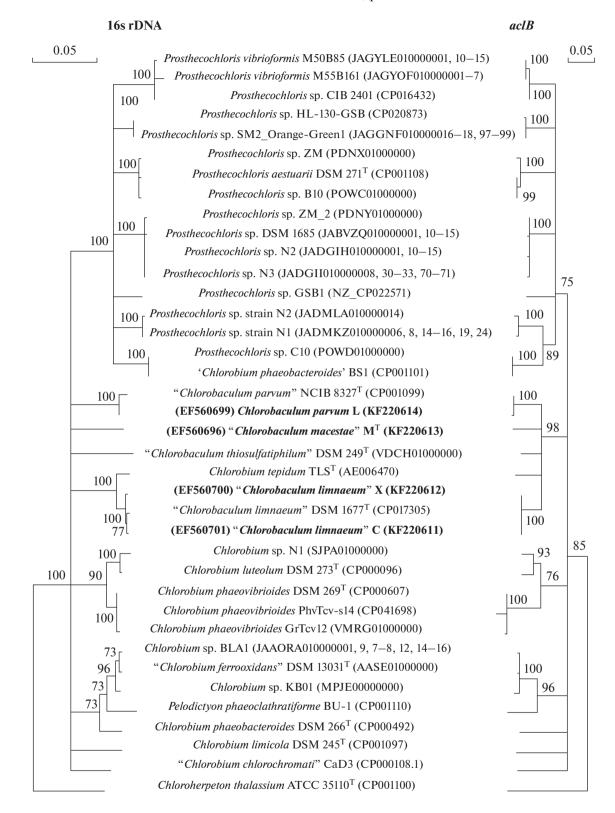
Наличие цитратсинтазы у *Cha. limnaeum* С и ее отсутствие в каноническом варианте цикла Арнона-Бюкенана (рис. 1) послужило мотивом для дополнительных филогенетических исследований гена цитратсинтазы зеленых серных бактерий, принадлежащих к филуму *Chlorobi*.

Филогенетический анализ генов 16S рРНК, АТФ-цитратлиазы и цитратсинтазы зеленых сер**ных бактерий.** В базе данных PATRIC в настоящее время представлено 655 геномов бактерий филума Chlorobi. Однако большинство из них (585 геномов) получено для некультивируемых микроорганизмов в результате анализа метагеномов, поэтому точность идентификации этих микроорганизмов и полнота аннотации их геномов недостаточны для анализа. При этом из оставшихся 70 геномов культивируемых бактерий, только для 38 аннотированы гены 16S рРНК. Эти геномы и были использованы для филогенетического анализа вместе с ранее полученными нами для штаммов зеленых серных бактерий С, Х, L и М (Кеппен и совт., 2008; Турова и соавт., 2013).

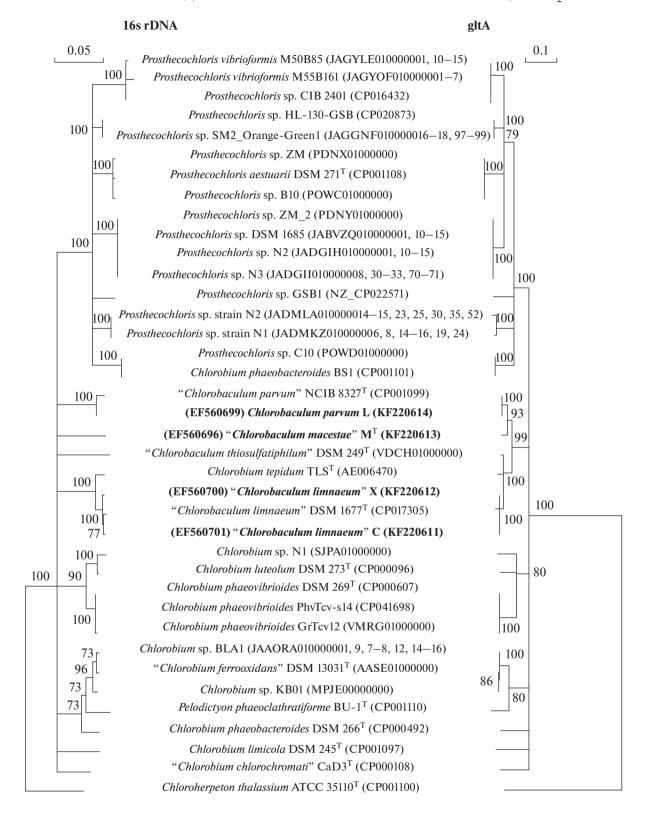
Анализ геномов всех исследованных культивируемых зеленых серных бактерий свидетельствуют о наличии в них не только гена АТФ-цитратлиазы, детерминирующего ключевой фермент цикла Арнона-Бюкенана, но и гена цитратсинтазы, детерминирующего фермент, не участвующий в общепринятом варианте цикла. Для всех анализируемых геномов зеленых серных бактерий было выявлено присутствие как *aclAB* — генов обеих субъединиц АТФ-цитратлиазы, так и генов *gltA* цитратсинтазы (рис. 4 и 5). Топологии филогенетических деревьев, построенных на основании сравнения

аминокислотных последовательностей транслированных генов АТФ-цитратлиазы (aclB) и цитратсинтазы (gltA) и нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК зеленых серных бактерий, соответствовали родовой структуре семейства *Chlo*robiaceae. При этом положение на филогенетических "АТФ-цитратлиазном" и "цитратсинтазном" деревьях зеленых серных бактерий С, Х, L и М штаммов соответствовало их идентификации на основании анализа генов 16S pPHK как представителей видов Cba. limnaeum, Cba. parvum и Cba. macestae, а топологии всех построенных деревьев в общем виде были конгруэнтны. При этом гены цитратсинтазы у представителей филума *Chlorobi* имеют общее происхождение, а их филогения соответствует таксономической структуре подразделения, основанной на анализе генов 16S pPHK (Alexander et al., 2002; Imhoff, 2003), и, следовательно, их эволюция происходила параллельно эволюции генов 16S рРНК. Коэволюция генов цитратсинтазы штаммов С, Х, L и М с генами 16S pPHK характерна для так называемых "гехозяйства" домашнего ("housekeeping genes"), т.е. генов, облигатно необходимых для жизнедеятельности данного конкретного филогенетического подразделения, филогения которого также соответствует "рибосомной". Таким образом, проведенный филогенетический анализ подтверждает необходимость генов цитратсинтазы, также как и генов АТФ-цитратлиазы, для жизнедеятельности зеленых серных бактерий. Принимая во внимание результаты геномного анализа, можно предположить, что у зеленых серных бактерий цитратсинтаза (ЕС 2.3.3.1) включена в систему автотрофной ассимиляции СО2 как обязательный участник этого процесса.

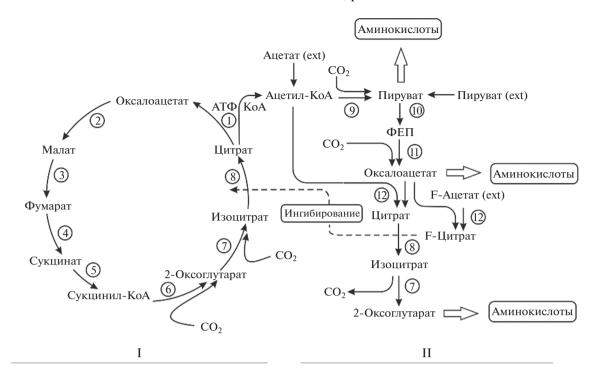
Обнаружение генов цитратсинтазы во всех исследованных нами геномах зеленых серных бактерий, их коэволюция с генами 16S рРНК, выявление активности этого фермента в клетках штамма С *Cba. limnaeum*, а также невозможность объяснения



**Рис. 4.** Филогенетические деревья, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и транслированных аминокислотных последовательностей генов АТФ-цитратлиазы (*aclB*) культивируемых зеленых серных бактерий (филум *Chlorobi*). Шкала показывает количество нуклеотидных/аминокислотных замен. Точки ветвления сколлапсированы для значений бутстреп-анализа не превышающих 70%.



**Рис. 5.** Филогенетические деревья, основанные на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и транслированных аминокислотных последовательностей генов цитратсинтазы (gltA) культивируемых зеленых серных бактерий (филум *Chlorobi*). Шкала показывает количество нуклеотидных/аминокислотных замен. Точки ветвления сколлапсированы для значений бутстреп-анализа не превышающих 70%.



**Рис. 6.** Механизм автотрофной ассимиляции  ${\rm CO_2}$  у штамма С *Cba. limnaeum.* 1 —  ${\rm AT\Phi}$ -цитратлиаза; 2 — малатдегидрогеназа; 3 — фумаратгидратаза; 4 — фумаратредуктаза; 5 — сукцинил-КоА синтаза; 6 — ферредоксин-зависимая 2-оксоглутаратсинтаза; 7 — изоцитратдегидрогеназа; 8 — аконитатгидратаза; 9 — ферредоксин-зависимая пируватсинтаза; 10 — пируваткиназа; 11 — 0 —

механизма ингибирующего действия фторацетата в рамках канонических представлений (Evans et al., 1966) дали основания предложить новый механизм ассимиляции углекислоты у зеленых серных бактерий (рис. 6).

В соответствии с полученными данными, автотрофная ассимиляция СО2 у зеленых серных бактерий происходит при участии двух топологически независимых ферментных комплексов: обращенного цикла трикарбоновых кислот (комплекс I), единственным продуктом активности которого является ацетил-КоА, и нециклического ферментного комплекса ферментов (комплекс II), при участии которого из ацетил-КоА, синтезированного в комплексе I, происходит синтез соединений, необходимых для построения клеток (рис. 6). Цитратсинтаза – фермент, объединяющий комплекс I и комплекс II в единую систему автотрофной ассимиляции СО2, и ацетил-КоА, единственный субстрат, которым обмениваются оба комплекса. Комплекс І включает две реакции карбоксилирования (2-оксоглутаратсинтазу и изоцитратдегидрогеназу), комплекс II – две дополнительные реакции карбоксилирования (пируватсинтазу и ФЕП-карбоксилазу). Синтез 2-оксоглутарата, используемого для синтеза большого числа аминокислот, происходит в результате декарбоксилирования изоцитрата, синтезированного внутри комплекса II. Реакция реализуется при участии изоцитратдегидрогеназы, функционирующей в обратном направлении, по сравнению с изоцитратдегидрогеназой в составе комплекса I. В результате этой реакции в энергетический метаболизм бактерий возвращается один восстановительный эквивалент.

Одновременное функционирование ферментных комплексов, имеющих различные функции, но использующих аналогичный (или похожий) набор ферментов возможно только при обеспечении локализации их субстратов внутри комплексов, где они синтезируются. Вопрос о способах такой локализации остается открытым, однако можно предположить, что она может обеспечиваться организацией соответствующих топологически обособленных мультиферментых комплексов. Хотя экспериментальное подтверждение этой гипотезы представляется чрезвычайно сложной задачей, в настоящее время растет количество данных, указывающих на активное вовлечение таких комплексов в метаболизм бактерий (Sweetlove, Fernie, 2018). Объединение ферментов, катализирующих последовательные реакции в метаболических путях, в мультиферментные комплексы может существенно облегчить регуляцию метаболизма, а также обеспечить эффективное функционирование ферментов, создавая высокие локальные концентрации их субстратов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.В. Лебединского за плодотворную дискуссию в процессе написания статьи.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-54-12031.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кеппен О.И., Турова Т.П., Ивановский Р.Н., Лебедева Н.В., Баслеров Р.В., Берг И.А. Филогенетическое положение трех штаммов зеленых серных бактерий // Микробиология. 2008. Т. 7. С. 282—285.

Keppen O.I., Tourova T.P., Ivanovsky R.N., Lebedeva N.V., Baslerov R.V., Berg I.A. Phylogenetic position of three strains of green sulfur bacteria // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 243–246.

https://doi.org/10.1134/S0026261708020203

Турова Т.П., Ковалёва О.Л., Горленко В.М., Ивановский Р.Н. Использование генов ферментов углеродного метаболизма в качестве молекулярных маркеров для представителей филума *Chlorobi* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 72—77.

https://doi.org/10.7868/S0026365614010157

*Turova T.P., Kovaleva O.L., Gorlenko V.M., Ivanovski R.N.* Use of genes of carbon metabolism enzymes as molecular markers of *Chlorobi* phylum representatives // Microbiology (Moscow). 2013. V. 83. P. 784–793.

https://doi.org/10.1134/S0026261714010159

Alexander B., Andersen J.H., Cox R.P., Imhoff J.F. Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16S rRNA and of the Fenna–Matthews–Olson protein // Arch. Microbiol. 2002. V. 178. P. 131–140.

https://doi.org/10.1007/s00203-002-0432-4

Evans M.C., Buchanan B.B., Arnon D.I. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1966. V. 55. P. 928–934.

https://doi.org/10.1073/pnas.55.4.928

*Hall T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. V. 41. P. 95–98.

Hügler M., Sievert S.M. Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean // Annu. Rev. Mar. Sci.

2011. V. 3. P. 261-289.

https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142712

*Imhoff J.F.* Phylogenetic taxonomy of the family *Chlorobiaceae* on the basis of 16S rRNA and fmo (Fenna–Matthews–Olson protein) gene sequences // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 941–951. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02403-0

*Ivanovsky R.N., Krasilnikova E.N., Fal Y.I.* A pathway of the autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Chloroflexus aurantiacus* // Arch. Microbiol. 1993. V. 159. P. 257–264. https://doi.org/10.1007/BF00248481

*Ivanovsky R.N., Sintsov N.V., Kondratieva E.N.* ATP-linked citrate lyase activity in the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum* // Arch. Microbiol. 1980. V. 128. P. 239–241.

https://doi.org/10.1007/BF00406165

Larsen H. On the culture and general physiology of the green sulfur bacteria // J. Bacteriol. 1952. V. 64. P. 187–196.

https://doi.org/10.1128/jb.64.2.187-196.1952

*Proudfoot A.T., Bradberry S.M., Vale J.A.* Sodium fluoroacetate poisoning // Toxicol. Rev. 2006. V. 25. P. 213—219. https://doi.org/10.2165/00139709-200625040-00002

Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.

https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

Sirevag R., Ormerod J.G. Carbon dioxide-fixation in photosynthetic green sulfur bacteria // Science. 1970. V. 169. P. 186–188.

https://doi.org/10.1126/science.169.3941.186

Sweetlove L.J., Fernie A.R. The role of dynamic enzyme assemblies and substrate channelling in metabolic regulation // Nature Commun. 2018. V. 9. P. 2136.

https://doi.org/10.1038/s41467-018-04543-8

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 // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 4673–4680.

https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673

*Trueper H.G., Schlegel H.G.* Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae*. I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // Antonie van Leeuwenhoek. 1964. V. 30. P. 225–238.

https://doi.org/10.1007/bf02046728

Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci. 1994. V. 10. P. 569—570. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.5.569

*Villafranca J.J.*, *Platus E*. Fluorocitrate inhibition of aconitase. Reversibility of the inactivation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 55. P. 1197–1207.

https://doi.org/10.1016/s0006-291x(73)80021-x

### A New Approach to the Mechanism of Autotrophic CO<sub>2</sub> Assimilation in Green Sulfur Bacteria

R. N. Ivanovsky<sup>1, \*</sup>, N. V. Lebedeva<sup>1</sup>, and T. P. Tourova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University, Moscow, 119191 Russia

<sup>2</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: mguru@mail.ru

Received January 19, 2022; revised January 25, 2022; accepted January 25, 2022

**Abstract**—The autotrophic system of CO<sub>2</sub> fixation in *Chlorobaculum limnaeum* strain C consists of two topologically independent enzyme complexes: the reverse tricarboxylic acid cycle (complex I) with acetyl-CoA as the only product, and a noncyclic complex of reactions (complex II). The reactions catalyzed by the complex II enzymes use acetyl-CoA synthesized in the reverse TCA cycle to synthesize all the substrates required for biomass synthesis. Complex I includes two carboxylation reactions catalyzed by pyruvate synthase and PEP carboxylase. Complex II includes two additional carboxylation reactions, which are catalyzed by 2-oxoglutarate synthase and isocitrate dehydrogenase. The enzyme complexes I and II are united into a system of autotrophic CO<sub>2</sub> assimilation by citrate synthase, which is not present in the classical variant of the Arnon-Buchanan cycle. The citrate synthase gene was detected in all studied green sulfur bacteria and may be considered to be among the housekeeping genes.

Keywords: green sulfur bacteria, reverse tricarboxylic acid cycle, autotrophic CO<sub>2</sub> assimilation

#### \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

# ГЕНОМНЫЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РОДОВ *HALOMONAS* И *MARINOBACTER* ИЗ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ<sup>1</sup>

© 2022 г. Т. П. Турова<sup>а</sup>, Д. Ш. Соколова<sup>а</sup>, Е. М. Семенова<sup>а</sup>, А. П. Ершов<sup>а</sup>, Д. С. Груздев<sup>b</sup>, Т. Н. Назина<sup>а, \*</sup>

 $^a$ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия  $^b$ SciBear OU, Tallinn, 10115 Estonia

\*e-mail: nazina@inmi.ru
Поступила в редакцию 25.01.2022 г.
После доработки 27.01.2022 г.
Принята к публикации 27.01.2022 г.

При эксплуатации нефтяных пластов с высокоминерализованными водами, отделенная от нефти вода закачивается обратно в пласты, что в ряде случаев приводит к увеличению солености среды и ограничивает возможность применения биотехнологий повышения нефтеизвлечения. Микробное сообщество таких пластов сравнительно мало изучено. Два штамма галофильных углеводородокисляющих бактерий Halomonas titanicae TAT1 и Marinobacter lutaoensis KAZ22 выделены из нефтяных пластов с минерализованной пластовой водой, определены их физиологические и геномные характеристики, детерминирующие их присутствие в этих местообитаниях, и возможность биотехнологического применения. Штаммы H. titanicae TAT1 и M. lutaoensis KAZ22 растут аэробно на сырой нефти в интервале температуры от 4 до 42 и от 22 до 55°C соответственно и имеют оптимумы роста при солености 2–12 и 5–10% NaCl (вес/об.). Феноменологические наблюдения деградации н-алканов нефти подтверждены обнаружением трех генов (alkB1, alkB2 и almA), кодирующих алкан-1-монооксигеназы, в геноме штамма KAZ22, и одного гена alk B в геноме штамма TAT1. В геноме штамма H. titanicae TAT1 аннотированы все гены образования осмопротекторов бетаина, эктоина и гидроксиэктоина, а у штамма M. lutaoensis KAZ22 - гены образования эктоина и гидроксиэктоина. Рост штамма KAZ22 на нефти сопровождается снижением поверхностного натяжения среды более чем на 20 мН/м. Вследствие отсутствия гена нитритредуктазы nir K анаэробный рост штамма H. titanicae ТАТ1 в среде с ацетатом и нитратом приводит к накоплению около 100 мг нитрита/л, который может подавлять рост сульфидогенов. Биологические особенности штаммов и анализ геномов позволяют рекомендовать нагнетание нитрата и штамма *H. titanicae* TAT1 для биоаугментации нефтяных резервуаров с минерализованной пластовой водой для подавления коррозии и снижения содержания сульфида, а M. lutaoensis KAZ22 — для очистки от нефтяных загрязнений и увеличения нефтеотдачи пластов.

**Ключевые слова:** нефтяные пласты, галофилы, Halomonas, Marinobacter, геномы, гены alkB и almA, окисление H-алканов

**DOI:** 10.31857/S0026365622300036

Галофильные органотрофные гаммапротеобактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* часто встречаются в составе микробных сообществ местообитаний с высокой соленостью, включая морские водоемы, глубинные подземные горизонты, гидротермальные венты, нефтяные пласты, сточные воды нефтедобывающих предприятий, загрязненные нефтью почвы и поверхностные соленые озера (Huu et al., 1999; Mnif et al., 2009; Kaye et al., 2010; Al-Mailem et al., 2010; Fathepure, 2014; Luo et al.,

2015). Широкое распространение этих бактерий свидетельствует о потенциальном вкладе в биогеохимические циклы элементов в высокосоленых местообитаниях. Особый интерес представляют галофильные углеводородокисляющие бактерии, обитающие в нефтяных пластах. Пластовая вода многих нефтяных месторождений имеет высокую соленость, что осложняет нефтедобычу, очистку и утилизацию нефтезагрязненных вод. Применение микробных технологий на таких месторождениях ограничено вследствие негативного воздействия соли на микроорганизмы, включая разрушение клеточной стенки, денатурацию ферментов, а также низкой растворимости кислорода в этих

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622300036 для авторизованных пользователей.

условиях (Fathepure, 2014). Положительное воздействие микроорганизмов на вытеснение нефти обусловлено жизнедеятельностью углеводородокисляющих бактерий, рост которых на нефти всегда сопровождается образованием поверхностно-активных веществ (Беляев и соавт., 2004). Некоторые углеводородокисляющие бактерии образуют не только био-ПАВ, но и экзополисахариды, что может быть использовано также в биотехнологиях повышения нефтеотлачи.

Из нефтяных пластов с высокоминерализованными водами были выделены галофильные и галотолерантные бактерии родов Halomonas, Marinobacter, Bacillus (Huu et al., 1999; Ben Ali Gam et al., 2007; Mnif et al., 2009; Fathepure, 2014; An et al., 2017) и археи Haloferax, Halorubrum (Halobacterium), Halococcus (Звягинцева и соавт., 1995), использующие углеводороды нефти. Бактерии росли в интервале температуры, рН и солености, характерных для нефтяного пласта; использовали широкий спектр углеводородов, жирных кислот, спиртов и сырую нефть. Сообщалось о выделении галотолерантных углеводородокисляющих бактерий родов Rhodococcus, Gordonia, Dietzia и Pseudomonas из нефти и пластовых вод месторождений Татарстана, Западной Сибири и Вьетнама (Борзенков и соавт., 2006).

Хотя бактерии родов Halomonas и Marinobacter имеют похожие физиологические характеристики и используют широкий круг субстратов и сырую нефть, в нефтяных пластах обычно преобладают бактерии одного из родов. Например, на высокотемпературном нефтяном месторождении Узень, заводняемом морской водой, бактерии рода Marinobacter были минорными компонентами микробных сообществ пластовой воды и становились доминирующей группой в посевах проб воды на среды с нитратом и органическими субстратами (Sokolova et al., 2021). В обработанном нитратом нефтяном пласте Северного моря наряду с доминирующими нитратредуцирующими бактериями рода Terasakiella присутствовали бактерии рода Marinobacter, способные расти на спиртах и жирных кислотах, восстанавливая нитраты (Bødtker et al., 2009). Галофильные/галотолерантные бактерии родов Halomonas, Marinobacter, Halanaerobium, Modicisalibacter и Chromohalobacter входили в состав культур денитрифицирующих бактерий, растущих при высокой солености среды (2.5 M NaCl), полученных из пластовой воды месторождения в Канаде (Bakken field, An et al., 2017). Внесение нитрата в хемостат с культурой сульфатредуцирующих бактерий из пластовой воды этого месторождения сопровождалось восстановлением нитрата до нитрита бактериями рода *Halomonas*, что приводило к подавлению роста сульфидогенов.

Из нефтяных месторождений в Тунисе выделен штамм *Halomonas* sp. C2SS100 и галофильная

бактерия Modicisalibacter tunisiensis LIT2<sup>T</sup> семейства Halomonadaceae, которые росли в среде с нефтью в присутствии 0—14 и 1—25% NaCl (вес/об.) соответственно и имели оптимумы температуры при 37°С (Веп Ali Gam et al., 2007; Mnif et al., 2009). Из пластовой воды нефтяного месторождения во Вьетнаме выделена галотолерантная углеводородокисляющая бактерия Marinobacter aquaeolei (позднее отнесенная к виду Marinobacter hydrocarbonoclasticus и затем к Marinobacter nauticus), которая росла с среде, содержащей от 0 до 20% NaCl (оптимум 5% NaCl) при температуре от 13 до 50°С (оптимум 30°С) (Huu et al., 1999).

Таким образом, бактерии родов *Halomonas* и *Marinobacter* в аэробных условиях могут расти на сырой нефти с образованием биоПАВ, а в анаэробных условиях расти гетеротрофно на органических субстратах, восстанавливая нитрат до нитрита или молекулярного азота. Какие биологические особенности позволяют им населять нефтяные пласты с минерализованными водами и разной температурой, и как эти бактерии могут быть использованы в биотехнологиях очистки от нефтяных загрязнений, увеличения нефтеотдачи или подавления коррозии, представляет научный и практический интерес.

В настоящее время известны четыре системы монооксигеназ, позволяющие микроорганизмам использовать *н*-алканы нефти: трансмембранные алкан-гидроксилазы (монооксигеназы), AlkB, флавин-зависимые монооксигеназы, окисляющие длинноцепочечные алканы, AlmA и LadA, а также цитоплазматические цитохром P450-монооксигеназы. Некоторые бактерии, выделенные из нефтезагрязненных вод, в частности, *Amycolicicoccus subflavus* DQS3-9A1<sup>T</sup>, содержат в геноме все известные системы алкан-гидроксилаз (Nie et al., 2013).

Из пластовой воды Ромашкинского нефтяного месторождения (Россия) и из нефтяного месторождения Узень (Республика Казахстан) нами были выделены два штамма — *Halomonas titanicae* TAT1 и *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 соответственно.

Целью настоящего исследования было изучение физиологии и геномных детерминант деградации *н*-алканов и устойчивости к повышенной солености у галофильных бактерий родов *Halomonas* и *Marinobacter*, выделенных из нефтяных пластов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Бактериальные штаммы.** В работе использовали бактериальные штаммы *Halomonas titanicae* TAT1 (VKM B-3500D) и *Marinobacter lutaoensis* KAZ22 (VKM B-3501D), выделенные ранее из проб пластовой воды залежи 302 Ромашкинского нефтяного месторождения (Республика Татарстан, Россия)

и нефтяного месторождения Узень (Республика Kазахстан) соответственно (Grouzdev et al., 2020). Характеристика проб пластовой воды, используемой для выделения штаммов, приведена в табл. S1 (дополнительные материалы). Нефтяные пласты залежи 302 располагаются на глубине 493-515 м ниже уровня моря, имеют температуру 17-23°C. Пластовая вода имеет общую соленость от 17.0 до 23.4 г/л. Вода содержит сульфаты и сульфид (от 150 до 290 мг/л); pH варьирует от 6.8 до 7.9 (Nazina et al., 2013). Для поддержания пластового давления в залежь нагнетают пресную речную воду, смешанную с пластовой водой. Нефтяные пласты месторождения Узень залегают на глубине 1080— 1370 м, имеют температуру около 57-68°C, заводняются сточной нефтепромысловой водой, смешанной с водой Каспийского моря. Штамм КАZ22 выделен из пробы воды, изливающейся из призабойной зоны нагнетательной скважины 2755, где температура пласта снижалась до 40-45°C; пластовая вода относилась к хлоркальциевому типу, ее минерализация составляла 51.4 г/л, рН 6.6 (Sokolova et al., 2021).

Состав сред и условия культивирования бактерий. Бактерии культивировали на минеральной среде, содержащей (г/л):  $K_2HPO_4 - 1.5$ ;  $KH_2PO_4 - 0.75$ ;  $NH_4Cl - 1.0$ ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0.1$ ;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O - 0.02$ ; KCl - 0.1; дрожжевой экстракт - 0.5; NaCl - 100.0; раствор микроэлементов; рН 6.8-7.2. В качестве источника углерода и энергии в среду вносили сырую тяжелую нефть (1%, об./об.) плотностью  $0.932 \, \text{г/см}^3$ , содержащую 23.5% насыщенных углеводородов, 42.3% ароматических углеводородов, 30.1% смол и 4.1% асфальтенов. Бактерии культивировали на качалке (110 об./мин) при температуре 28°C, если не указано иное. Спектр используемых субстратов определяли в минеральной среде того же состава; сахара, пептон, триптон и дрожжевой экстракт добавляли в концентрации 0.5% (вес/об.), спирты, соли органических кислот -0.2% (вес/об.), аминокислоты -0.1-0.2% (вес/об.). Контролем служила инокулированная среда без субстрата. Анаэробный рост исследовали, используя среду с ацетатом в качестве источника углерода и энергии, и нитратом натрия (0.85 г/л) в качестве акцептора электронов. Оптимум солености и диапазоны роста определяли на указанной выше среде, содержащей от 0 до 20% NaCl (вес/об.). Интервал температуры для роста определяли в среде, оптимальной по солености, после 7 сут инкубации. Рост оценивали по изменению величины оптической плотности среды  $(OD_{660})$  и микроскопированием посевов. С использованием наборов API 50CH и API ZYM ("Biomerieux", Франция) анализировали спектр используемых субстратов и ферментативную активность штаммов.

**Определение использования** *н***-алканов нефти.** Биодеградацию нефти оценивали после инкуба-

ции штаммов в указанной выше минеральной среде, содержащей 0.5 г/л нефти и 0.05 г/л дрожжевого экстракта, после 7 сут инкубации при 37°С. Изменение содержания *н*-алканов в деградированной нефти определяли газохроматографическим методом по сравнению с контролем (в %), как описано ранее (Борзенков и соавт., 2006).

Методы молекулярной идентификации штаммов и детекции генов алкан-монооксигеназ. ДНК выделяли из биомассы штаммов с использованием набора реактивов "DIAtom<sup>TM</sup>DNA Prep100" ("Биоком", Россия) согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Чистые культуры идентифицировали методом анализа гена 16S pPHK с использованием универсальных праймеров (Lane, 1991). Гены алкан-монооксигеназ (alkB,  $ladA\alpha$ ,  $ladA\beta$ , ladB, сур 153А) амплифицировали с использованием праймеров, приведенных в табл. S2 (дополнительные материалы). Секвенирование ДНК проводили по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 3730 DNA Analyzer, с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDve<sup>TM</sup> Terminator v 3.1 ("Applied Biosystems", США). При детекции генов алкангидроксилаз использовали штаммы из коллекции лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН, а также штамм Geobacillus icigianus G1w1<sup>T</sup> (=VKM  $B-2853^{T} = DSM \ 28325^{T}$ ), предоставленный сотрудниками Института цитологии и генетики СО PAH (Bryanskaya et al., 2015).

Секвенирование и анализ геномов. Штамм KAZ22 выращивали аэробно в среде LB с 5% (вес/об.) NaCl при температуре 40°C, клетки собирали центрифугированием через 7 сут культивирования. ДНК очищали от клеточной биомассы с помощью цетилтриметиламмоний бромида (Wilson, 2001). Библиотеки ДНК были подготовлены с помощью набора реагентов (NEBNext DNA library preр для Illumina, "New England Biolabs"). Секвенирование геномной ДНК проводили на HiSeq 2500 ("Illumina Inc.", США) в формате парно-концевых прочтений  $2 \times \times 150$  п.н. Качество последовательностей проверяли с помощью FastQC v. 11.7 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Последовательности были обрезаны с помощью Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). Отфильтрованные по качеству риды были de novo собраны с помощью SPAdes v. 3.13.0 с использованием настроек по умолчанию (Bankevich et al., 2012). Полноту и контаминацию геномов оценивали с использованием программы CheckM v1.0.18 (Parks et al., 2015). Собранные геномы анализировали с помощью GTDB-Tk 1.0.2 для определения филогенетически близких таксонов (Chaumeil et al., 2019). Среднюю нуклеотидную идентичность (ANI) оценивали с помощью FastANI v. 1.3 (Jain et al., 2018). Цифровую ДНК—ДНК-гибридизацию (dDDH) геномов проводили с использованием Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v. 2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013). Идентификацию белок-кодирующих последовательностей и первичную аннотацию геномов проводили с помощью NCBI Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2013).

Геном штамма ТАТ1 был секвенирован и расшифрован ранее, как описано в статье (Grouzdev et al., 2020).

Биоинформатический анализ. Реконструкцию возможных путей метаболизма алканов и осмопротекторов проводили на основании сравнения геномов исследуемых штаммов с использованием онлайн-сервисов NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/), PATRIC (https://www.patricbrc.org) и KEGG (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html). Сравнение кластеров генов деградации алканов и синтеза осмопротекторов проводили с использованием онлайн-сервиса Gene Graphics (https://katlabs.cc/genegraphics/app).

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штаммов *H. titanicae* ТАТ1 и *M. lutaoensis* КАZ22 были помещены в GenBank под номерами МК478935 и МТ277027, геномы депонированы в DDBJ/EMBL/GenBank под номерами JABWTB010000000 и JABWTC0000000000 соответственно.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические характеристики выделенных галотолерантных бактерий и деградация нефти. Выделенные штаммы TAT1 и KAZ22 были идентифицированы на основании BLAST-анализа генов 16S рРНК с использованием базы данных GenBank. В результате анализа был обнаружен 100% уровень идентичности гена 16S рРНК штамма ТАТ1 с соответствующим геном типового штамма *Halomonas titanicae* BH1<sup>T</sup> (AC NR\_117300), а штамма KAZ22 - с типовым штаммом Marinobacter lutaoensis T5054<sup>T</sup> (AC NR 025116), ha ochoвании чего новые штаммы были отнесены к соответствующим видам. Штаммы Halomonas titanicae TAT1 и Marinobacter lutaoensis KAZ22 были представлены подвижными палочками, окрашивающимися по Граму отрицательно (табл. 1, рис. S1, дополнительные материалы). Фенотипически штаммы проявляли похожие свойства. В аэробных условиях использовали сахара, органические кислоты, аминокислоты, H-алканы нефти. Штамм H. titanicae TAT1 был способен также расти в анаэробных условиях в среде с ацетатом, восстанавливая нитрат с образованием около 100 мг нитрита/л. Штаммы *H. titanicae* TAT1 и *M. lutaoensis* KAZ22 имеют оптимумы роста при солености 2.0-12 и

5-10% NaCl (вес/об.) соответственно (табл. 1). Эти значения совпадают с оптимумами солености (0.5-2.5 М) группы умеренных галофилов, согласно классификации (Edbeib et al., 2016). Способность штамма ТАТ1 расти в отсутствие соли в среде позволяет отнести его к группе галотолерантных бактерий, тогда как штамм КАZ22 является галофилом. Штамм H. titanicae TAT1 проявлял психротолерантные свойства и рос при температуре от 4 до  $42^{\circ}$ C, а штамм *M. lutaoensis* KAZ22 был термотолерантным и рос при более высокой температуре (22-55°C). Интервалы температуры и солености для роста штаммов ТАТ1 и KAZ22 соответствовали условиям их местообитания в нефтяных пластах. Штамм H. titanicae TAT1 проявлял слабый рост на нефти, используя длинноцепочечные  $C_{20}$ – $C_{23}$  и  $C_{26}$ – $C_{32}$  *н*-алканы (рис. S2a). Штамм M. lutaoensis KAZ22 использовал  $C_{14}-C_{19}$ н-алканы нефти (рис. S2б). Штамм TAT1 рос на тяжелой нефти, снижая поверхностное натяжение и межфазное натяжение среды (против гексадекана) более чем на 10 мН/м по сравнению со стерильной средой. Штамм КАZ22 проявлял реологические свойства как при росте на нефти, так и на растворимых субстратах; он снижал проверхностное натяжение более чем на 20 мН/м и межфазное (против гексадекана) - на 10 мН/м, вызывая эмульгирование среды (индекс эмульгирования Е<sub>24</sub> составлял 20%). Время удвоения µ штамма КАZ22 составляло 0.58 сут<sup>-1</sup> в среде с бакто-триптоном  $(5.0 \, \Gamma/\pi)$ , дрожжевым экстрактом  $(2.5 \, \Gamma/\pi)$ , глюкозой (1.0 г/л) и 60 г NaCl/л при 37°C. Способность расти в широком интервале температуры, вероятно, обусловливает присутствие штамма KAZ22 в призабойной зоне нагнетательной скважины высокотемпературного нефтяного месторождения Узень. Нагнетание сточной нефтепромысловой воды, смешанной с водой Каспийского моря, приводит к локальному снижению температуры пласта с 57-68°С до 40-45°С (Sokolova et al., 2021). Таким образом, температурный режим и общая минерализация пластовой воды (51.4 г/л) в зоне нагнетательной скважины 2755 были благоприятны для роста штамма KAZ22. Поступление кислорода, растворенного в закачиваемой воде, поддерживает рост популяции аэробных нефтеокисляющих бактерий в зоне нагнетания.

Детекция генов окисления и-алканов. С использованием тотальной ДНК и вырожденных праймеров, приведенных в табл. S1, был выполнен поиск генов деградации алканов (alkB,  $ladA\alpha$ ,  $ladA\beta$ , ladB, cyp153A и almA) у галофильных бактерий H. titanicae ТАТ1 и M. lutaoensis KAZ22. Ожидаемая длина ПЦР-продуктов генов alkB-500 п.н.,  $ladA\alpha$  и  $ladA\beta-$  около 1500 п.н., ladB- около 1000 п.н., cyp153-800 п.н. и almA- около 1100 п.н. В качестве положительного контроля использовали штамм Geobacillus icigianus  $G1w1^T$ , у которого ранее были

**Таблица 1.** Фенотипические признаки галофильных/галотолерантных бактерий *M. lutaoensis* KAZ22 и *H. titani- cae* TAT1, выделенных из нефтяных пластов

| Признак   | TAT1                                | KAZ22                                      |
|---|-------------------------------------|--|
| Морфология клеток   | Палочки                             | Палочки                                    |
| Размер клеток (мкм)   | 0.6 × 2.0                           | $2.0-3.5 \times 0.6-1.0$                   |
| Подвижность   | +                                   | +  |
| Интервал (оптимум) NaCl для роста, % (вес/об.)  | 0-20 (5-10)                         | 0.5-14 (2.0-12)                            |
| Интервал (оптимум) температуры для роста, °С  | 4-42 (37)                           | 22-55 (28-37)                              |
| Образуют кислоту из:  |                                     |  |
| мальтоза  | +                                   | +  |
| манноза   | -                                   | +  |
| маннит, сахароза  | +                                   | _  |
| Используют:   |                                     |  |
| <i>н</i> -алканы нефти  | +                                   | +  |
| ацетат  | +/-                                 | +  |
| формиат, бутират, бензоат   | _                                   | _  |
| валерат   | _                                   | +/-  |
| цитрат  | +                                   | _  |
| пируват, сукцинат, фумарат, глутамат  | +                                   | +  |
| DL-фенилаланин  | +                                   | _  |
| нафталин  |                                     | +  |
| $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$   | +                                   | _  |
| $NO_3^- \rightarrow N_2$  | _                                   | _  |
| Образование H <sub>2</sub> S  | _                                   | _  |
| Уреаза  | +                                   | _  |
| Активность ферементов (API Zym):  |                                     |  |
| щелочная фосфатаза, эстераза (С4), лейцин ариламидаза, валин ариламидаза, цистин ариламидаза, нафтол-AS-BI-фосфогидролаза β-глюкозидаза | +                                   | +  |
| $\alpha$ -химитрипсин, $\beta$ -галактозидаза, $\beta$ -глюкуронидаза, $\alpha$ -фукозидаза   | _                                   | _  |
| эстераза липаза (С8), липаза (С14), N-ацетил- $\beta$ -глюкозаминидаза, $\alpha$ -маннозидаза   | _                                   | +  |
| трипсин, кислая фосфатаза, α-глюкозидаза  | +                                   | _  |
| Г + Ц генома, %   | 54.6                                | 63.4                                       |
| Филогенетически близкий вид   | Halomonas titanicae BH <sup>T</sup> | Marinobacter lutaoensis T5054 <sup>T</sup> |
| Сходство генов 16Ѕ рРНК, %  | 99.73                               | 99.9%                                      |

обнаружены гены alkB,  $ladA\alpha$ ,  $ladA\beta$  и ladB (Tourova et al., 2018).

В результате ПЦР с использованием праймеров, специфичных гену *alkB*, ПЦР-продукт ожи-

даемой длины (около 500 п.н.) был получен для M. lutaoensis KAZ22, H. titanicae TAT1 и G. icigianus G1w1<sup>T</sup> (рис. S3a). С использованием праймеров к гену ladA, кодирующему алкан-монооксигеназу,

| Таблица 2. Характеристика геномов | бактерий <i>H titanicae</i> | <b>ТАТ1</b> и <i>М</i> | lutagensis KAZ22  |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------|
| 1aonna 2. Mapakicphcinka ichomob  | Oakicpini II. mamicat       | . 1711 H M.            | iniuochsis IXALLL |

| Характеристика                                    | H. titanicae TAT1                             | M. lutaoensis KAZ22                              |
|---|---|--|
| Биопроект   | PRJNA637646                                   | PRJNA638879                                      |
| Номер в Генбанке                                  | JABWTB010000000                               | JABWTC000000000                                  |
| Размер генома (п.н.)                              | 5303463                                       | 3460169  |
| Г + Ц генома, %                                   | 54.6  | 63.4   |
| Полнота сборки/контаминация, %                    | 100.0/0.9                                     | 99.56/0.29                                       |
| Количество парноконцевых ридов                    | 8878727                                       | 5406706  |
| N <sub>50</sub> (π.ο.)                            | 381 158                                       | 111 938  |
| Покрытие (×)                                      | 285   | 460  |
| Общее количество генов                            | 4908  | 3231   |
| Количество белок-кодирующих генов                 | 4743  | 3066   |
| Количество генов (РНК)                            | 67  | 60   |
| Ближайший родственный вид (номер геномной сборки) | H. titanicae BH1 <sup>T</sup> (GCF_000336575) | M. lutaoensis T5054 <sup>T</sup> (GCF_001981305) |
| ANI/dDDH  | 99.8%/99.2%                                   | 99.3%/94.7%                                      |

участвующую в деструкции длинноцепочечных алканов (гены  $ladA\alpha$ ,  $ladA\beta$ , ladB), специфичный ПЦР-продукт был получен только для контрольного штамма G. icigianus  $G1w1^T$  (рис. S36-S3r). У других исследуемых штаммов бактерий продукт не был детектирован. С праймерами к гену цитохром-подобной монооксигеназы (cyp153) специфичная амплификация наблюдалось только с ДНК R. erythropolis HO-KS22 (рис. S3d). Специфичный ПЦР-продукт гена almA (около 1100 п.н.) получен для всех исследованных штаммов маринобактеров (рис. S3e).

Характеристика геномов Halomonas titanicae TAT1 и Marinobacter lutaoensis KAZ22. Геном H. titanicae TAT1 состоял из 51 скаффолда общим размером 5303463 п.н., имел среднее покрытие 285× и G + С содержание 54.6% (табл. 2). Значения ANI и dDDH с близкородственным геномом H. titanicae BH1<sup>T</sup> составили 99.8 и 99.2% соответственно, что подтверждает идентификацию штамма как представителя этого вида (Grouzdev et al., 2020). Геном содержал 4910 генов, из которых 4757 были белок-кодирующими генами и 67 кодирующими РНК. Функциональная аннотация генома, выполненная с использованием RASTtk, выявила 409 генов связанных с метаболизмом аминокислот и их производных, 273 гена связанных с углеводным обменом, 212 генов — с метаболизмом кофакторов, витаминов, пигментов и 169 генов ассоциированных с белковым обменом. Анализ генома, основанный на результатах функционального предсказания белков с помощью BlastKOALA, позволяет предположить, что геном штамма ТАТ1 содержит все ключевые гены, отвечающие за полные пути углеводного обмена: гликолиз (путь Эмбдена—Мейергофа), окисление пирувата, цитратный цикл (ЦТК), пентозофосфатный путь, путь Энтнера—Дудорова, деградация D-глюкуроната и D-галактоната, глиоксилатный цикл. Кроме того, геном содержит гены деградации бензоата (benABCDE) и катехола (catABC), организованные в единый генный кластер. Геном ТАТ1 несет гены cysND, cysC, cysH, cysI, ответственные за ассимиляционную сульфатредукцию.

В результате секвенирования и сборки генома штамма KAZ22 было получено 70 скаффолдов общим размером 3460 169 п.н. и содержанием G + C 63.4%. Значения ANI и dDDH для KAZ22 и ближайшего штамма M. lutaoensis  $T5054^T$  составили 99.3 и 94.7% соответственно, что указывает на принадлежность изолированного штамма к этому виду. Геном штамма M. lutaoensis KAZ22 содержал 3236 генов, из них 3059 белок-кодирующих последовательностей, 117 псевдогенов и 60 генов РНК. Анализ с помощью RASTtk показал, что 183 гена связаны с углеводным обменом, 308 генов с метаболизмом аминокислот и их производных. 189 генов - c метаболизмом белков, 127 генов - cметаболизмом кофакторов, витаминов и пигментов. Геном штамма KAZ22 несет полные наборы генов для гликолиза, окисления пирувата, цикла трикарбоновых кислот, пентозофосфатного пути, пути Энтнера-Дудорова, биосинтеза гликогена. Геном также имеет гены, необходимые для ассимиляционной сульфатредукции, а также сульфид:хиноноксидоредуктазу.

**Филогенетический анализ и структура генов окисления алканов.** Экспериментальные данные по ПЦР-детекции генов алкан-моноокигеназ, которые продемонстрировали амплификацю генов *alk B* 

и *almA* на матрице ДНК штамма *M. lutaoensis* KAZ22 и гена *alkB* на матрице ДНК штамма *H. ti-tanicae* TAT1, были подтверждены на основании анализа их геномов.

В геноме штамма М. lutaoensis KAZ22 было аннотировано 2 гена алкан-1-монооксигеназ (alkB1 и alk B2) длиной 1284 и 1140 п.н. соответственно. В базе данных GenBank транслированные аминокислотные последовательности этих генов (427 и 379 а.о.) были близки к аналогичным последовательностям разных видов и неидентифицированных штаммов рода Marinobacter. На филогенетическом дереве (рис. 1) эти последовательности составляли отдельные близкородственные кластеры в составе гаммапротеобактерий. Кластер видов, содержащих alkB1 ген, включал также штаммы Marinobacter sp. UBA856 и Marinobacter sp. UBA7807 (100% идентичности генов alkB1), типовой штамм M. lutaoensis  $T5054^{T}$  (97% идентичности с единственным геном alkB), а также M. salsuginis NBRC 109114 (87% идентичности генов alkB1). В кластер, к которому относился alkB2 ген штамма KAZ22, также входили alkB гены штаммов Marinobacter sp. UBA856 и Marinobacter sp. UBA7807 (100% идентичности) и M. salsuginis NBRC 109114 (83% идентичности) с высоким уровнем бутстреп-поддержки (100%). Однако в геноме типового штамма M. lutaoensis  $T5054^T$  ген alk B2 отсутствовал.

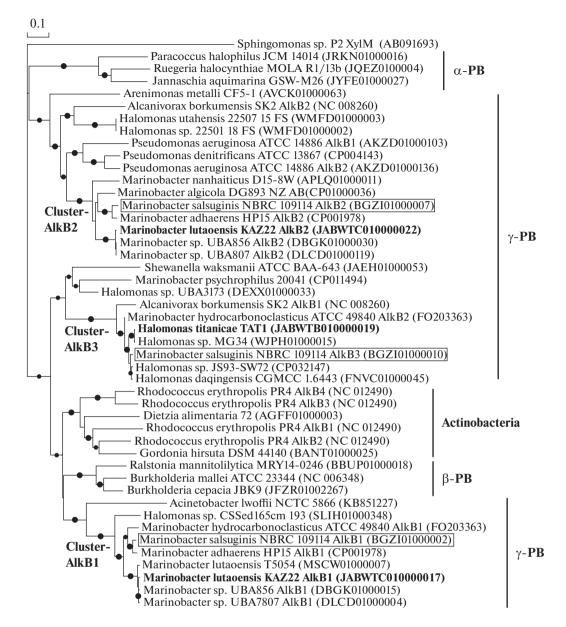
В результате аннотирования генома штамма H. titanicae TAT1 был выявлен единственный ген алкан-1-моноокисигеназы (alk B) длиной 1224 п.н., хотя в геноме типового штамма H. titanicae  $BH1^T$  этот ген отсутствует. В базе данных GenBank транслированная аминокислотная последовательность alkB гена *H. titanicae* TAT1 (407 а.о.) была наиболее близка к аналогичным последовательностям из геномов гамма-протеобактерий родов Halomonas и Marinobacter. На филогенетическом дереве транслированных аминокислотных последовательностей генов alkB (рис. 1) последовательность штамма TAT1 относилась к близкородственному кластеру, включающему гомологичные последовательности *Halo*monas sp. MG34, Halomonas sp. JS92-SW72 и H. dagingensis CGMCC 1.6443 (96-100% идентичности), а также M. hydrocarbonoclasticus ATCC 49840 (alkB2) (96% идентичности) и M. salsuginis NBRC 109114 (alkB3) (83% идентичности), с бутстреп-поддержкой 99%, что свидетельствует о достоверности ветвления.

Таким образом, alkB-гены штаммов H. titanicae ТАТ1 и M. lutaoensis KAZ22 распредилились на филогенетическом дереве по трем кластерам, которые были обозначены как "Marinobacter-AlkB1, AlkB2 и AlkB3" в соответствии с тройным набором alkB-генов в геноме штамма M. salsuginis NBRC 109114.

Кроме генов алкан-1-монооксигеназ, в геноме штамма M. lutaoensis KAZ22 был также аннотирован ген almA длиной 1527 п.н., кодирующий флавин-зависимую монооксигеназу (AlmA). В базе данных GenBank транслированная аминокислотная последовательность almA гена (508 a.o.) была наиболее близка к аналогичным последовательностям из геномов гамма-протеобактерий рода Marinobacter. На построенном филогенетическом дереве (рис. 2) almA ген штамма KAZ22 входил в близкородственный кластер генов разных видов рода Marinobacter с высоким уровнем бутстрепподдержки (100%). При этом наиболее близкими к нему также оказались гены штаммов Marinobacter sp. UBA856, Marinobacter sp. UBA7807 и типового штамма *M. lutaoensis* Т5054<sup>Т</sup> (100% идентичности).

Гены алкан-монооксигеназ присутствуют в большинстве геномов бактерий рода Marinobacter (alkB гены в 90% и almA гены в 86% из 362 геномов), при этом многие из них содержат больше одного гена на геном. Это свидетельствует о том, что способность к использованию н-алканов является важной частью метаболизма представителей этого рода. При этом некоторые штаммы сохранили полный набор генов алкан-монооксигеназ (alkB, alkB2, alkB3 и almA), аналогично штамму *M. salsuginis* NBRC 109114, а другие утрачивали гены из полного набора, что, возможно, было связано с особенностями их сред обитания. Штамм M. lutaoensis KAZ22, как и многие бактерии рода Marinobacter, входящие в "Marinobacter-AlkB1 и -AlkB2" филогенетические кластеры, характеризуется присутствием нескольких alk B-генов, расположенных в разных областях генома и не связанных с другими генами деградации н-алканов. Генная организация AlkB1-области была идентична для штаммов KAZ22, Marinobacter sp. UBA856, Marinobacter sp. UBA7807 и M. lutaoensis T5054 $^{\rm T}$ . Для этих штаммов alkB1-ген фланкирован противоположно направлеными генами, детерминирующими неизвестный белок и 3-метилмеркаптопропионил-КоА дегидрогеназу (рис. 3а). Похожая организация AlkB1-области выявлена для M. salsuginis NBRC 109114 и других штаммов Marinobacter-AlkB1 кластера.

Генная организация AlkB2-области также идентична для штамма KAZ22 и штаммов Marinobacter sp. UBA856, Marinobacter sp. UBA7807 и M. salsuginis NBRC 109114. В этой области alkB2-ген фланкирован геном лактоилглутатионлиазы (gloA) и противоположно направленным геном транскрипционного регулятора семейства GntR (рис. 36). Такая структура генной области AlkB2 характерна для многих представителей рода Marinobacter, обладающих гомологичным alkB-геном. Можно отметить, что в геноме типового штамма M. lutaoensis T5054<sup>T</sup> имеются аналогично направленные гены лактоилглутатионлиазы и



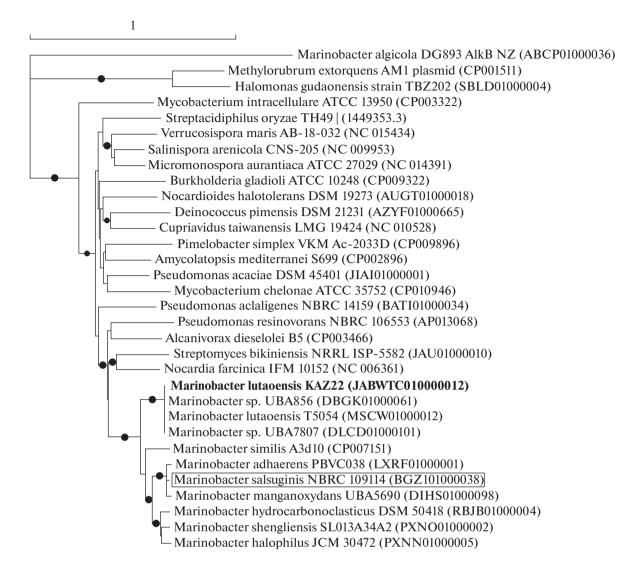
**Рис. 1.** Филогенетическое дерево транслированных аминокислотных последовательностей генов *alkB* различных филумов бактерий, включая бактерии родов *Marinobacter* и *Halomonas*. Дерево построено с использованием алгоритма maximum likelihood. Жирным шрифтом выделены последовательности, исследованные в данной работе, рамкой — штамм *M. salsuginis* NBRC 109114, в геноме которого представлено 3 *alkB*-гена. Точками обозначены ветви дерева с бутстреп-поддержкой больше 80%. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислотных остатков

транскрипционного регулятора семейства GntR, хотя ген alkB2 между ними отсутствет, что, видимо, связано с его потерей в процессе эволюции.

Генная организация AlmA-области штамма KAZ22 была похожа на таковую штамма *M. lutaoensis* T5054<sup>T</sup>, а также неидентифицированного штамма *Oceanospirillales* bacterium SP333. Ген *almA* был расположен одиночно и фланкирован геном неизвестного белка и противоположно направленным геном, предположительно сходным с трансглютаминазой (рис. 3в). Остальные бактерии рода

*Marinobacter*, включая *M. salsuginis* NBRC 109114, входящие в родственный кластер на филогенетическом дереве, имели другую структуру AlmA-области генома.

Исходя из сходства последовательностей генов деградации *н*-алканов штамма *M. lutaoensis* KAZ22, а также сходства структуры областей расположения этих генов в геномах, можно предположить эволюционную взаимосвязь его способности к деградации *н*-алканов с таковой других бактерий рода *Marinobacter*, из которых самым близким к



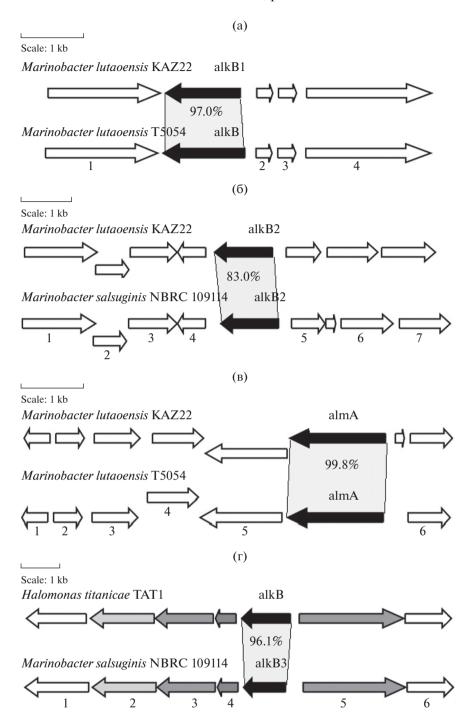
**Рис. 2.** Филогенетическое дерево транслированных аминокислотных последовательностей генов *almA* различных филумов бактерий, включая бактерии рода *Marinobacter*. Дерево построено с использованием алгоритма maximum likelihood. Жирным шрифтом выделена последовательность, исследованная в данной работе. Точками обозначены ветви дерева с бутстреп-поддержкой больше 80%. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислотных остатков.

нему является типовой штамм вида M. lutaoensis  $T5054^{T}$ .

Из 464 проанализированных геномов бактерий рода *Halomonas* всего в 5% геномов были аннотированы гены алкан-1-моноксигеназ (alkB), причем в каждом из этих геномов, как и в геноме штамма *H. titanicae* TAT1, был представлен единственный alkB ген. При этом структура AlkB-областей в геномах отдельных бактерий рода *Halomonas* была различной (рис. 3г). В области расположения гена alkB в геноме штамма *H. titanicae* TAT1 присутствовали и другие гены, участвующие в деградации *н*-алканов: ген рубредоксина, ген альдегидгидрогеназы alkH, ген алкогольдегидрогеназы alkJ, а также противоположно направленный ген активатора транскрипции alkB

генного кластера. Аналогичной генной структурой в этой области обладают геномы бактерий рода *Halomonas* (*Halomonas* sp. MG34 и *H. daqingensis* CGMCC 1.6443), нескольких штаммов рода *Marinobacter*, относящихся к филогенетическому кластеру "Marinobacter-AlkB3", включая *M. salsuginis* NBRC 109114 (alkB3) и *M. hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840, а также представителей других родов *Gamma*- и *Alphaproteobacteria* (Alcanivorax, Sulfitobacter, Hyphomonas, Bradvrhizobium).

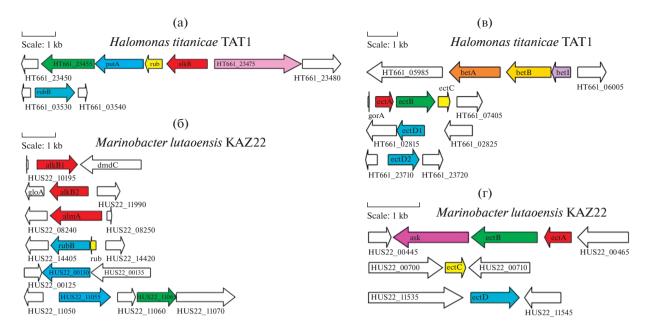
Сходство структуры достаточно протяженного участка генома позволяет предположить возможность появления детерминант деградации *н*-алканов и приобретения соответствующих процессов метаболизма у штамма *H. titanicae* TAT1 и близких к нему штаммов за счет межвидового горизон-



**Рис. 3.** Сравнение структуры геномных кластеров, содержащих аннотированные гены алкан-моноксигеназ у штаммов галофильных бактерий. Обозначения: (a) -1-3-метилмеркаптопропионил-КоА дегидрогеназа (DmdC), 2, 3—неизвестный белок, 4—предполагаемая фосфатаза; (б) -1—предполагаемая L-лактатдегидрогеназа, 2—субъединица YkgG неизвестного белка, 3—пермеаза, 4—лактоилглютатион лиаза (GloA), 5—транскрипционный регулятор семейства GntR; (в) -1—FAD/FMN-зависимая оксидоредуктаза, 2—регулятор транскрипции, 3—белок внешней мембраны, 4—тиоредоксин, 5—неизвестный белок, 6—предположительно трансглютаминаза; (г) -1—3-метилмеркаптопропионил-КоА лигаза, 2—алкогольдегидрогеназа (AlkJ), 3—альдегиддегидрогеназа (AlkH), 4—рубредоксин (Rub), 5—активатор транскрипции alkB-кластера, 6—ферредоксин-редуктаза.

тального переноса генов, вероятно, из геномов бактерий рода *Marinobacter*, для которых эта способность является характерной. Вероятно, такой

перенос обусловлен приспособлением штамма *H. titanicae* TAT1 к существованию в загрязненных нефтью водных средах, что существенно отличает



**Рис. 4.** Комплексы генов деградации *и*-алканов (а, б) и генов синтеза осмопротекторов (в, г) в геномах бактерий *H. titanicae* ТАТ1 (а, в) и *М. lutaoensis* КАZ22 (б, г). Обозначения генов: (а) — HT661-23455 — алкогольдегидрогеназа; HT661\_23480 — альдегиддегидрогеназа; rub — рубредоксин; alkB — алкан-1-монооксигеназа; HT661\_23475 — активатор транскрипции alkB-кластера; rubB — рубредоксинредуктаза; (б) — alkB1, alkB2, almA — алкан-1-монооксигеназа; rub — рубредоксин; rubB — рубредоксинредуктаза; HUS22\_00130, HUS22\_11055 — альдегиддегидрогеназа; HUS22\_11065 — алкогольдегидрогеназа; (в) — betA — холиндегидрогеназа; betB — бетаин-альдегиддегидрогеназа; ectA — диаминобутираттрансфераза; ectB — диаминобутираттрансаминаза; ectC — эктоинсинтаза; ectD1, ectD2 — эктоингидролаза; (г) — ectA — диаминобутиратацетилтрансфераза; ectB — диаминобутираттрансаминаза; ectC — эктоинсинтаза; ask — аспартаткиназа.

его от типового штамма H. titanicae BH1 $^{\rm T}$  (Sanchez-Porro et al., 2010) и других штаммов, идентифицированных как H. titanicae, которые выделены из морских сред и не имеют в геномах alkB генов.

Гены метаболизма н-алканов. Согласно базе данных KEGG, процесс деградации алканов включен в путь метаболизма "Деградация жирных кислот" (рис. S4a, S4б). Фермент алкан-моноксигеназа (ЕС 1.14.15.3) участвует в этом процессе как на начальной стадии окисления алканов, так и на терминальной стадии окисления ω-гидроксижирных кислот. Исходя из аннотации геномов M. lutaoensis KAZ22 и Н. titanicae TAT1 потенциальное присутствие этого фермента предполагается для обоих штаммов, при этом для *M. lutaoensis* KAZ22 показано присутствие двух форм фермента, как негемовой железо-содержащей формы (AlkB), так и флавин-зависимой формы (AlmA), а для H. titanicae TAT1 только формы AlkB (рис. S4a, S4б). Вместе с алкан-монооксигеназой в состав гидролазной системы окисления алканов входят белок рубредоксин и фермент рубредоксинредуктаза (ЕС 1.18.1.1), гены которых также представлены в геномах обоих штаммов. Однако локализация этих генов в геномах исследуемых штаммов различается. У H. titanicae TAT1 ген рубредоксина (rub) входит в один кластер с единственным геном alk B, а ген рубредоксинредуктазы (rubB) расположен на другом участке генома (рис. 4а, 4б). У *М. lutaoensis* КАZ22 оба этих гена составляют кластер, расположенный отдельно от каждого из генов алканмоноокисгеназы (*alkB1*, *alkB2* и *almA*). Другие гены метаболизма алканов, алкогольдегидрогеназа (ЕС 1.1.99.20 и ЕС 1.1.1.1) и альдегиддегидрогеназа (ЕС 1.2.1.3), расположены в одном кластере с геном *alkB* у *H. titanicae* ТАТ1 и на отдельных участках генома у *М. lutaoensis* КАZ22. Дополнительные сведения о генах деградации *н*-алканов представлены в табл. S3.

Гены метаболизма осмопротекторов. В геномах штаммов H. titanicae TAT1 и M. lutaoensis KAZ22 выполнен поиск генов образования основных осмопротекторов – бетаина и эктоина, которые в базе данных KEGG включены в путь "Метаболизм глицина, серина и треонина". В геноме *H. ti*tanicae TAT1 обнаружен кластер генов betIBA (табл. S4, рис. S5a), детерминирующих ферменты окисления холина до бетаинового альдегида (холиндегидрогеназа, ЕС 1.1.99.1) и далее до бетаина (бетаин-альдегиддегидрогеназа, (ЕС 1.2.1.8), что свидетельствует о потенциальной возможности синтеза бетаина. Кроме того, в геноме H. titanicaeТАТ1 присутствуют все гены образования осмопротекторов эктоина и гидроксиэктоина из аспартата и треонина через промежуточный метаболит аспартат-полуальдегид. Гены синтеза эктоина (ectA, ectB и *ectC*), как и в геномах других бактерий рода *Halomonas*, объединены в кластер, кодирующий диаминобутиратацетилтрансферазу (EC 2.3.1.178) (EctA), диаминобутираттрансаминазу (EC 2.6.1.76) (EctB) и эктоинсинтазу (EC 4.2.1.108) (EctC) (рис. 4в). Кроме того, в геноме штамма ТАТ1 аннотированы 2 гена (*ectD1* и *ectD1*), предположительно детерминирующие эктоиндегидрогеназу (EC 1.14.11.55), которые расположены каждый в различных участках генома (рис. 4в). Аналогичные системы образования осмопротекторов были подробно рассмотрены у *Chromohalobacter salexigens* (ранее *Halomonas elongata* DSM 3043) (Vargas et al., 2008).

В геноме штамма М. *lutaoensis* KAZ22 отсутствовали гены образования бетаина. В то же время в геноме этого штамма также аннотированы все гены образования осмопротекторов эктоина и гидроксиэктоина (рис. S56). Локализация этих генов в геноме похожа на локализацию аналогичных генов в геноме *M. hydrocarbonoclasticus* (ранее *M. aquaeoli*) (Vargas et al., 2008). Гены *есtA* и *есtB* сгруппированы в единый кластер вместе с геном *ask* аспартаткиназы (ЕС 2.7.2.4), а единственные гены *есtC* и *есtD* локализованы отдельно на различных участках генома (рис. 4г). Дополнительные сведения о генах синтеза осмопротекторов представлены в табл. S4.

Гены метаболизма бензоата у исследованных галофильных бактерий. В геноме штамма M. lutaoensis KAZ22 наряду с несколькими генами деградации н-алканов, присутствовало большое количество генов разложения ароматических соединений, таких как бензол, катехол, бензоат и фенилацетат. Бензоат является центраболитом деградации многих ароматических соединений. В геноме H. titanicae ТАТ 1 представлены гены, кодирующие ферменты аэробной деградации бензоата — бензоат-1.2-диоксигеназу (ЕС 1.14.12.10) и дигидроксициклогексадиен-дегидрогеназу (ЕС 1.3.1.25), которые катаболизируют превращения бензоата до катехола. Кроме того, в его геноме аннотированы гены всех ферментов орто-расщепления катехола, начиная с катехол 1,2-диоксигеназы (ЕС 1.13.11.1), как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА, а также гены фермента деградации фенола и толуола – толуол/фенол-2-монооксигеназы 1.14.13.244) (рис. S6). Отметим, что у галофильной бактерии *Amycolicicoccus subflavus* DQS3-9A1<sup>T</sup> при мульткопийности генов деградации н-алканов, отсутствовали гены деградации ароматических соединений (Nie et al., 2013). В отличие от этой бактерии, в геноме Polymorphum gilvum SL003B-26А1<sup>Т</sup> были обнаружены гены ферментов полных путей катаболизма ароматических соединений, но только единственный ген ladA кодировал деградацию  $\mu$ -алканов (Nie et al., 2012), хотя оба микроорганизма были выделены из загрязненных нефтью сред обитания.

Гены метаболизм азота у штамма *H. titanicae* TAT1. В анаэробных условиях штамм *H. titanicae* TAT1 рос гетеротрофно на органических субстратах, восстанавливая нитрат до нитрита. Феноменологические наблюдения восстановления нитрата до нитрита штаммом ТАТ1 подтвердились при анализе его генома, в котором были аннотированы гены ферментов, участвующих в диссимиляционном восстановлении нитрата до аммония: нитратредуктаза (гены narG, narZ, nxrA) (EC 1.7.5.1; 1.7.99.4), которая катализирует восстановление нитрата до нитрита, и нитритредуктаза (ген *nirB*) (ЕС 1.7.1.15), завершающая этот процесс восстановлением нитрита до аммония. Кроме того, в геноме *H. titanicae* TAT1, так же как в геноме типового штамма H. titanicae  $BH1^T$ , были аннотированы rensitiveнеполного пути денитрификации, в котором отсутствовал ключевой ген нитритредуктазы (nirK) (EC 1.7.2.1), кодирующий восстановление нитрита до оксида азота (рис. S7a). Это свойство ранее отмечалось для ряда штаммов группы H. titanicae(Wang, Shao, 2021).

Штамм M. lutaoensis KAZ22, как и типовой штамм M. lutaoensis T5054<sup>T</sup>, был неспособен расти анаэробно и восстанавливать нитрат, что подтверждалось отсутствием в его геноме генов нитратредуктаз. Однако в нем был аннотирован ген нитритредуктазы (ЕС 1.7.1.4), восстанавливающей нитрит до аммония в процессе ассимиляционной нитратредукции (рис. S7б).

Приведенные результаты изучения физиологии и анализ геномов галофильных/галотолерантных бактерий Marinobacter lutaoensis KAZ22 и Halomonas titanicae TAT1, выделенных из нефтяных пластов, свидетельствует о приспособленности штаммов к высокой солености среды местообитания. Штаммы способны расти при температуре нефтяного пласта, используя сырую нефть в аэробных условиях. Наличие трех генов alkB1, alkB2 и almA алкан-монооксигеназ у штамма M. lutaoensis KAZ22 позволяет ему эффективно деградировать н-алканы нефти, тогда как использование *н*-алканов нефти штаммом *H. titanicae* ТАТ1. детерминированное геном алкан-1-монооксигеназы alk B. было слабым. Рост при высокой солености штамма ТАТ1 был обусловлен наличием генов синтеза осмопротекторов бетаина, эктоина и гидроксиэктоина, а штамма KAZ22 — наличием генов синтеза эктоина и гидроксиэктоина.

Способность штамма ТАТ1 накапливать нитрит в среде, обусловленная отсутствием гена нитритредуктазы *піг*, может быть использована в биотехнологии подавления образования сероводорода в нефтяном пласте. Сероводород вызывает коррозию стального оборудования, порчу нефти и осаждение сульфидов, что, в свою очередь, приводит к снижению проницаемости пласта и приемистости нагнетательных скважин (An et al.,

2017). Известно, что нитрит подавляет рост бактерий-продуцентов сероводорода посредством ингибирования активности α-субъединицы сульфитредуктазы (dsrA), а также химически окисляет сульфид, снижая его концентрацию в среде. Кроме того, денитрифицирующие бактерии имеют конкурентное преимущество над сульфидогенами в использовании доступных субстратов, поскольку восстановление нитрата дает больший выход энергии, чем восстановление сульфата до сульфида. Таким образом, штамм *H. titanicae* TAT1 может быть использован совместно с нитратами для биоаугментации нефтяных пластов с высокой минерализацией пластовой воды с целью подавления коррозии и снижения содержания сульфида, а штамм M. lutaoensis KAZ22 — для очистки от нефтяных загрязнений и увеличения нефтеотдачи пластов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Секвенирование и анализ геномов выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00019). Выделение культур и физиологические исследования были выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н., Розанова Е.П., Глумов И.Ф., Ибатуллин Р.Р., Иванов М.В. Использование микроорганизмов в биотехнологии повышения нефтеизвлечения // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 687—697.

Belyaev S.S., Borzenkov I.A., Nazina T.N., Rozanova E.P., Glumov I.F., Ibatullin R.R., Ivanov M.V. Use of microorganisms in the biotechnology for the enhancement of oil recovery // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 590–598.

Борзенков И.А., Милехина Е.И., Готоева М.Т., Розанова Е.П., Беляев С.С. Свойства углеводородокисляющих бактерий, изолированных из нефтяных месторождений Татарстана, Западной Сибири и Вьетнама // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 82—89.

Borzenkov I.A., Milekhina E.I., Gotoeva M.T., Rozanova E.P., Belyaev S.S. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 66–72.

https://doi.org/10.1134/S0026261706010127

Звягинцева И.С., Беляев С.С., Борзенков Н.А., Кострикина Н.А., Милехина Н.Н., Иванов М.В. Галофильные

архебактерии из нефтяного месторождения Каламкасс // Микробиология. 1995. Т. 64. С. 83—87.

Zvyagintseva I.S., Belyaev S.S., Borzenkov I.A., Kostrikina N.A., Milekhina E.I., Ivanov M.V. Halophilic archaebacteria from the Kalamkass oil field // Microbiology (Moscow). 1995. V. 64. P. 67–71.

Турова Т.П., Назина Т.Н., Михайлова Е.М., Родионова Т.А., Екимов А.Н., Машукова А.В., Полтараус А.Б. Гомологи alkB гена термофильных бактерий рода Geobacillus // Мол. биология. 2008. Т. 42. С. 247—257.

Tourova T.P., Nazina T.N., Mikhailova E.M., Rodionova T.A., Ekimov A.N., Mashukova A.V., Poltaraus A.B. AlkB homologs in thermophilic bacteria of the genus Geobacillus // Mol. Biol. 2008. V. 42. P. 217–226.

Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Разнообразие генов биодеградации  $\mu$ -алканов alkB у термофильных углеводородокисляющих бактерий родов Geobacillus, Parageobacillus и Aeribacillus // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 225—232. https://doi.org/10.7868/S0026365618030011

Tourova T.P., Sokolova D.Sh., Semenova E.M., Poltaraus A.B., Nazina T.N. Diversity of the alkB genes of n-alkane biodegradation in thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the genera Geobacillus, Parageobacillus, and Aeribacillus // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 301—307. https://doi.org/10.1134/S002626171803013X

Al-Mailem D.M., Sorkhoh N.A., Al-Awadhi H., Eliyas M., Radwan S.S. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf // Extremophiles. 2010. V. 14. P. 321–328.

https://doi.org/10.1007/s00792-010-0312-9

An B.A., Shen Y., Voordouw G. Control of sulfide production in high salinity Bakken shale oil reservoirs by halophilic bacteria reducing nitrate to nitrite // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1164.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01164

Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J. Comput. Biol. 2012. V. 19. P. 455–477.

https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021

Ben Ali Gam Z., Abdelkafi S., Casalot L., Tholozan J.L., Oueslati R., Labat M. Modicisalibacter tunisiensis gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 2307–2313.

https://doi.org/10.1099/ijs.0.65088-0

Bødtker G., Lysnes K., Torsvik T., Bjørnestad E.Ø., Sunde E. Microbial analysis of backflowed injection water from a nitrate-treated North Sea oil reservoir // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. P. 439–450.

*Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120.

Boonmak C., Takahashi Y., Morikawa M. Cloning and expression of three ladA-type alkane monooxygenase genes

from an extremely thermophilic alkane-degrading bacterium *Geobacillus thermoleovorans* B23 // Extremophiles. 2014. V. 18. P. 515–523.

Bryanskaya A.V., Rozanov A.S., Slynko N.M., Shekhovtsov S.V., Peltek S.E. Geobacillus icigianus sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 864–869.

Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2019. V. 36. P. 1925—1927.

https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848

Edbeib M.F., Wahab R.A., Huyop F. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments // World J. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 32. P. 135.

https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9

*Fathepure B.Z.* Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments // Front. Microbiol. 2014. V. 5. Art. 173. P. 1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00173

Grouzdev D.S., Sokolova D.S., Poltaraus A.B., Nazina T.N. Draft genome sequence of *Halomonas titanicae* strain TAT1, a hydrocarbon-oxidizing halophilic bacterium isolated from a petroleum reservoir in Russia // Microbiol. Resour. Announc. 2020. V. 9. e01255-20.

https://doi.org/10.1128/MRA.01255-20

Huu N.B., Denner E.B., Ha D.T., Wanner G., Stan-Lotter H. Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 367—375.

https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-367

Jain C., Rodriguez R. L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 5114.

https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9

Kaye J.Z., Sylvan J.B., Edwards K.J., Baross J.A. Halomonas and Marinobacter ecotypes from hydrothermal vent, subseafloor and deep-sea environments // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 75. Art 1. P. 123–133.

https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00984.x

Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: John Wiley& Sons, 1991. P. 115–175.

Luo Y.J., Xie B.S., Lv X.L., Cai M., Wang Y.N., Cui H.L., Cai H., Wu X.L. Marinobacter shengliensis sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from oil-contaminated saline soil // Antonie Van Leeuwenhoek. 2015. V. 107. P. 1085–1094.

https://doi.org/10.1007/s10482-015-0401-y

Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinform. 2013. V. 14. Art. 60.

https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60

*Mnif S., Chamkha M., Sayadi S.* Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions // J. Appl. Microbiol. 2009. V. 107. P. 785–794.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04251.x

Nazina T.N., Shestakova N.M., Pavlova N.K., Tatarkin Y.V., Ivoilov V.S., Khisametdinov M.R., Sokolova D.Sh., Babich T.L., Tourova T.P., Poltaraus A.B., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Functional and phylogenetic microbial diversity in formation waters of a low-temperature carbonate petroleum reservoir // Int. Biodeter. Biodegr. 2013. V. 81. P. 71–81. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.008

*Nie Y., Tang Y.-Q., Li Y., Chi C.-Q., Cai M., Wu X.-L.* The genome sequence of *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1<sup>T</sup> reveals its genetic basis for crude oil degradation and adaptation to the saline soil // PLoS One. 2012. V. 7. Art. e31261. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031261

*Nie Y., Fang H., Li Y., Chi C.-Q., Tang Y.-Q., Wu X.-L.* The genome of the moderate halophile *Amycolicicoccus subflavus* DQS3-9A1<sup>T</sup> reveals four alkane hydroxylation systems and provides some clues on the genetic basis for its adaptation to a petroleum environment // PLoS One. 2013. V. 8. Art. e70986.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070986

Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // Genome Res. 2015. V. 25. P. 1043–1055.

https://doi.org/10.1101/gr.186072.114

Sanchez-Porro C., Kaur B., Mann H., Ventosa A. Halomonas titanicae sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2768–2774.

https://doi.org/10.1099/ijs.0.020628-0

Sokolova D.S., Semenova E.M., Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Babich T.L., Loiko N.G., Ershov A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Zhaparov N.S., Nazina T.N. Sulfidogenic microbial communities of the Uzen high-temperature oil field in Kazakhstan // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 1818.

https://doi.org/10.3390/microorganisms9091818

Tatusova T., Di Cuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Ciufo S., Li W. Prokaryotic Genome Annotation Pipeline // The NCBI Handbook, 2nd ed. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD. 2013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174280

Vargas C., Argandoña M., Reina-Bueno M., Rodríguez-Moya J., Fernández-Aunión C., Nieto J.J. Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance // Saline Syst. 2008 V. 4. Art. 14.

https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-14

*Wang W., Shao Z.* Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes // FEMS Microbiol. Ecol. 2011. V. 80. P. 523–533.

*Wang L., Shao Z.* Aerobic denitrification and heterotrophic sulfur oxidation in the genus *Halomonas* revealed by six novel species characterizations and genome-based analysis // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 652766.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652766

Wang L., Wang W., Lai Q., Shao Z. Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean // Environ. Microbiol. 2010. V. 12. P. 1230–1242.

Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2001. Ch. 2. Unit 2.4. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56

#### Genomic and Physiological Characterization of Halophilic Bacteria of the Genera Halomonas and Marinobacter from Petroleum Reservoirs

T. P. Tourova<sup>1</sup>, D. S. Sokolova<sup>1</sup>, E. M. Semenova<sup>1</sup>, A. P. Ershov<sup>1</sup>, D. S. Grouzdev<sup>2</sup>, and T. N. Nazina<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup>SciBear OU, Tallinn, 10115 Estonia

\*e-mail: nazina@inmi.ru

Received January 25, 2022; revised January 27, 2022; accepted January 27, 2022

Abstract—During the exploitation of oil reservoirs with highly mineralized waters, water separated from oil is pumped back into the reservoirs, which in some cases leads to an increase in ambient salinity and limits the possibility of application of biotechnologies for the enhancement of oil recovery. The microbial community of such oil fields has been relatively scarcely studied. Two strains of halophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria, Halomonas titanicae TAT1 and Marinobacter lutaoensis KAZ22 were isolated from oil fields with mineralized reservoir water. Their physiological and genomic characteristics determining their presence in these habitats and the possibility of biotechnological application were investigated. The strains H. titanicae TAT1 and M. lutaoensis KAZ22 grew aerobically on crude oil in the temperature range from 4 to 42 and from 22 to 55°C, respectively, and had growth optima at salinity 2.0–12 and 5–10% NaCl (wt/vol). Phenomenological observations of the degradation of oil n-alkanes were confirmed by the detection of three genes (alk B1, alk B2, and almA) encoding alkane-1-monooxygenases in the genome of strain KAZ22, and of one alkB gene in the genome of strain TAT1. In the genome of the H. titanicae TAT1, all the genes for formation of osmoprotectors betaine, ectoin, and hydroxyectoin were annotated, and in the genome of M. lutaoensis KAZ22, the genes for the formation of ectoin and hydroxyectoin were annotated. The growth of strain KAZ22 on oil was accompanied by a decrease in the surface tension of the medium by more than 20 mN/m. Due to the absence of the nirK nitrite reductase gene, anaerobic growth of strain H. titanicae TAT1 in a medium with acetate and nitrate resulted in accumulation of ~100 mg/L of nitrite, which can inhibit the growth of sulfidogens. The biological features of the strains and the results of genome analysis allow us to recommend injection of nitrate and strain H. titanicae TAT1 for bioaugmentation of oil reservoirs with mineralized reservoir water to suppress corrosion and decrease sulfide content, and of M. lutaoensis KAZ22 for cleaning from oil pollution and increasing the oil recovery from reservoirs.

**Keywords:** petroleum reservoirs, halophiles, *Halomonas*, *Marinobacter*, genomes, *alkB* and *almA* genes, *n*-alkane oxidation

#### \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

# ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ УТИЛИЗАЦИИ КСИЛАНА У ПЛАНКТОМИЦЕТА КЛАССА PHYCISPHAERAE, $HUMISPHAERA\ BOREALIS\ M1803^T$

© 2022 г. Д. Г. Наумов<sup>а, \*</sup>, И. С. Куличевская<sup>а</sup>, С. Н. Дедыш<sup>а</sup>

 $^a$ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,  $\Phi$ ИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: daniil\_naumoff@yahoo.com

Поступила в редакцию 13.01.2022 г. После доработки 29.01.2022 г.

Принята к публикации 31.01.2022 г.

Планктомицеты класса *Phycisphaerae* представлены аэробными и анаэробными гетеротрофными бактериями, населяющими широкий спектр морских и наземных местообитаний, однако их функции в экосистемах пока изучены слабо. *Humisphaera borealis* M1803<sup>T</sup> — один из немногочисленных охарактеризованных планктомицетов этого класса, являющийся первым представителем ранее некультивируемой группы WD2101, характерной для почв и торфяников. Настоящая работа посвящена анализу генетических детерминант, обусловливающих способность *Humisphaera borealis* M1803<sup>T</sup> к росту на ксилане, одном из полимеров клеточной стенки растений. Анализ полногеномной последовательности этого планктомицета позволил выявить пять генов, кодирующих белки, гомологичные ранее известным эндо-β-ксиланазам. Для двух из этих белков были обнаружены эволюционно более близкие экспериментально охарактеризованные гомологи, обладающие иными субстратными специфичностями. У представителя семейства GH10 гликозил-гидролаз оказался разрушенным активный центр фермента. Два белка из семейств GH62 и GH141 рассматриваются нами как наиболее вероятные кандидаты на роль β-ксиланазы, ответственной за утилизацию ксилана. Проведен филогенетический анализ белков семейств GH10, GH62 и GH141. Обсуждается роль горизонтальных переносов в эволюции генов гликозил-гидролаз и их близких гомологов.

**Ключевые слова:** гликозил-гидролаза,  $\beta$ -ксиланаза, семейство GH62, семейство GH141, *Planctomycetes, Humisphaera borealis*, филогенетическое древо белков, эволюция белков, горизонтальный перенос, поиск гомологов, аннотация генов, утилизация ксилана

**DOI:** 10.31857/S0026365622300048

Класс Phycisphaerae объединяет аэробных и анаэробных гетеротрофных планктомицетов, утилизирующих широкий спектр органических соединений и населяющих морские и наземные экосистемы (Fukunaga et al., 2009). Ключевое отличие этих микроорганизмов от представителей другого класса планктомицетов, Planctomycetia, заключается в способе размножения (Ward, Dedysh, 2022). Представители *Planctomycetia* являются почкующимися бактериями, тогда как планктомицеты класса *Phycisphaerae* размножаются бинарным делением. Число ныне доступных в культурах и охарактеризованных представителей Planctomycetia, а также пул данных об организации клеток и биологии этих планктомицетов, значительно превышают таковые для *Phycisphaerae*. Последний класс включает три порядка — Phycisphaerales (Fukunaga et al., 2009), Sedimentisphaerales (Spring et al., 2018) и Tepidisphaerales (Kovaleva et al., 2015), общее число охарактеризованных представителей в которых не превышает одного десятка.

Порядок Tepidisphaerales до недавнего времени насчитывал лишь один род — Tepidisphaera, единственный описанный вид которого, Tepidisphaera mucosa, представлен термофильными, полисахарид-использующими планктомицетами из наземных термальных источников (Kovaleva et al., 2015). Культивируемое разнообразие порядка Tepidisphaerales недавно было пополнено мезофильным представителем, изолированным из евтрофного озера бореальной зоны — *Humisphaera* borealis M1803<sup>T</sup> (Dedysh et al., 2021). Этот планктомицет является первым полученным в культуре микроорганизмом ранее некультивируемой филогенетической группы в пределах порядка Теріdisphaerales – WD2101. По данным молекулярных исследований микробного разнообразия, планктомицеты группы WD2101 являются типичными обитателями богатых органическим веществом почв и торфяников (Ivanova et al., 2016; Dedysh, Ivanova, 2019; Dedysh et al., 2021). Анализ генома H. borealis  $M1803^{T}$  выявил полный набор генов,

кодирующих синтез специализированных клеточных структур — микро-компартментов планктомицетного типа — участвующих в утилизации моносахаридов клеточных стенок растений, таких как рамноза (Dedysh et al., 2021). Электронно-микроскопический анализ ультраструктуры клеток подтвердил наличие этих микро-компартментов в клетках, выращенных на рамнозе, что позволило предположить участие этих планктомицетов в процессах деструкции растительных остатков в болотных экосистемах. В числе ростовых субстратов культуры *Н. borealis* М1803<sup>Т</sup> был также идентифицирован ксилан, один из полимеров клеточной стенки растений, однако детальных исследований роста на этом субстрате выполнено не было.

Планктомицеты обладают большим гликолитическим потенциалом, а их геномы кодируют широкий спектр гликозил-гидролаз (Ivanova et al., 2017; Kulichevskaya et al., 2020; Drula et al., 2022). Гликозил-гидролазы или гликозидазы (К.Ф. 3.2.1) — обширная группа ферментов, ответственных за расщепление O-гликозидных связей в различных субстратах, включая гетерополисахариды, гликопротеины и гликолипиды (Наумов, 2011). В соответствии с субстратной специфичностью у них выделяют (McDonald et al., 2009) более двухсот вариантов энзиматических активностей (К.Ф. 3.2.1.1–K.Ф. 3.2.1.215). Ha основании гомологии аминокислотных последовательностей большинство известных гликозил-гидролаз объединены в базе данных CAZy (Lombard et al., 2014; Terrapon et al., 2017; Garron, Henrissat, 2019; Drula et al., 2022) в 165 семейств: GH1-GH173 (кроме GH21, GH40, GH41, GH60, GH61, GH69, GH145 и GH155). В пределах одного семейства, как правило, бывают представлены ферменты с различающимися энзиматическими активностями, а одна и та же субстратная специфичность может быть обнаружена у представителей разных семейств. Используя данные филогенетического анализа, в пределах семейств удается различать более-менее монофункциональные подсемейства, что позволяет довольно надежно предсказывать биологическую функцию у экспериментально неохарактеризованных белков. В настоящей работе этот подход был применен для поиска генов, кодирующих потенциальные ксиланазы H. borealis M  $1803^{\mathrm{T}}$ .

Эндо-β-ксиланазы (К.Ф. 3.2.1.8 и К.Ф. 3.2.1.32) — широко распространенная среди живых организмов и биотехнологически востребованная группа гликозил-гидролаз (Kulkarni et al., 1999; Beg et al., 2001; Pollet et al., 2010; Hayмов, 2016; Linares-Pasten et al., 2018; Nguyen et al., 2018; Nordberg Karlsson et al., 2018; Capetti et al., 2021; Gupta et al., 2021). Они отвечают за деградацию разнообразных гетероксиланов — структурно очень неоднородной группы полисахаридов, составляющих основу гемицеллюлозы клеточной стенки выс-

ших растений. Известные эндо-β-ксиланазы отнесены в базе данных САZу к 17-ти семействам гликозил-гидролаз: GH3, GH5, GH6, GH8, GH9, GH10, GH11, GH16, GH18, GH26, GH30, GH43, GH44, GH51, GH62, GH98 и GH141 (Drula et al., 2022). Однако лишь в двух из этих семейств (GH10 и GH11) среди биохимически охарактеризованных представителей явно доминируют носители эндо-β-ксиланазных ферментативных активностей.

Секвенирование (Dedysh et al., 2021) и дальнейшее аннотирование генома H. borealis M1803<sup>T</sup> показали (Drula et al., 2022), что он кодирует по одному белку из пяти семейств гликозил-гидролаз из вышеупомянутого списка (GH5, GH10, GH18, GH62 и GH141). Целью настоящей работы, таким образом, явилась экспериментальная верификация способности H. borealis M1803<sup>T</sup> к росту на ксилане и выявление наиболее вероятных кандидатов на роль  $\beta$ -ксиланазы среди белков, закодированных в геноме этого микроорганизма.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемый микроорганизм и оценка его роста на ксилане. Объектом исследования являлась культура планктомицета H. borealis  $M1803^T$  $(=KCTC 25269^{T})$ , выделенного и описанного ранее авторами этой работы (Dedysh et al., 2021). Культуру поддерживали на среде MPYVG (модификация среды DSMZ № 621), содержащей (г/л дистиллированной воды): 0.1 пептона ("Fluka"), 0.25 дрожжевого экстракта,  $0.1 \text{ NH}_4 \text{NO}_3$ , 0.5 глюкозы, 20 мл минерального раствора Хатнера и 1 мл раствора витаминов Хатнера (Staley et al., 1992). С целью оценки способности к росту на ксилане, штамм  $M1803^{T}$  культивировали при  $22^{\circ}$ С в 160 мл сывороточных флаконах с 30 мл жидкой питательной среды, содержащей 20 мл/л минерального раствора Хатнера,  $0.1 \text{ г/л NH}_4\text{NO}_3$ , 1 мл/л раствора смеси витаминов и 0.05 г/л дрожжевого экстракта. Ксилан ("Sigma-Aldrich") добавляли в среду в концентрации 0.1%. Параллельно оценивали рост культуры М1803<sup>Т</sup> на аналогичной среде с глюкозой (0.05%) и в контроле без источника углерода. Опыты проводили в трехкратной повторности. Аликвоты суспензий для определения численности клеток отбирали в начале эксперимента, а также на 10 и 20 день культивирования. Подсчет числа клеток планктомицета осуществляли на покрытых 0.1% раствором желатина тефлоновых предметных стеклах с окошками методом фазово-контрастной микроскопии. Численность клеток в пробах определяли путем учета их количества в 50 полях зрения микроскопа для каждого варианта опыта с последующим расчетом числа клеток в 1 мл культуры.

Поиск и филогенетический анализ потенциальных **В-ксиланаз.** Наличие в геноме *H. borealis* M1803<sup>T</sup> генов белков, принадлежащих семействам гликозил-гидролаз, которые содержат экспериментально охарактеризованных представителей с В-ксиланазными активностями, определяли с помощью базы ланных CAZv (Drula et al., 2022). Для найденных белков искали ближайших гомологов по алгоритму blastp на сайте NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), дальнейший анализ последних проводили с помощью программы PSI Protein Classifier (Наумов, Каррерас, 2009). Списки экспериментально охарактеризованных представителей для анализируемых семейств гликозил-гидролаз составляли на основании информации, имеющейся в базе данных CAZy.

Для филогенетического анализа отбирали по несколько десятков ближайших гомологов исследуемых белков бактерии *H. borealis* M1803<sup>T</sup>. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили вручную в программе-редакторе BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), при этом учитывали результаты попарных выравниваний с помощью программы blastp.

В качестве внешней группы при исследовании филогении семейства GH62 использовали наиболее близкий к белку IPV69\_21845 из *H. borealis* экспериментально охарактеризованный фермент (GenPept, DAC80243.1) и 26 его ближайших гомологов. Для семейства GH10 в качестве внешней группы были использованы 9 белков, филогенетически наиболее близких к кластеру планктомицетных белков (согласно работе Наумов и соавт., 2014), а так же дополнительно еще 12 их ближайших гомологов. Для семейства GH141 специально внешняя группа не подбиралась; при визуализации древа в качестве внешней была выбрана наиболее дивергентная группа из числа проанализированных белков.

Результаты множественного выравнивания (после удаления наиболее вариабельных участков последовательностей) использовали для построения филогенетических деревьев с помощью программы PROTPARS (метод максимальной экономии, Protein Sequence Parsimony method, MP) из пакета PHYLIP (http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html). Статистическую надежность узлов оценивали с использованием бутстреп-анализа (по 1000 псевдореплик для каждого древа). Программу TreeView Win32 (http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html) применяли для получения графических изображений деревьев.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

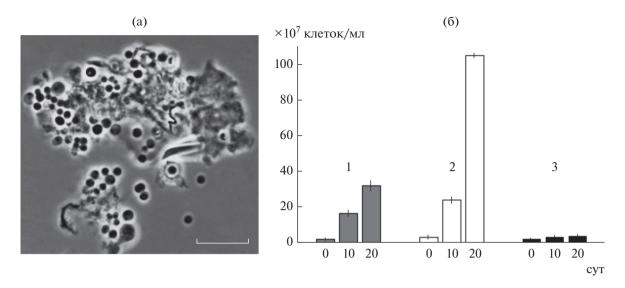
**Рост** *Humisphaera borealis* M1803<sup>T</sup> на ксилане. Микроскопический анализ культуры *H. borealis* 

М $1803^{\rm T}$  после 20 сут инкубации во флаконах с ксиланом показал активное развитие клеток планктомицета на поверхности микрочастиц этого биополимера (рис. 1а). Численность клеток штамма М $1803^{\rm T}$  за 20 сут инкубации с ксиланом возросла более чем на порядок, тогда как в контрольном варианте значимого изменения численности клеток зарегистрировано не было (рис. 1б). Удельная скорость роста штамма М $1803^{\rm T}$  на ксилане составила  $0.006~{\rm u}^{-1}$ . Рост на глюкозе, как и предполагалось, был более активным.

Семейства GH5 и GH18. Согласно базе данных CAZy (Drula et al., 2022), белок IPV69 13055 (GenPept, OOV92224.1) из семейства GH5 гликозил-гидролаз принадлежит подсемейству GH5 19, которое содержит два экспериментально охарактеризованных представителя. Олин из (QFQ13828.1) является экзо-маннаназой (К.Ф. 3.2.1.100), а другой (AEH51033.1) —  $\beta$ -маннозидазой (К.Ф. 3.2.1.25). Эндо-β-1,4-ксиланазная активность (К.Ф. 3.2.1.8) экспериментально продемонстрирована для 16 белков семейства GH5, принадлежащих пяти другим подсемействам: GH5 2, GH5 4, GH5 21, GH5 25 и GH5 35. Согласно филогенетическому древу семейства GH5, опубликованному в работе (Aspeborg et al., 2012), подсемейства GH5 4 и GH5 25, а также GH5 21 и GH5 35 образуют совместные монофилетические кластеры. Подсемейства GH5\_2 и GH5\_26 близки ко второму из этих кластеров. Однако подсемейство GH5 19 находится на древе далеко от этих двух кластеров и образует совместный кластер с подсемействами GH5\_18 и GH5\_42. Все пять энзиматически охарактеризованных представителей подсемейства GH5\_18 (AAN25133.1, AEE72695.1, AEW98905.1 ACU71175.1, ЕЕІ79871.1) обладают β-маннозидазой активностью (К.Ф. 3.2.1.25), а подсемейство GH5 42 не содержит экспериментально изученных белков (Drula et al., 2022). На основании этих данных онжом предположить, ЧТО гликозидаза IPV69 13055 способна расщеплять какие-то субстраты, содержащие остатки В-D-маннозы, но не обладает β-ксиланазной активностью.

Согласно базе данных CAZy (Drula et al., 2022), семейство GH18 гликозил-гидролаз среди 486 энзиматически охарактеризованных представителей содержит единственную  $\beta$ -ксиланазу из гриба *Purpureocillium lilacinum* (GenPept, XP\_018173934.1). Ее сравнение с белком IPV69\_11765 (QOV91983.1) показало, что у них лишь 26% идентичности аминокислотных последовательностей, что указывает на принадлежность к разным подсемействам (если применять 30% критерий; Naumoff, 2005). Это позволяет предположить, что гликозидаза IPV69\_11765 не обладает  $\beta$ -ксиланазной активностью.

**Семейство GH62.** Семейство GH62 гликозилгидролаз вместе с семействами GH43 и GH117 об-



**Рис. 1.** (а) Микрофотография клеток *Humisphaera borealis* M1803<sup>T</sup> после 20 сут инкубации с ксиланом в качестве ростового субстрата. Маркер — 10 мкм. (б) Динамика изменения численности клеток штамма M1803<sup>T</sup> при росте на ксилане (I), глюкозе (2) и в контроле (3) в начале эксперимента и после 10 и 20 сут инкубации.

разуют клан GH-F (Drula et al., 2022), который на более высоком иерархическом уровне принадлежит фуранозидазному суперсемейству (Naumoff, 2001; Pons et al., 2004; Наумов, 2011, 2012), характеризующемуся трехмерной структурой каталитических доменов в виде пятилопастного β-пропеллера и тремя формирующими активный центр высоко консервативными кислыми аминокислотными остатками (Asp/Glu). Следует отметить, что для гликозидаз семейства GH43 характерно наличие двух основных вариантов энзиматических активностей: α-L-арабинофуранозидазной (K.Ф. 3.2.1.55) и β-ксилозидазной (K.Ф. 3.2.1.37). Обе активности часто встречаются у представителей одного и того же подсемейства, а иногда проявляются и одним белком (Mewis et al., 2016). Эти факты указывают на то, что В-пропеллерные каталитические домены способны узнавать в субстратах как α-L-арабинофуранозидные, так и β-D-ксилопиранозидные остатки моносахаридов. Подавляющее большинство энзиматически охарактеризованных представителей семейства GH62 обладают только α-L-арабинофуранозидазной активностью (Drula et al., 2022). Однако два многодоменных белка проявляют сразу несколько активностей. Так, метагеномная гликозидаза (GenPept, DAC80243.1) содержит три каталитических домена, относящихся к семействам СЕ1 карбогидрат-эстераз (обусловливает ферулоил-эстеразную активность —  $K.\Phi$ . 3.1.1.73), GH62 (α-L-арабинофуранозидаза) и GH10 (β-ксиланаза). Тем не менее, субклонирование и последующая экспрессия изолированного GH62-домена этого белка показали, что он обладает и некоторой ксиланазной активностью (Holck et al., 2019). Гликозидаза из Ruminiclostridium josui (WP 024831741.1) содержит два каталитических домена, относящихся к семействам GH62 гликозил-гидролаз и СЕ6 карбогидрат-эстераз. Их субклонирование (Wang et al., 2018) показало, что первый из них отвечает за α-L-арабинофуранозидазную и эндо-β-ксиланазную активности, а второй — за ацетилксилан-эстеразную (К.Ф. 3.1.1.72). Таким образом, GH62-домены, по крайней мере, двух ранее известных белков обладают В-ксиланазной активностью. Белок IPV69 21845 (OOV88842.1) из *H. borealis* содержит только один домен, он относится к семейству GH62 гликозилгидролаз. Сравнение данного белка со всеми известными экспериментально охарактеризованными представителями этого семейства показало, что он обладает 45% идентичности с метагеномной гликозидазой (DAC80243.1) и лишь 30-39% с остальными 24 белками. Эти данные позволяют предполагать о возможном наличии у гликозидазы IPV69 21845, наряду с арабинофуранозидазной, еще и эндо-β-ксиланазной активности, что делает его одним из возможных кандидатов на роль βксиланазы этого организма.

Нами был проведен филогенетический анализ (рис. 2) аминокислотных последовательностей GH62-домена из гипотетической гликозидазы IPV69\_21845 и метагеномной гликозидазы (DAC80243.1), а также из их близких гомологов (суммарно 103 белка). Все проанализированные белки обладают триадой каталитически важных аминокислотных остатков (Asp-64, Asp-179 и Glu-227 в случае IPV69\_21845), что указывает на наличие у них гликозидазных активностей. Ближайшими гомологами метагеномной гликозидазы является обширная группа белков, закодированных

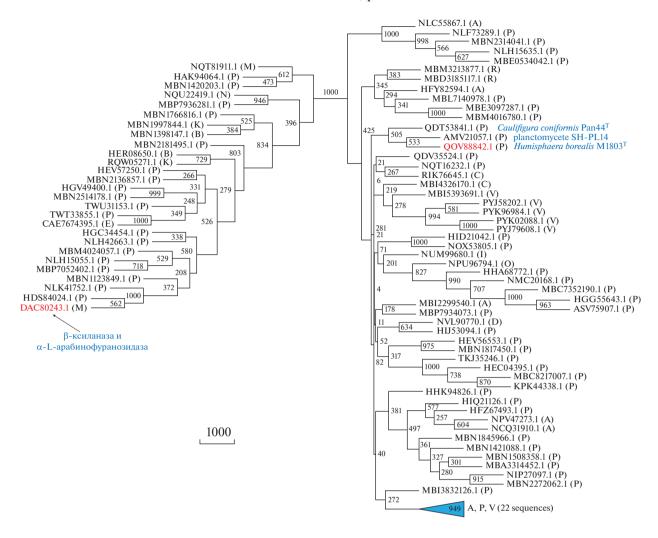


Рис. 2. Филогенетическое древо семейства GH62 гликозил-гидролаз, построенное методом максимальной экономии. Статистическую надежность узлов древа оценивали с помощью бутстреп-анализа, около каждого узла указано число подтверждающих псевдореплик из 1000. Латинскими буквами обозначена таксономическая принадлежность организмов-хозяев белков: A — Armatimonadetes, B — Bacteroidetes, C — Chloroflexi, D — Deltaproteobacteria, E — Eukaryota (Alveolata), I — Acidobacteria, K — candidate division KSB1, M — bacterial metagenome, N — Candidatus Nealsonbacteria, O — Candidatus Omnitrophica, P — Planctomycetes, R — Candidatus Poribacteria и V — Verrucomicrobia. Красным цветом указаны белок IPV69\_21845 (QOV88842.1) из Humisphaera borealis M1803<sup>T</sup> и экспериментально охарактеризованная бифункциональная β-ксиланаза/α-L-арабинофуранозидаза (DAC80243.1), закодированная в бактериальном метагеноме из сточных вод. Подписаны названия штаммов организмов-хозяев белка IPV69\_21845 и двух его ближайших гомологов. Синим треугольником обозначен кластер, содержащий 22 белка (94.9% бутстреп-поддержки) из Armatimonadetes (МВВ6053333.1), Planctomycetes (НFG32237.1, НFJ73202.1, НGS95713.1, МВМ4035677.1 и МВМ4043100.1) и Verrucomicrobia (HFG26915.1, HGF95708.1, HGS23301.1, HGT44975.1, MBB5032842.1, MBE2282078.1, MBE7495167.1, MBI2929915.1, MBI4660194.1, MBI5383639.1, MBI5690282.1, MBL9117542.1, MBL9177803.1, MBL9182578.1, MBN8420223.1 и MBP8261673.1).

в геномах разнообразных планктомицетов. При этом два белка оказались практически идентичны ей в пределах GH62-домена (положения от 406 до 714): NLK41752.1 (100%) и HDS84024.1 (98%). Это позволяет предполагать, что полифункциональная метагеномная гликозидаза (DAC80243.1) также принадлежала какому-то планктомицету из класса *Phycisphaerae*.

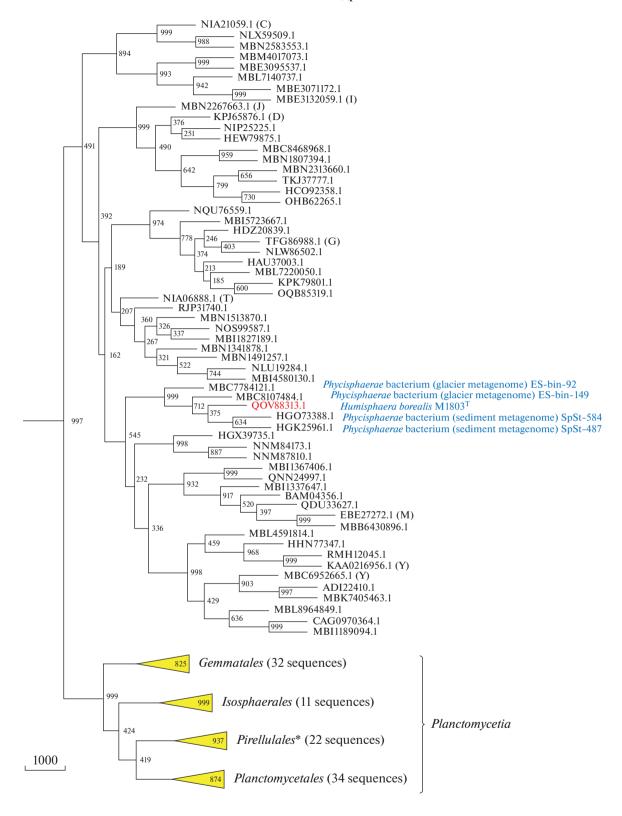
Гипотетическая гликозидаза IPV69\_21845 из H. borealis и ее ближайший гомолог из неохарактеризованного планктомицета SH-PL14 (AMV21057.1) являются однодоменными белками и имеют 61% идентичности аминокислотных последовательностей. Они принадлежат обширному кластеру (рис. 2), содержащему, главным образом, белки планктомицетов и, в существенно меньшей степени, белки бактерий фил Armatimonadetes и Verrucomicrobia, остальные филы представлены лишь единичными представителями (Acidobacteria, Chloroflexi, Proteobacteria и др.) или не представлены вовсе (например, Actinobacteria, Bacteroidetes и Firmicutes). Полученные результаты филогенети-

ческого анализа (рис. 2) позволяют предполагать, что последний общий предок генов всех исследованных нами белков семейства GH62 гликозилгидролаз был геном какого-то планктомицета. Дальнейшая эволюция этого гена сопровождалась многочисленными горизонтальными переносами в геномы бактерий других фил и даже возвратным переносом от веррукомикробий обратно в планктомицеты (один или два случая в кластере, обозначенном на рис. 2 синим цветом).

Семейство GH10. Почти все энзиматически охарактеризованные представители семейства GH10 обладают эндо-β-ксиланазными активностями (К.Ф. 3.2.1.8 и К.Ф. 3.2.1.32). Проведенный нами ранее сравнительный анализ белков этого семейства из планктомицетов показал, что они могут быть разбиты на две основные группы (Наумов и соавт., 2014; Naumoff, 2014; Hayмов, 2016). Одна из этих групп представлена лишь у некоторых планктомицетов, обычно в виде нескольких паралогов, на филогенетическом древе они не образуют самостоятельного кластера среди белков из других прокариот – это вполне типичная картина для широкого спектра семейств гликозил-гидролаз (если рассматривать представителей какого-либо одного бактериального таксона высокого иерархического уровня). Вторая группа белков оказалась представленной у всех гетеротрофных планктомицетов, всегда бывает только один паралог, на филогенетическом древе они образуют единый кластер, в пределах него положение белков хорошо согласуется с таксономией организмов-хозяев (т.е. наблюдается строго вертикальное наследование без горизонтальных переносов, потерь и дупликаций генов). Анализ множественного выравнивания аминокислотных последовательностей показал, что все белки второй группы имеют разрушенный активный центр – в них отсутствуют два ключевых остатка Glu (см. рис. S1 в работе Rakitin et al., 2021), выполняющих роль донора протона и нуклеофила — что делает невозможным наличие у них какой-либо ферментативной активности. Это позволило нам при аннотации геномов указать отсутствие у соответствующих белков энзиматических активностей в случае планктомицетов Paludisphaera borealis (GenPept, APW63099.1), Limnoglobus roseus (QEL20001.1), Frigoriglobus tundricola (QJX00392.1) и Telmatocola sphagniphila (QVL33104.1). Разрушенные активные центры удалось также обнаружить у целого ряда других прокариотических белков семейства GH10 (неопубликованные данные), однако они не находились в близком эволюционном родстве с белками планктомицетного кластера. Это указывает на то, что утрата ферментативной функции происходила неоднократно в процессе эволюции белков данного семейства.

Проведенный в ходе настоящей работы филогенетический анализ (рис. 3) аминокислотных последовательностей GH10-доменов (всего проанализирован 181 белок) позволил подробнее изучить строение планктомицетного кластера, соответствующего второй группе белков. Он состоит из двух подкластеров, соответствующих классам Phycisphaerae (имеет 49.1% бутстреп-поддержки) и Planctomycetia (99.9%). При этом подкластер *Planctomycetia* почти не содержит белков из каких-либо иных таксонов бактерий (см. подпись к рис. 3) и, в свою очередь, образован четырьмя кластерами, соответствующими порядкам Gemmatales (82.5%), Isosphaerales (99.9%), Pirellulales (93.7%) и Planctomycetales (87.4%). Подкластер Phycisphaerae содержит несколько метагеномных белков, проаннотированных как представителей других фил бактерий: Acidobacteria (MBE3132059.1), Actinobacteria (NIA06888.1), Chloroflexi (NIA21059.1), Cyanobacteria (KAA0216956.1 и MBC6952665.1), Gemmatimonadetes (TFG86988.1) и Proteobacteria (KPJ65876.1), а так же Candidatus Dependentiae (MBN2267663.1). Это может объясняться как множественными горизонтальными переносами генов, так и несовершенством алгоритмов аннотации метагеномов из бактерий класса Phycisphaerae. Как и у остальных белков планктомицетного кластера, у белка IPV69 18965 (QOV88313.1) из *H. borealis* отсутствуют оба каталитически важных остатка Glu, что исключает его из возможных кандидатов на роль В-ксиланазы этого организма.

Рис. 3. Филогенетическое древо семейства GH10 гликозил-гидролаз, построенное методом максимальной экономии. Статистическую надежность узлов древа оценивали с помощью бутстреп-анализа, около каждого узла указано число подтверждающих псевдореплик из 1000. Латинскими буквами обозначена таксономическая принадлежность организмов-хозяев белков: С — Chloroflexi, D — Gammaproteobacteria, G — Gemmatimonadetes, I — Acidobacteria, J — Candidatus Dependentiae, M — bacterial metagenome, T — Actinobacteria и Y — Cyanobacteria. Все неподписанные белки принадлежат планктомицетам класса Phycisphaerae. Красным цветом указан белок IPV69\_18965 (QOV88313.1) из Humisphaera borealis M1803<sup>T</sup>. Подписаны названия организмов-хозяев белка IPV69\_18965 и четырех его ближайших гомологов. Желтыми треугольниками обозначены кластеры, соответствующие порядкам Gemmatales, Isosphaerales, Pirellulales и Planctomycetales. Внутри каждого треугольника указана бутстреп-поддержка соответствующего кластера, а справа от него — число относящихся белков. Кластер Pirellulales (помечен звездочкой) содержит также белок из водного метагенома, проаннотированного как Candidatus Nealsonbacteria (NQU20226.1). В качестве внешней группы (на рисунке не указана) служил 21 белок, представляющий пять фил прокариот: Crenarchaeota (RLF19374.1), Cyanobacteria (ABW28526.1, ACK64415.1, ACU99283.1, ADN16869.1, NHC56590.1 и NJN38475.1), Firmicutes (AGC67515.1, EEQ57087.1, EGN35770.1, EMS72420.1, HIRS7335.1, HIS30199.1, HIS30200.1, HIS30214.1, MBQ1860455.1, MBQ3079900.1, MBQ6240474.1 и WP\_148410326.1), Spirochaetes (AEF81843.1) и Verrucomicrobia (HGY63858.1).



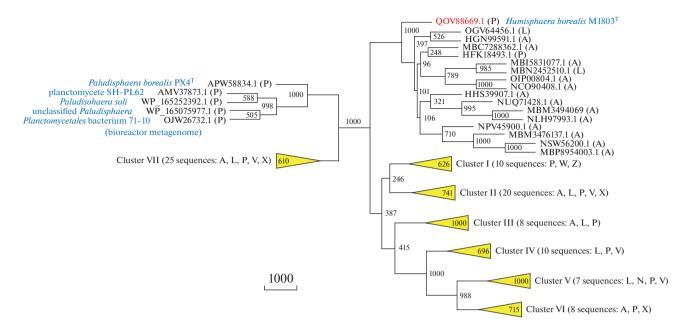


Рис. 4. Филогенетическое древо семейства GH141 гликозил-гидролаз, построенное методом максимальной экономии. Статистическую надежность узлов древа оценивали с помощью бутстреп-анализа, около каждого узла указано число подтверждающих псевдореплик из 1000. Латинскими буквами обозначена таксономическая принадлежность организмов-хозяев белков: А − Armatimonadetes, L − Lentisphaerae, N − Candidatus Nealsonbacteria, P − Planctomycetes, V − Verrucomicrobia, W − Candidatus Hydrogenedentes, X − Kiritimatiellaeota и Z − Nitrospirae. Красным цветом указан белок IPV69\_20890 (QOV88669.1) из Humisphaera borealis M1803<sup>T</sup>. Подписаны названия организмов-хозяев для белка IPV69\_20890, а также для пяти белков палюдисферного кластера (см. текст). Семью желтыми треугольниками обозначены кластеры белков, пронумерованные латинскими цифрами (I−VII). Внутри каждого треугольника указана бутстреп-поддержка соответствующего кластера, а рядом с ним − число относящихся к нему белков и таксономическая принадлежность их организмов-хозяев.

Семейство GH141. Согласно базе данных САZу (Drula et al., 2022), только два белка семейства GH141 были охарактеризованы энзиматически: это  $\alpha$ -L-фукозидаза (К.Ф. 3.2.1.51) из *Bacteroides* thetaiotaomicron (GenPept, AAO76109.1) и β-ксиланаза (К.Ф. 3.2.1.8) из Hungateiclostridium thermocellum (ABN53397.1). Эти два белка принадлежат разным подсемействам, но имеют в гомологичных положениях по два высококонсервативных в пределах семейства GH141 остатка Аsp, выполняющих роль донора протона и нуклеофила (Heinze et al., 2017; Ndeh et al., 2017). Белок IPV69\_20890 (OOV88669.1) из *H. borealis* не принадлежит ни одному из этих двух подсемейств, имея с указанными белками не более 27% идентичности аминокислотных последовательностей, однако обладает обоими консервативными остатками Asp (в положениях 489 и 525). Это делает его еще одним возможным кандидатом на роль β-ксиланазы данного организма.

Нами был проведен филогенетический анализ (рис. 4) аминокислотных последовательностей гипотетической гликозидазы IPV69\_20890 и 109 ее ближайших гомологов. Оба энзиматически охарактеризованных белка семейства GH141 не были вовлечены в анализ, т.к. из-за их существенной дивергенции не удалось построить однознач-

ного множественного выравнивания. Белок IPV69 20890 попал в стабильный кластер (100% бутстреп-поддержки; в правом верхнем углу на рис. 4), содержащий преимущественно белки из бактерий филы Armatimonadetes. Белки из других фил (Lentisphaerae и Planctomycetes) внутри этого кластера не проявляют тенденции к кокластеризации, что указывает на вероятное появление соответствующих генов посредством серии независимых горизонтальных переносов от арматимо-Остальные проанализированные белки семейства сформировали на древе еще восемь кластеров. Один из них образован исключительно белками планктомицетов, главным образом из рода Paludisphaera (100% бутстреп-поддержки; в левом верхнем углу на рис. 4). Все остальные кластеры (I–VII) также содержат какое-то количество планктомицетных белков. В составе кластера IV содержится стабильный подкластер (100% бутстреп-поддержки) из семи планктомицетных белков (MBC8871159.1, MBM4047734.1, NLF73417.1, NLY00979.1, NOX55446.1, NOZ20755.1 NUQ63536.1), но все они закодированы в метагеномах, и поэтому затруднительно с уверенностью говорить о более точной таксономической принадлежности их организмов-хозяев.

Пять из этих семи кластеров (II-V и VII) содержат некоторое количество белков из филы Lentisphaerae, по четыре кластера — из Armatimonadetes (II, III, VI и VII) и Verrucomicrobia (II, IV, V и VII), три кластера (II, VI и VII) — из Kiritimatiellaeota. Еще три филы бактерий представлены лишь в одном кластере каждая: Nitrospirae (I). Candidatus Hydrogenedentes (I) и Candidatus Nealsonbacteria (V). Это указывает на то, что последний общий предок генов всех исследованных нами белков семейства GH141 гликозил-гидролаз был, по всей видимости, геном какого-то планктомицета. Дальнейшая эволюция этого гена сопровождалась многочисленными горизонтальными переносами в геномы бактерий ряда других фил и даже возвратным переносом от арматимонад обратно в планктомицеты.

Палюдисферный кластер содержит белок из *Paludisphaera borealis* РХ4<sup>Т</sup> (АРW58834.1), который на основе дальних эволюционных связей (семейство РF13229 в базе данных Pfam; Mistry et al., 2021) был нами исходно проаннотирован как "риtative beta-solenoid-type carbohydrate-active enzyme (GH, PL, or CE) of unknown function", т.к. семейство GH141 гликозил-гидролаз в то время еще не было известно (Ivanova et al., 2017). Все проанализированные в работе белки этого семейства (за единственным исключением метагеномного белка HFH06191.1 из *Candidatus* Hydrogenedentes; кластер I) обладают обоими высококонсервативными остатками Asp, указывая на то, что все они, вероятно, обладают ферментативными активностями.

Особенности эволюции гликозил-гидролаз изученных семейств. Гликозил-гидролазы относятся к числу тех белков, которые, выполняя факультативные для организма функции, не являются облигатными компонентами протеомов (никакие семейства этих ферментов не представлены у большинства биологических видов, а некоторые микроорганизмы не содержат их вовсе). Для гликозил-гидролаз прокариот не характерно вертикальное наследование: их гены легко приобретаются путем горизонтальных переносов и дальнейших дупликаций, а затем быстро утрачиваются при отсутствии селективных преимуществ от их наличия (Наумов, 2011).

В этом смысле совершенно необычный случай представляет собой исследованная в настоящей работе группа планктомицетных белков из семейства GH10 гликозил-гидролаз (рис. 3). Объяснение этого феномена мы видим в вероятном отсутствии ферментативных активностей у этих белков вследствие утраты активного центра. Пока неизвестная новая функция этой группы ортологов очевидно является облигатной для бактерий данной филы, что обеспечивает стабильное вертикальное наследование их генов.

Исследованные в настоящей работе две другие группы белков, представляющие семейства GH62 и GH141, продемонстрировали типичную для гликозил-гидролаз модель эволюции, характеризующуюся многочисленными горизонтальными переносами между разными филами бактерий. В обоих семействах как раз планктомицеты, по всей видимости, являлись источниками таких переносов, а направлены они были исключительно в другие грамотрицательные бактерии. В случае семейства GH62 это были преимущественно представители фил Armatimonadetes и Verrucomicrobia (рис. 2), а в случае семейства GH141 — Armatimonadetes, Lentisphaerae и Verrucomicrobia (рис. 4).

Следует отметить, что еще два изученных нами семейства — GH5 и GH18 — также вполне вписываются в общую закономерность, однако там планктомицеты скорее являлись получателями горизонтально перенесенных генов. Ближайшие гомологи для белка IPV69\_13055 из семейства GH5 принадлежали бактериям филы *Chloroflexi*, а среди ближайших гомологов белка IPV69\_11765 (GH18) преобладали бактерии филы *Verrucomicrobia* (данные не приводятся).

В целом, полученные в настоящей работе данные хорошо согласуются с ранее сделанными нами (Наумов, Дедыш, 2018) наблюдениями о неслучайной направленности горизонтальных переносов генов гликозил-гидролаз между разными группами прокариот: грамотрицательные и грамположительные бактерии относительно редко обмениваются генами, среди первых обособленное положение занимают представители филы *Proteobacteria*. Наиболее интенсивные переносы обнаружены, с одной стороны, внутри группы фил, включающей *Armatimonadetes*, *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia*, а с другой стороны между представителями фил *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* и *Balneolaeota*.

Результаты, полученные в настоящей работе, указывают на белки IPV69\_21845 (семейство GH62) и IPV69\_20890 (GH141), как на наиболее вероятные кандидаты на роль  $\beta$ -ксиланазы у *Humisphaera borealis* M1803<sup>T</sup>. У белка IPV69\_21845 можно ожидать одновременного наличия  $\alpha$ -Lарабинофуранозидазной и  $\beta$ -ксиланазной активностей, тогда как IPV69\_20890, вероятно, обладает либо  $\alpha$ -L-фукозидазной, либо  $\beta$ -ксиланазной активностями. Изучение характеристик этих ферментов представляет интерес для дальнейших биохимических исследований и более глубокого понимания функциональной роли планктомицетов класса *Phycisphaerae* в деструкции растительных остатков в природных экосистемах.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования предложена С.Н. Дедыш. Схема экспериментов разработана С.Н. Дедыш и Д.Г. Наумовым. Культивирование и учет клеток планктомицетов проведены И.С. Куличевской. Идентификация генов предполагаемых β-ксиланаз и их филогенетический анализ выполнены Д.Г. Наумовым. Текст статьи написан Д.Г. Наумовым и С.Н. Дедыш. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Наумов Д.Г.* Иерархическая классификация гликозилгидролаз // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 764—780.
- *Naumoff D.G.* Hierarchical classification of glycoside hydrolases // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 622–635.
- *Наумов Д.Г.* Семейство GH10 гликозилгидролаз: структура и эволюционные связи // Мол. биология. 2016. Т. 50. С. 151-160.
- *Naumoff D.G.* GH10 family of glycoside hydrolases: structure and evolutionary connections // Mol. Biol. (Moscow). 2016. V. 50. P. 132–140.
- *Наумов Д.Г.* Фуранозидазное суперсемейство: поиск гомологов // Мол. биология. 2012. Т. 46. С. 354–360.
- *Naumoff D.G.* Furanosidase superfamily: search of homologues // Mol. Biol. (Moscow). 2012. V. 46. P. 322–327.
- *Наумов Д.Г., Дедыш С.Н.* Малоизученные группы бактерий источник новых ферментов:  $\beta$ -галактозидазы из планктомицетов и веррукомикробий // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 695—705.
- *Naumoff D.G.*, *Dedysh S.N*. Bacteria from poorly studied phyla as a potential source of new enzymes:  $\beta$ -galactosidases from *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia* // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 796–805.
- Наумов Д.Г., Иванова А.А., Дедыш С.Н. Филогения  $\beta$ -ксиланаз планктомицетов // Мол. биология. 2014. Т. 48. С. 508—517.
- Naumoff D.G., Ivanova A.A., Dedysh S.N. Phylogeny of  $\beta$ -xylanases from *Planctomycetes* // Mol. Biol. (Moscow). 2014. V. 48. P. 439–447.
- Наумов Д.Г., Каррерас М. Новая программа PSI Protein Classifier автоматизирует анализ результатов программы PSI-BLAST // Мол. биология. 2009. Т. 43. С. 709—721.
- *Naumoff D.G., Carreras M.* PSI protein classifier: a new program automating PSI-BLAST search results // Mol. Biol. (Moscow). 2009. V. 43. P. 652–664.
- Aspeborg H., Coutinho P.M., Wang Y., Brumer H. 3rd, Henrissat B. Evolution, substrate specificity and subfamily clas-

- sification of glycoside hydrolase family 5 (GH5) // BMC Evol. Biol. 2012. V. 12. Art. 186.
- *Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S.* Microbial xylanases and their industrial applications: a review // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 56. P. 326–338.
- Capetti C.C.M., Vacilotto M.M., Dabul A.N.G., Sepulchro A.G.V., Pellegrini V.O.A., Polikarpov I. Recent advances in the enzymatic production and applications of xylooligosaccharides // World J. Microbiol. Biotechnol. 2021. V. 37. Art. 169.
- Dedysh S.N., Beletsky A.V., Ivanova A.A., Kulichevskaya I.S., Suzina N.E., Philippov D.A., Rakitin A.L., Mardanov A.V., Ravin N.V. Wide distribution of Phycisphaera-like planctomycetes from WD2101 soil group in peatlands and genome analysis of the first cultivated representative // Environ. Microbiol. 2021. V. 23. P. 1510–1526.
- *Dedysh S.N., Ivanova A.A. Planctomycetes* in boreal and subarctic wetlands: diversity patterns and potential ecological functions // FEMS Microbiol. Ecol. 2019. V. 95. Art. fiy227.
- Drula E., Garron M.-L., Dogan S., Lombard V., Henrissat B., Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50 (Database issue). P. D571–D577. (http://www.cazy.org/).
- Fukunaga Y., Kurahashi M., Sakiyama Y., Ohuchi M., Yokota A., Harayama S. Phycisphaera mikurensis gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of Phycisphaeraceae fam. nov., Phycisphaerales ord. nov. and Phycisphaerae classis nov. in the phylum Planctomycetes // J. Gen. Appl. Microbiol. 2009. V. 55. P. 267–275.
- *Garron M.-L.*, *Henrissat B*. The continuing expansion of CAZymes and their families // Curr. Opin. Chem. Biol. 2019. V. 53. P. 82–87.
- *Gupta G.K.*, *Dixit M.*, *Kapoor R.K.*, *Shukla P.* Xylanolytic enzymes in pulp and paper industry: new technologies and perspectives // Mol. Biotechnol. 2022. V. 64. P. 130–143. https://doi.org/10.1007/s12033-021-00396-7
- Heinze S., Mechelke M., Kornberger P., Liebl W., Schwarz W.H., Zverlov V.V. Identification of endoxylanase XynE from Clostridium thermocellum as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141 // Sci. Rep. 2017. V. 7. Art. 11178.
- Holck J., Djajadi D.T., Brask J., Pilgaard B., Krogh K.B.R.M., Meyer A.S., Lange L., Wilkens C. Novel xylanolytic triple domain enzyme targeted at feruloylated arabinoxylan degradation // Enzyme Microb. Technol. 2019. V. 129. Art. 109353.
- Ivanova A.A., Kulichevskaya I.S., Merkel A.Y., Toshchakov S.V., Dedysh S.N. High diversity of Planctomycetes in soils of two lichen-dominated sub-arctic ecosystems of northwestern Siberia // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 2065.
- Ivanova A.A., Naumoff D.G., Miroshnikov K.K., Liesack W., Dedysh S.N. Comparative genomics of four Isosphaeraceae planctomycetes: a common pool of plasmids and glycoside hydrolase genes shared by Paludisphaera borealis PX4<sup>T</sup>, Isosphaera pallida IS1B<sup>T</sup>, Singulisphaera acidiphila DSM 18658<sup>T</sup>, and strain SH-PL62 // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 412.
- Kovaleva O.L., Merkel A.Yu., Novikov A.A., Baslerov R.V., Toshchakov S.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. Tepidisphaera mucosa gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic member of the class *Phycisphaerae* in the phylum *Planctomycetes*, and proposal of a new family, *Tepidisphaeraceae* fam. nov., and a new order, *Tepidisphaerales* ord. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 549–555.

Kulichevskaya I.S., Naumoff D.G., Miroshnikov K.K., Ivanova A.A., Philippov D.A., Hakobyan A., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Liesack W., Dedysh S.N. Limnoglobus roseus gen. nov., sp. nov., a novel freshwater planctomycete with a giant genome from the family Gemmataceae // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 1240–1249.

*Kulkarni N., Shendye A., Rao M.* Molecular and biotechnological aspects of xylanases // FEMS Microbiol. Rev. 1999. V. 23. P. 411–456.

Linares-Pasten J.A., Aronsson A., Karlsson E.N. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass // Curr. Protein Pept. Sci. 2018. V. 19. P. 48–67.

Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42 (Database issue). P. D490—D495.

McDonald A.G., Boyce S., Tipton K.F. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37 (Database issue). P. D593—D597.

*Mewis K., Lenfant N., Lombard V., Henrissat B.* Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. P. 1686–1692.

Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G.A., Sonnhammer E.L.L., Tosatto S.C.E., Paladin L., Raj S., Richardson L.J., Finn R.D., Bateman A. Pfam: the protein families database in 2021 // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49 (Database issue). P. D412—D419.

*Naumoff D.G.* Bioinformatic analysis of endo-β-xylanases from *Planctomycetes* // The Ninth International Conference on the Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology. Abstracts. June 23–28, 2014. Novosibirsk. Russia. P. 112. (http://conf.bionet.nsc.ru/bgrssb2016/wp-content/uploads/sites/2/2015/11/BGRS2014.pdf).

*Naumoff D.G.* β-Fructosidase superfamily: homology with some  $\alpha$ -L-arabinases and  $\beta$ -D-xylosidases // Proteins. 2001. V. 42. P. 66–76.

Naumoff D.G. GH97 is a new family of glycoside hydrolases, which is related to the  $\alpha$ -galactosidase superfamily // BMC Genomics. 2005. V. 6. Art. 112.

Ndeh D., Rogowski A., Cartmell A., Luis A.S., Baslé A., Gray J., Venditto I., Briggs J., Zhang X., Labourel A., Terrapon N., Buffetto F., Nepogodiev S., Xiao Y., Field R.A., Zhu Y., O'Neil M.A., Urbanowicz B.R., York W.S., Davies G.J., Abbott D.W., Ralet M.C., Martens E.C., Henrissat B., Gilbert H.J. Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions // Nature. 2017. V. 544. P. 65–70.

Nguyen S.T.C., Freund H.L., Kasanjian J., Berlemont R. Function, distribution, and annotation of characterized cellulases, xylanases, and chitinases from CAZy // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 1629–1637.

Nordberg Karlsson E., Schmitz E., Linares-Pastén J.A., Adlercreutz P. Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 9081–9088.

*Pollet A., Delcour J.A., Courtin C.M.* Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. V. 30. P. 176–191.

Pons T., Naumoff D.G., Martínez-Fleites C., Hernández L. Three acidic residues are at the active site of a  $\beta$ -propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68 // Proteins. 2004. V. 54. P. 424–432.

Rakitin A.L., Naumoff D.G., Beletsky A.V., Kulichevskaya I.S., Mardanov A.V., Ravin N.V., Dedysh S.N. Complete genome sequence of the cellulolytic planctomycete *Telmatocola sphagniphila* SP2<sup>T</sup> and characterization of the first cellulolytic enzyme from planctomycetes // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126276.

Spring S., Bunk B., Spröer C., Rohde M., Klenk H.P. Genome biology of a novel lineage of planctomycetes widespread in anoxic aquatic environments // Environ. Microbiol. 2018. V. 20. P. 2438–2455.

Staley J.T., Fuerst J.A., Giovannoni S., Schlesner H. The Order Planctomycetales and the Genera Planctomyces, Pirellula, Gemmata, and Isosphaera // The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications / Eds. Balows A., Trüper H.G., Dworkin W., Harder K.-H., Schleifer. N.Y.: Springer, 1992. P. 3710–3731.

Terrapon N., Lombard V., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. Chapter 6. The CAZy database/the Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) database: principles and usage guidelines // A Practical Guide to Using Glycomics Databases / Ed. Ao-ki-Kinoshita K.F. Tokyo: Springer, 2017. P. 117—131.

Wang Y., Sakka M., Yagi H., Kaneko S., Katsuzaki H., Kunitake E., Kimura T., Sakka K. Ruminiclostridium josui Abf62A-Axe6A: a tri-functional xylanolytic enzyme exhibiting α-L-arabinofuranosidase, endoxylanase, and acetylxylan esterase activities // Enzyme Microb. Technol. 2018. V. 117. P. 1–8.

Ward N.L., Dedysh S.N. Planctomycetes // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B. 2022.

https://doi.org/10.1002/9781118960608.pbm00021.pub2

## Genetic Determinants of Xylane Utilization in *Humisphaera borealis* M1803<sup>T</sup>, a Planctomycete of the Class *Phycisphaerae*

D. G. Naumoff<sup>1, \*</sup>, I. S. Kulichevskaya<sup>1</sup>, and S. N. Dedysh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: daniil naumoff@yahoo.com

Received January 13, 2022; revised January 29, 2022; accepted January 31, 2022

**Abstract**—Planctomycetes of the class *Phycisphaerae* are aerobic and anaerobic heterotrophic bacteria that colonize a wide range of marine and terrestrial habitats. Their functional roles in the environment, however,

are still poorly understood. Humisphaera borealis M1803<sup>T</sup> is one of the very few characterized planctomycetes of this class. It is also the first described representative of the previously uncultured group WD2101, which is commonly detected in soils and peatlands. This work dealt with the analysis of genetic determinants that define the ability of Humisphaera borealis M1803<sup>T</sup> to grow on xylan, one of the plant cell wall polymers. The whole genome sequence analysis of this planctomycete resulted in identification of five genes encoding the proteins homologous to the previously described endo- $\beta$ -xylanases. For two of these proteins, evolutionarily closer experimentally characterized homologues with other substrate specificities were found. In a representative of the GH10 family of glycoside hydrolases, the active center of the enzyme was destroyed. We consider two proteins from the GH62 and GH141 families as the most likely candidates for the role of  $\beta$ -xylanase responsible for xylan utilization. Phylogenetic analysis of proteins of the GH10, GH62 and GH141 families was carried out. The role of lateral transfers in the evolution of the genes for glycoside hydrolases and their close homologues is discussed.

**Keywords:** glycoside hydrolase,  $\beta$ -xylanase, GH62 family, GH141 family, *Planctomycetes, Humisphaera bo-realis*, protein phylogenetic tree, protein evolution, lateral gene transfer, search for homologues, gene annotation, xylan degradation

#### \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_\_ СТАТЬИ

### ГЛИКОПОЛИМЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРИЗНАК ARTHROBACTER CRYSTALLOPOIETES

© 2022 г. Н. В. Потехина $^{a,*}$ , Е. В. Арискина $^{b}$ , А. С. Шашков $^{c}$ , Е. М. Тульская $^{a}$ , Л. И. Евтушенко $^{b}$ 

<sup>а</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

<sup>b</sup>ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пущино, 142290, Россия <sup>c</sup>Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991, Россия

\*E-mail: potekhina56@mail.ru Поступила в редакцию 26.11.2021 г. После доработки 18.01.2022 г. Принята к публикации 21.01.2022 г.

Изучен состав и структура гликополимеров клеточной стенки *Arthrobacter crystallopoietes* BKM Ac- $1107^{\rm T}$  (семейство *Micrococcaceae*, филум *Actinobacteria*), отнесенного ранее к группе "*Arthrobacter globiformis*" на основе высокого сходства последовательностей генов 16S рРНК и традиционных хемотаксономических признаков. С использованием химических и ЯМР-спектроскопических методов идентифицированы тейхоевая кислота — 1,3-поли(глицерофосфат), замещенный остатками  $\beta$ -глюкозы, и дигликозил-1-фосфатный полимер с повторяющимся звеном -6)- $\alpha$ -D-GalpNAc- $(1 \rightarrow 6)$ - $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P-. Результаты филогеномного (таксогеномного) анализа — определения средней идентичности аминокислот (AAI) и сходства консервативных белков (POCP) — свидетельствуют о принадлежности *A. crystallopoietes* к новому роду. При этом состав и структура гликополимеров клеточной стенки могут рассматриваться как важный диагностический признак этого рода, который будет описан в будущем на основе *A. crystallopoietes*.

**Ключевые слова:** Arthrobacter crystallopoietes, гликополимеры клеточной стенки, тейхоевые кислоты, систематика, таксогеномика

**DOI:** 10.31857/S002636562230005X

Изучение полимеров клеточных стенок микроорганизмов важно для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в том числе, систематики микроорганизмов. Хотя в последние годы развитие систематики прокариот основывается преимущественно на данных филогеномики (таксогеномики), сведения о фенотипических характеристиках, в частности, хемотаксономических, отражающих химический состав клеток и клеточных стенок, являются по-прежнему акту-

Принятые сокращения: HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy) — протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; ROESY (Rotating-frame nuclear Overhauser Effect correlation Spectroscopy) — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY (Correlation Spectroscopy) — корелляционная спектроскопия; TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) — тотальная корреляционная спектроскопия; HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) — гетероядерная корреляция через несколько связей;  $\delta_{\rm C}$ ,  $\delta_{\rm H}$ ,  $\delta_{\rm P}$  — значения химических сдвигов атомов  $^{13}{\rm C}$ ,  $^{1}{\rm H}$  и  $^{31}{\rm P}$  соответственно; AAI (Average Amino Acid Identity) — средняя идентичность аминокислот между штаммами; POCP (Percentage Of Conserved Proteins) — сходство консервативных белков.

альными (Chun et al., 2018; Nouioui et al., 2018; Salam et al., 2020).

Основным гликополимером клеточных стенок грамположительных бактерий является, как известно, пептидогликан, характеризующийся высокой степенью структурного разнообразия (Schleifer, Kandler, 1972; Schumann, 2011). Типы и вариации структур пептидогликана служат важными диагностическими признаками таксонов разного ранга (Schumann et al., 2009; Schumann, 2011). Помимо пептидогликана клеточные стенки грамположительных бактерий обычно содержат вторичные гликополимеры (secondary cell wall glycopolymers; Kohler et al., 2009). К ним относятся ковалентно связанные с пептидогликаном тейхоевые кислоты и поли(гликозилфосфаты), а также не содержащие фосфата (бесфосфатные) гликополимеры - нейтральные и кислые, в том числе тейхуроновые, тейхулозоновые и связанные с мембраной липотейхоевые кислоты (Kohler et al., 2009; Potekhina et al., 2011; Шашков с соавт., 2020а, б; Потехина с соавт., 2021).

Вторичные гликополимеры бактерий в сравнении с пептидогликанами являются менее изу-

ченными в таксономическом аспекте. Однако имеющиеся в литературе сведения указывают на то, что набор, структуры и отдельные структурные компоненты гликополимеров могут быть специфичными для видов, родов и высших таксонов актинобактерий (Takeuchi, Yokota, 1989; Schumann et al., 2009; Potekhina et al., 2011; Evtushenko, Ariskina, 2015; Goodfellow, Jones, 2015; Nouioui et al., 2018; Шашков с соавт. 2020б; Потехина с соавт. 2021).

Вид A. crystallopoietes входит в состав ревизованного в 2016 г. рода *Arthrobacter*, но занимает обособленное от A. globiformis и других видов группы "A. globiformis" (A. humicola, A. oryzae u A. pascens) положение на филогенетических дендрограммах, построенных на основе последовательностей генов 16S pPHK с использованием разных методов (Busse et al., 2012; Busse, 2016). A. crystallopoietes, однако, был условно отнесен к группе "A. globiformis" с учетом его высокого сходства с A. globiformis по последовательностям генов 16S pPHK (97.6%), а также сходства с A. globiformis и другими видами группы "A. globiformis" по ключевым хемотаксономическим признакам - пептидогликану типа А3α, преобладающему менахинону MK-9(H2) и составу полярных липидов (Busse et al., 2012; Busse, 2016).

Филогенетическая обособленность вида *A. crystallopoietes*, наряду с его отличиями от видов группы "*A. globiformis*" по составу межпептидного мостика пептидогликана (количеству остатков аланина), стали основанием для предположения о принадлежности *A. crystallopoietes* к отдельной группе родового ранга, отличной от "*A. globiformis*" (Busse, 2016).

Кроме того, согласно ранним работам (Садиков с соавт. 1983; Takeuchi, Yokota, 1989), A. crystallopoietes отличается от представителей группы "A. globiformis" (A. globiformis и A. pascens) по составу гликополимеров клеточной стенки. Клеточная стенка A. crystallopoietes содержит тейхоевую кислоту и гликозилфосфатный полимер, в то время как A. globiformis и A. pascens характеризуются наличием бесфосфатных гликополимеров. Однако точные химические структуры вышеупомянутых полимеров не установлены. Нет также информации о наличии или отсутствии в клеточной стенке A. crystallopoietes нейтральных полисахаридов, характерных для A. globiformis, A. pascens, A. citreus, A. ramosus и некоторых других видов Arthrobacter (Садиков с соавт.б 1983; Takuchi, Yokota, 1989; Zhou et al., 2009; Busse, 2016; Busse, Moore, 2018; Потехина с соавт. 2021). Кроме того, выводы о наличии или отсутствии в клеточной стенке гликополимеров того или иного типа, основанные на результатах исследований с использованием только деструктивных химических методов (анализ продуктов кислотной деградации клеточных стенок и выделенных из них препаратов углеводсодержащих полимеров), могут быть ошибочными. Для подтверждения или установления структуры полимеров требуется использование методов ЯМР-спектроскопии (Fiedler, Schäffler, 1987; Takeuchi, Yokota, 1989; Шашков с соавт. 2020а, б).

Следует также отметить, что с накоплением данных о полных геномах и развитием филогеномики (таксогеномики) стало очевидно, что результатов сравнительного изучения генов 16S рРНК часто недостаточно для разграничения родов (Konstantinidis, Tiedje, 2005; Qin et al., 2014). Для установления родовой принадлежности прокариотных микроорганизмов и определения структуры таксонов выше видового ранга лучшее разрешение обеспечивают методы сравнительной геномики, в их числе определение средней идентичности аминокислот (AAI) и сходства консервативных белков (РОСР) (Konstantinidis, Tiedje, 2005; Kim et al., 2021) и РОСР (Qin et al., 2014).

Целью настоящей работы было определение состава и структур вторичных гликополимеров клеточной стенки типового штамма вида *A. crystallopoietes*, сопровождаемое уточнением таксономического статуса этого вида на основе таксогеномного анализа.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изученный штамм A. crystallopoietes BKM Ac- $1107^{T}$  (=DSM  $20117^{T}$ ) получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (BKM) (https://www.vkm.ru).

Культуру выращивали аэробно при 28°С в колбах на качалке до середины логарифмической фазы роста на пептонно-дрожжевой среде (Potekhina et al., 2011). Клеточные стенки получали методом дифференциального центрифугирования после разрушения клеток на ультразвуковом дезинтеграторе UP100H ("Hielscher", Германия). Выделение гликополимеров из клеточных стенок проводили трихлоруксусной кислотой, как описано в работе (Potekhina et al., 2011). Для изучения качественного состава клеточной стенки и препаратов гликополимеров проводили кислотный гидролиз 2 M HCl, 3 ч, 100°C; продукты гидролиза анализировали методом электрофореза и хроматографии на бумаге как описано ранее (Potekhina et al., 2011).

Полную структуру полимеров, включающую состав мономеров, положение фосфодиэфирных связей в цепи, а также положение и конфигурацию гликозидных связей устанавливали методом ЯМР-спектроскопии. ЯМР-спектры препаратов снимали в растворах 99.96%-ной дейтерированной воды при температурах, обеспечивающих минимальное перекрывание остаточного сигнала дейтерированной воды с сигналами полимеров,

на спектрометре Avance 600 ("Bruker", Германия). Для отсчета химических сдвигов использовали внутренние стандарты натриевой соли 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты TSP ( $\delta_{\rm H}$  0.0 и  $\delta_{\rm C}$  –1.6) и внешний стандарт — 80%-ную фосфорную кислоту ( $\delta_{\rm P}$  0.0) при 313 К. Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения ("Bruker Optik GmbH", Германия). Время смешивания 150 мс и время спин-лока 250 мс были выбраны для экспериментов по двумерной спектроскопии  $^{\rm 1}$ H,  $^{\rm 1}$ H ROESY и TOCSY соответственно. Двумерные  $^{\rm 1}$ H,  $^{\rm 1}$ C HSQC, HMBC и  $^{\rm 1}$ H,  $^{\rm 3}$ P HMBC-эксперименты были оптимизированы для константы спин-спинового взаимодействия  $J_{\rm H,C}$  8 Гц.

Филогеномный (таксогеномный) анализ проводили на основе 24 геномных последовательностей, доступных в базах данных GenBank и GOLD: Acaricomes phytoseiuli DSM 14247<sup>T</sup> AQXM00000000, Arthrobacter agilis DSM 20550<sup>T</sup> VHIM00000000, A. citreus DSM 20133<sup>T</sup> VTFV00000000, A. crystallopoietes DSM 20117<sup>T</sup> CP018863, A. globiformis NBRC 12137<sup>T</sup>, BAEG00000000, A. koreensis DSM 16760<sup>T</sup> WACG00000000, A. luteolus DSM 13067<sup>T</sup> WB-JQ00000000, A. oryzae DSM 25586<sup>T</sup> RBIR00000000, A. pascens DSM 545<sup>T</sup> JAFHKT000000000, A. pigmenti DSM 16403<sup>T</sup> JAATJL000000000. A. psychrolactophilus B7<sup>T</sup> QJVC00000000, A. woluwensis DSM 10495<sup>T</sup> FNSN00000000, Citricoccus muralis DSM 14442<sup>T</sup> QREH00000000, Glutamicibacter protophormiae DSM 20168<sup>T</sup> JAGIOJ000000000. Haematomicrobium sanguinis DSM 21259<sup>T</sup> JIAG00000000, Micrococcus luteus NCTC 2665<sup>T</sup> LS483396, Paenarthrobacter aurescens NBRC 12136<sup>T</sup> BJMD00000000. Paeniglutamicibacter sulfureus DSM 20167<sup>T</sup> Gold Id:Ga0480495, Pseudarthrobacter polychromogenes CGMCC 1.1927<sup>T</sup> BMKU00000000, Pseudoglutamicibacter cumminsii DSM 10493<sup>T</sup> JAFB-CO000000000, Psychromicrobium silvestre DSM 102047<sup>T</sup> JACBYQ000000000, Sinomonas atrocyanea KCTC 3377<sup>T</sup> CP014518. Specibacter cremeus C1-50<sup>T</sup> RWKO00000000.

Показатели AAI рассчитывали по аминокислотным последовательностям аннотированных полных геномов на портале http://enve-omics.ce.gatech.edu/сиспользованием калькулятора AAI (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016). Значения РОСР рассчитывали сиспользованием скрипта runPOCP.sh (Pantiukh, Grouzdev, 2017) на основе ранее описанного подхода (Qin et al., 2014).

Дендрограмма, отражающая сходство геномов по 90 коровым генам (длина белковых последовательностей — 31358 аминокислот) была построена по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с применением программ web-cepвера M1CR0B1AL1Z3R (https://microbializer.tau.ac.il/index.html; Avram et al., 2019). В каче-

стве внешней группы использовали штамм *Micro-bacterium lacticum* DSM 20427.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В кислотных гидролизатах (2 М HCl, 3 ч,  $100^{\circ}$ C) клеточной стенки A. crystallopoietes BKM Ac- $1107^{\rm T}$  и выделенных из нее методом экстракции трихлоруксусной кислотой препаратов гликополимеров были идентифицированы продукты деградации, характерные для тейхоевых кислот (моно- и бисфосфаты глицерина), а также глюкоза, глюкозамин и галактозамин. Анализ препарата гликополимеров с помощью электрофореза выявил две фракции с подвижностью  $m_{\rm Grop}$  0.68 и  $m_{\rm Grop}$  0.9, что указывало на наличие не менее двух фосфатсодержащих полимеров.

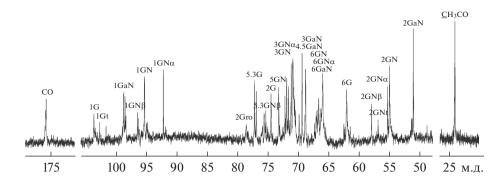
Спектр ЯМР  $^{13}$ С (рис. 1) препарата гликополимеров содержал сигналы разной интенсивности, что характерно для полимера с нерегулярной структурой или смеси полимеров. Часть сигналов (табл. 1), судя по величине химических сдвигов  $\delta_{\rm C}$  92.1 м.д. (остаток GN $\alpha$ ) и 96.4 м.д. (остаток GN $\beta$ ), принадлежала остаткам сахаров со свободной гидроксильной группой при C-1. Четыре сигнала с  $\delta_{\rm C}$  98.7 м.д. (остаток GaN), 98.4 м.д. (остаток GaN'), 98.2 м.д. (остаток GaN") и 103.6 м.д. (остаток G) были характерны для аномерных атомов углерода при гликозидных связях, и один сигнал с  $\delta_{\rm C}$  95.1 м.д. принадлежал аномерному атому углерода при фосфодиэфирной связи (табл. 1).

Расшифровать сигналы в одномерных спектрах и сделать выводы о структуре полимеров удалось на основе двумерных гомоядерных <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H COSY, TOCSY и ROESY, а также гетероядерных <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC и HMBC и <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P HMBC-экспериментов (спектры не приводятся).

Анализ спектров  $^1$ H,  $^1$ H COSY, TOCSY и RO-ESY показал наличие в полимере замещенных по гидроксилу при C-6 остатков 2-ацетамидо-2-дезокси- $\alpha$ -галактопиранозы ( $\alpha$ -GalpNAc, остаток GaN), 2-ацетамидо-2-дезокси- $\alpha$ -глюкопиранозы ( $\alpha$ -GlcpNAc, остаток GN $\alpha$ ) и 2-ацетамидо-2-дезокси- $\beta$ -глюкопиранозы ( $\beta$ -GlcpNAc, остаток GN $\beta$ ), а также незамещенных остатков  $\beta$ -глюкопиранозы ( $\beta$ -Glcp, остаток G) и тризамещенных остатков глицерина (остаток Gro).

Спектр <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P HMBC показал, что остатки фосфорной кислоты локализованы по гидроксилу при С-1 (остаток GNα) и С-6 (остаток GaN), что характерно для полимерной цепи, построенной из дигликозилфосфатных звеньев (Полимер I), а также по гидроксилам при С-1,3 остатков глицерина, составляющих цепь тейхоевой кислоты (Полимер II).

Анализ двумерного <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC спектра позволил идентифицировать все сигналы в одномер-



**Рис. 1.** Спектр  $^{13}$ С ЯМР гликополимеров клеточной стенки *Arthrobacter crystallopoietes* ВКМ Ac- $^{1107}$ Т. Арабские цифры — номера атомов в остатках G (β-Glcp), GaN (α-GalpNAc), GN (α-GlcpNAc), GN $\alpha$  (концевой остаток α-GlcpNAc), GN $\beta$  (концевой остаток β-GlcpNAc) и Gro (остаток глицерина); t (terminal) — концевой остаток.

**Таблица 1.** Химические сдвиги в спектрах  $^1$ H и  $^{13}$ C ЯМР гликополимеров клеточной стенки *Arthrobacter crystallopoietes* ВКМ Ac- $^{1107}$ T и фрагментов Полимера I

|  | Хим                   | ические сдв        | иги ЯМР <sup>13</sup> С (δ              | S <sub>C</sub> TSP −1.6) 1 | и <sup>1</sup> H (δ <sub>H</sub> TSP | 0.0)   |
|--|-----------------------|--------------------|---|----------------------------|--------------------------------------|--|
| Остаток  | C-1<br><i>H-1</i>     | C-2<br><i>H</i> -2 | C-3<br><i>H-3</i><br>( <i>H-3e,3a</i> ) | C-4<br><i>H-4</i>          | C-5<br><i>H-5</i>                    | C-6<br><i>H</i> -6<br>( <i>H</i> -6 <i>a</i> ,6 <i>b</i> ) |
|  | -                     | Полим              | ep I                                    | -                          |                                      | 1  |
| -6)-α-D-Gal $p$ NAc-(1→ (GaN)                            | 98.7                  | 51.1**             | 68.8                                    | 69.4                       | 70.9                                 | 65.8*  |
|  | 4.90                  | 4.21               | 3.96                                    | 4.05                       | 4.14                                 | 4.04, 4.00   |
| $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glc $p$ NAc-(1- $P$ - (GN) | 95.1*                 | 55.0**             | 72.0                                    | 70.6                       | 73.2                                 | 66.7   |
|  | 5.47                  | 3.96               | 3.79                                    | 3.93                       | <i>3.99</i>                          | 4.08, 3.69   |
|  | Д                     | исахариды Г        | Іолимера I                              | ,                          |                                      | -  |
| $\alpha$ -GalpNAc-(1 $\rightarrow$ (GaN')                | 98.4                  | 51.1               | 68.9                                    | 69.7                       | 72.2                                 | 62.4   |
|  | <i>4.95</i>           | 4.18               | 3.96                                    | <i>4.01</i>                | 4.00                                 | 3.77, 3.75   |
| →6)-α-D-GlcpNAc (GNα)                                    | 92.1                  | 55.3               | 72.0                                    | 71.0                       | 71.6                                 | 66.8   |
|  | 5.20                  | 3.88               | 3.76                                    | 3.60                       | 3.98                                 | 4.02, 3.67   |
| $\alpha$ -D-Gal $p$ NAc-(1 $\rightarrow$ (GaN")          | 98.2                  | 51.0               | 69.0                                    | 69.7                       | 72.2                                 | 62.4   |
|  | 4.95                  | <i>4.21</i>        | 3.96                                    | <i>4.01</i>                | 4.00                                 | 3.77, 3.75   |
| $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glc $p$ NAc (GN $\beta$ )   | 96.4                  | 57.9               | 75.2                                    | 70.7                       | 75.6                                 | 66.7   |
|  | <i>4.72</i>           | 3.68               | 3.53                                    | 3.59                       | 3.59                                 | 3.97, 3.74   |
|  | -                     | Полиме             | ep II                                   | -                          |                                      | 1  |
| -1)-snGro-(3- <i>P</i> - (Gro)<br>2)<br>↑                | 65.9***<br>4.21, 4.18 | 78.2<br>4.21       | 66.2***<br>4.12, 4.11                   |                            |                                      |  |
| β-D-Glc <i>p</i> -(1 (G)                                 | 103.6                 | 74.4               | 76.9                                    | 70.9                       | 77.2                                 | 61.5   |
|  | 4.63                  | 3.32               | 3.52                                    | <i>3.40</i>                | 3.47                                 | 3.92, 3.77   |

<sup>\*</sup> С ${
m H}_3$ СОN при  ${
m \delta}_{
m C}$  23.3, 23.4 и 176.8 м.д., 175.9 и  ${
m \delta}_H$  2.07 м.д.; \*\*\*  ${
m ^{31}}{
m P}$  при  ${
m \delta}_{
m P}$  —1.4 м.д.; \*\*\*  ${
m ^{31}}{
m P}$  при  ${
m \delta}_{
m P}$  +0.5 м.д.

микробиология том 91 № 3 2022

ном спектре ЯМР  $^{13}$ С (табл. 1). Из анализа химических сдвигов следует, что остатки GN $\alpha$  и GN $\beta$  замещены по гидроксилу при C-6 (слабопольный сдвиг 66.7 и 66.8 м.д.; 61—62 м.д. в соответствующих незамещенных остатках), а остаток глицерина дополнительно замещен по гидроксилу при C-2 (78.2 м.д.).

Окончательное заключение о строении цепей полимеров следовало из анализа спектров <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H ROESY и <sup>1</sup>H. <sup>13</sup>C HMBC (табл. 1). В спектре <sup>1</sup>H. <sup>1</sup>H ROESY наблюдалась корреляция аномерных протонов остатков GaN и протонов при C-6 остатков GN (4.90/4.08; 3.69), что свидетельствовало о пространственной близости этих атомов и наличии 1→6 связи между остатками. Корреляционный пик H-1 (G)/H-2 (Gro) (4.63/4.21) типичен для  $1\rightarrow 2$  связи между этими остатками. Спектр  ${}^{1}$ H, <sup>13</sup>С HMBC солержал корреляционные пики для атомов остатков, соединенных гликозидной связью: H-6,6' (GN $\alpha$ )/C-1 (GaN') (4.02; 3.67/98.4) и (GNB)/C-1 (GaN") (3.97; 3.74/98.2) и H-2 (Gro)/C-1 (G) (4.21/103.6). Эти пики соответствуют структуре повторяющихся звеньев двух полимеров: -6)- $\alpha$ -GalpNAc- $(1\rightarrow 6)$ - $\alpha$ -GlcpNAc-(1-P-(Полимер I) и -1)-[β-Glcp-(1→2)]-snGro-(3-P-(Полимер II).

Таким образом, с использованием ЯМР-спектроскопических методов нами впервые установлены полные структуры углеводсодержащих полимеров клеточной стенки A. crystallopoietes. Идентифицированные полимеры представляют собой тейхоевую кислоту — 1,3-поли(глицерофосфат), замещенный остатками  $\beta$ -глюкозы, и дигликозил-1-фосфатный полимер с повторяющимся звеном -6)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P-. Бесфосфатные гликополимеры, свойственные другим изученным видам группы "A. globiformis" и  $Arthrobacter\ sensu\ lato\ (Садиков\ c\ coabt., 1983; Takeuchi, Yokota, 1989), у <math>A$ . crystallopoietes обнаружены не были.

Для уточнения таксономического статуса *A. crystallopoietes* нами были определены значения AAI и POCP (табл. 2). Дендрограмма (рис. 2) отражает сходство исследованных штаммов по показателям POCP (90 коровых генов, длина белковых последовательностей 31358 аминокислот). Как видно, *A. crystallopoietes* образует общую группу с *A. citreus*, но оба вида обособлены друг от друга, а также от *A. globiformis*, и других видов *Micrococcaceae*, о чем свидетельствуют значения POCP и AAI на родовом уровне (табл. 2).

Значение РОСР для A. crystallopoietes и A. citreus (59.4%), а также для A. crystallopoietes по отношению к видам группы "A. globiformis" (A. globiformis, A. pascens и A. oryzae) (61.5%, 61.8% и 58.4% соответственно) близки или ниже, чем между типовыми видами родов Micrococcaceae (например, A. globiformis и Paenarthrobacter aurescens — 69.4%, Acaricomes phytoseiuli и Psychromicrobium silvestre — 63.5%, Glutamici

bacter protophormiaeu и Paeniglutamicibacter sulfureus — 63.0%, Micrococcus luteus и Citricoccus muralis — 62.9%).

Значения AAI между A. crystallopoietes и каждым из видов группы "A. globiformis" — A. globiformis (64.6%), A. pascens (65.0%), A. oryzae (64.2%), а также между A. crystallopoietes и A. citreus (65.6%), были также близки или ниже значений для видов разных родов этой группы (табл. 2). Так, показатели AAI составили соответственно 77.4%, 74.6%, 65.5% и 65.3% для A. globiformis и Pseudarthrobacter polychromogenes, Paenarthrobacter aurescens, Specibacter cremeus и Sinomonas atrocyanea. Определенные значения AAI соответствуют междуродовым для некоторых других групп бактерий (Nicholson et al., 2020; Ramírez-Durán et al., 2021).

Таким образом, результаты таксогеномного анализа показывают, что *A. crystallopoietes* обособляется на родовом уровне от видов группы "*A. globiformis*" и *Arthrobacter sensu lato* в целом, а также от других представителей семейства *Micrococcaceae*. При этом *A. crystallopoietes*, в отличие от других видов рода *Arthrobacter*, имеющих пептидогликан типа А3α и бесфосфатные (нейтральные) гликополимеры клеточной стенки (Садиков с соавт., 1983; Такеuchi, Yokota, 1989), характеризуется наличием фосфатсодержащих полимеров — тейхоевой кислоты [1,3-поли(глицерофосфата), замещенного остатками β-глюкозы] и поли(дигликозил1-фосфата).

Полученные данные свидетельствуют о том, что состав и структура гликополимеров клеточной стенки может рассматриваться как важный диагностический признак нового рода, который будет описан в будущем на основе *A. crystallopoietes*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1051), а также в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300094-7.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Потехина Н.В., Шашков А.С., Тульская Е.М., Арискина Е.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Галактофуранан клеточной стенки актинобактерий рода Paenarthrobacter //

Таблица 2. Сходство (%) средней идентичности аминокислот (AAI) и консервативных белков (РОСР) 23 видов актинобактерий

| ž       | Вилы                                     |      |      |      |      |      |      | Спр     | ава о | т диаг | Справа от диагонали | - 1      | AAI; слева | ОТ       | диагонали | али —    | POCP     | c.       |          |           |          |            |          |      |
|---------|--|------|------|------|------|------|------|---------|-------|--------|---------------------|----------|------------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|------------|----------|------|
| <u></u> | TO PARTY                                 | 1    | 2    | 8    | 4    | 5    | 9    | 7       | 8     | 6      | 10                  | 11       | 12         | 13       | 14        | 15       | 16       | 17       | 81       | 19 2      | 20       | 21         | 22       | 23   |
|         | Arthrobacter crystallopoietes            | *    | 61.5 | 61.8 | 58.4 | 59.4 | 60.1 | 60.2    | 56.3  | 57.3   | 52.5                | 50.8 4   | 46.8 5     | 54.3 5   | 52.2      | 47.9     | 46.2 5   | 9 0.69   | 62.9     | 60.0      | 39.9     | 49.4 5     | 57.3 5   | 53.8 |
| 2       | Arthrobacter globiformis                 | 9.49 | *    | 79.9 | 70.0 | 55.5 | 55.6 | 55.3    | 56.9  | 56.2   | 56.9                | 56.5 4   | 48.6 4     | 47.9     | 48.0 4    | 48.9 4   | 43.9 6   | 69.4 5   | 54.7 7   | 72.1      | 37.8 5   | 53.4 6     | 61.0     | 9.95 |
| 3       | Arthrobacter pascens                     | 65.0 | 84.1 | *    | 68.4 | 55.8 | 55.5 | 55.5    | 56.8  | 56.9   | 56.6 5              | 56.3 4   | 49.3 4     | 48.2 4   | 48.5 4    | 49.1 4   | 44.8     | 69.1 5.  | 55.5     | 72.2   38 | 38.4 5   | 53.1 6     | 60.7   5 | 56.2 |
| 4       | Arthrobacter oryzae                      | 64.2 | 77.3 | 77.4 | *    | 59.0 | 58.9 | 58.0    | 59.1  | 55.9   | 58.1                | 57.5     | 52.0 4     | 47.6     | 48.9      | 51.4 4   | 46.7 6   | 65.8 5   | 55.2 6   | 68.4 39.  | 2        | 56.7 6     | 64.8 5   | 59.3 |
| 5       | Arthrobacter citreus                     | 9:59 | 62.9 | 63.0 | 63.2 | *    | 89.4 | 83.4 (6 | 63.7  | 59.5   | 57.1                | 55.7   5 | 54.8       | 55.1   5 | 54.2      | 55.2   5 | 52.3 6   | 60.2 5   | 57.5   5 | 58.6 4:   | 45.0   5 | 55.5 5     | 55.9   5 | 55.5 |
| 9       | Arthrobacter koreensis                   | 65.8 | 63.0 | 63.1 | 63.1 | 91.9 | *    | 83.2 (  | 64.3  | 59.8   | 57.6                | 55.3   5 | 55.4   5   | 55.6     | 54.4      | 55.9   5 | 53.3 5   | 59.2   5 | 58.1   5 | 58.9 40   | 46.4 5   | 55.5 5     | 55.8 5   | 54.6 |
| 7       | Arthrobacter luteolus                    | 65.7 | 62.4 | 62.9 | 63.0 | 83.2 | 82.9 | *       | 61.1  | 58.5   | 56.2   5            | 54.8 5   | 52.4       | 55.1   5 | 53.7   5  | 53.2   5 | 50.4 5   | 59.2   5 | 57.2   5 | 58.1 4.   | 44.1 5.  | 53.8 5     | 55.1   5 | 55.0 |
| ∞       | Arthrobacter agilis                      | 65.1 | 63.7 | 63.7 | 63.7 | 66.3 | 66.1 | 65.7    | *     | 6.59   | 58.2   5            | 53.2   5 | 55.2   5   | 52.6     | 50.0      | 56.7   5 | 52.2   5 | 59.7   5 | 52.8 6   | 61.1 4.   | 43.9 5   | 55.3 5     | 54.1 5   | 52.5 |
| 6       | Arthrobacter pigmenti                    | 65.1 | 62.9 | 63.2 | 62.8 | 65.0 | 65.0 | 64.9    | 6.89  | *      | 55.0 3              | 51.3   5 | 50.4       | 48.9     | 47.7      | 53.4 4   | 46.9 5   | 58.8 5   | 52.0   5 | 58.5 39   | 39.5 5   | 53.5 5     | 51.7   5 | 53.6 |
| 10      | Arthrobacter psychrolactophilus          | 61.2 | 63.9 | 63.6 | 63.4 | 61.5 | 61.3 | 61.0    | 61.1  | 0.09   | *                   | 57.2   5 | 53.6 4     | 48.1     | 52.3   5  | 53.4 4   | 47.6     | 63.1 5   | 53.6 6   | 60.1 40   | 40.4 5   | 57.8   52. | 6        | 60.7 |
| 11      | Arthrobacter woluwensis                  | 61.2 | 0.99 | 66.1 | 6.59 | 61.3 | 6.09 | 60.4    | 61.2  | 60.2   | 61.5                | *        | 54.5 4     | 48.0     | 50.0      | 54.3 4   | 47.6     | 61.7   5 | 51.0   5 | 57.2 4.   | 42.8     | 58.5 5     | 55.1 5   | 55.0 |
| 12      | Acaricomes phytoseiuli                   | 61.3 | 63.2 | 62.6 | 63.2 | 61.6 | 9.19 | 61.2    | 61.6  | 8.09   | 62.0                | 61.4     | *          | 47.4     | 46.7   §  | 58.2   5 | 52.0   5 | 52.4 4.  | 45.8 5   | 52.5 4    | 47.9 6.  | 63.5 4     | 47.9   5 | 50.3 |
| 13      | Citricoccus muralis                      | 58.0 | 56.7 | 56.2 | 56.3 | 57.7 | 57.9 | 57.4    | 57.4  | 56.0   | 55.2   5            | 55.6 5   | 55.7       | *        | 52.1      | 47.8     | 62.8 5   | 50.0     | 54.3 4   | 49.3 40   | 46.3 4   | 45.9       | 48.6 4   | 46.4 |
| 4       | Glutamicibacter protophormiae            | 58.1 | 56.6 | 56.7 | 56.9 | 57.8 | 57.5 | 57.6    | 57.0  | 55.9   | 56.7   5            | 56.6 5   | 56.2   5   | 55.4     | *         | 47.2   5 | 50.1   5 | 52.3 6   | 63.0 4   | 49.8 4:   | 45.1 4   | 46.8 48.   | 9.       | 49.8 |
| 15      | Haematomicrobium sanguinis               | 59.4 | 58.8 | 58.9 | 58.7 | 59.7 | 9.65 | 59.3    | 59.3  | 58.8   | 57.3                | 58.0   5 | 59.9       | 54.8     | 55.0      | *        | 51.4   5 | 53.1 4   | 47.5   5 | 51.5 4    | 44.8 5   | 57.2 4     | 47.4 4   | 49.7 |
| 16      | Micrococcus luteus                       | 57.1 | 56.5 | 9.99 | 56.8 | 57.3 | 97.6 | 57.4    | 57.3  | 56.1   | 55.3 5              | 56.1 5   | 56.4 6     | 63.3 5   | 55.8 5    | 55.9     | *        | 46.2 4   | 48.7 4   | 46.3 5    | 51.1     | 48.0 4     | 44.6 4   | 44.9 |
| 17      | Paenarthrobacter aurescens               | 64.2 | 74.6 | 75.4 | 73.5 | 63.2 | 63.1 | 62.9    | 63.7  | 62.9   | 63.9                | 66.2 6   | 62.5       | 56.1     | 57.0   5  | 58.7   5 | 56.0     | *        | 55.6 7   | 71.2      | 39.8 5   | 57.6       | 60.3 5   | 58.4 |
| 18      | Paeniglutamicibacter sulfureus           | 62.2 | 59.5 | 60.1 | 0.09 | 60.5 | 9.09 | 60.5    | 59.7  | 58.9   | 59.1                | 58.8 5   | 58.2       | 57.3     | 63.4 5    | 56.7   5 | 9 9.95   | 60.4     | *        | 54.8 4.   | 43.7 4   | 48.1   5   | 53.7   5 | 53.4 |
| 19      | Pseudarthrobacter polychromogenes   64.9 |      | 77.4 | 77.8 | 0.97 | 63.8 | 64.3 | 63.3    | 64.2  | 63.3   | 64.1                | 62.9     | 62.6       | 56.9     | 56.7   5  | 58.7   5 | 56.4 7   | 74.6 6   | 60.4     | *         | 39.3 5   | 54.5 6     | 60.5 5   | 55.0 |
| 20      | Pseudoglutamicibacter cumminsii          | 55.2 | 54.1 | 54.2 | 54.3 | 55.1 | 55.4 | 55.0 5  | 54.2  | 53.5   | 53.4   5            | 54.2   5 | 54.2       | 54.8     | 55.1   5  | 53.2   5 | 55.0   5 | 54.3 5   | 55.9   5 | 54.2      | * 4      | 42.9 3     | 39.2 3   | 39.7 |
| 21      | Psychromicrobium silvestre               | 62.0 | 64.5 | 64.3 | 64.3 | 6.19 | 6.19 | 61.3    | 62.4  | 61.6   | 63.6                | 62.2     | 68.7   5   | 55.2   5 | 56.0   5  | 59.3   5 | 55.9     | 64.1   5 | 58.1 6   | 64.0   5  | 54.1     | *          | 52.3 5   | 56.4 |
| 22      | Sinomonas atrocyanea                     | 62.0 | 65.3 | 64.9 | 65.7 | 61.7 | 61.7 | 61.2    | 61.7  | 9.09   | 8.09                | 63.9     | 61.7       | 57.0     | 56.6 5    | 58.2 5   | 57.1   6 | 64.7   5 | 59.4 6   | 65.2   5: | 55.0 6   | 62.5       | *        | 9.99 |
| 23      | Specibacter cremeus                      | 63.2 | 65.5 | 65.1 | 65.3 | 62.3 | 62.3 | 61.9    | 62.4  | 61.8   | 70.4                | 62.8 6   | 63.1   5   | 56.2     | 57.3   5  | 58.6   5 | 9 8.99   | 64.7 6   | 60.1 6   | 64.8 54.  | 5        | 65.1 63.   | 3.4      | *    |
|         |  |      |      |      |      |      |      |         |       |        |                     |          |            |          |           |          |          |          |          |           |          |            |          |      |

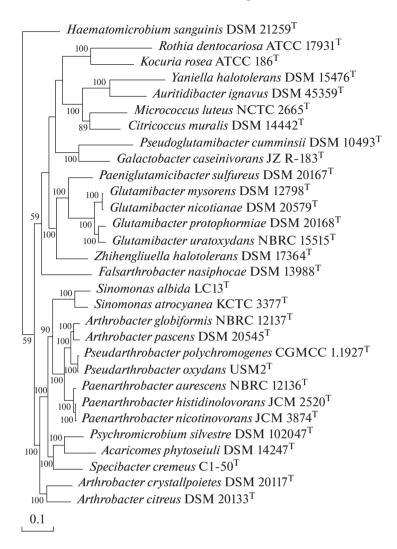


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе конкатенированных последовательностей 90 консервативных белков (31358 аминокислот) по методу максимального правдоподобия (Maximum-Likelihood) с использованием ресурсов web-сервера M1CR0B1AL1Z3R (https://microbializer.tau.ac.il/index.html; Avram et al., 2019). В качестве внешней группы использовали штамм *Microbacterium lacticum* DSM 20427. Цифрами у оснований ветвлений показаны величины статистической достоверности (bootstrap) > 50% (100 повторов). Масштаб соответствует одной замене на каждые 100 нуклеотидов.

Микробиология. 2021. Т. 90. С. 122—128. (*Potekhina N.V., Shashkov A.S., Ariskina E.V., Tul'skaya E.M., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I.* Cell wall galactofuranan of the *Paenarthrobacter* actinobacteria // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 106—111).

https://doi.org/10.1134/S0026261720060156

Садиков Б.М., Потехина Н.В., Кузнецов В.Д., Наумова И.Б. Обнаружение тейхоевых кислот в клетках бактерий рода Arthrobacter // ДАН СССР. 1983. Т. 271. С. 459—461. (Sadikov B.M., Potekhina N.V., Kuznetsov V.D., Naumova I.B. Detection of teichoic acids in cells of bacteria of the genus Arthrobacter // Doklady Akademii Nauk SSSR. 1983. V. 271. P. 459—461).

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 BKM Ac-2104<sup>T</sup> // Биохимия. 2020а. Т. 85. С. 736—742. (Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Do-

*rofeeva L.V., Evtushenko L.I., Potekhina N.V.* Two glycosyl 1-phosphate polymers and teichulosonic acid from *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104<sup>T</sup> cell wall // Biochemistry (Moscow). 2020a. V. 85. P. 629–635).

Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитренок А.С., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискункова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Рамноманнаны и тейхуроновая кислота из клеточной стенки Rathayibacter tritici BKM Ac-1603<sup>T</sup> // Биохимия. 2020б. 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<sup>T</sup> // Biochemistry (Moscow). 2020b. V. 85. P. 369–377).

Avram O., Rapoport D., Portugez S., Pupko T. M1CR0B1AL1Z3R-a user-friendly web server for the analysis of large-scale microbial genomics data // Nucleic Acids

Res. 2019. V. 47. P. W88–W92. https://doi.org/10.1093/nar/gkz423

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.

Busse H.-J., Moore E.R.B. Reclassification of Arthrobacter nasiphocae (Collins et al. 2002) as Falsarthrobacter nasiphocae gen. nov., comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 1361–1364.

Busse H.-J., Wieser M., Buczolitz S. Genus III. Arthrobacter Cohn and Dimmick 1947, 301<sup>AL</sup> emend Koch, Schumann and Stackebrandt 1995, 838 // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. / Eds. Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Suzuki K.-i., Ludwig W. and Whitman W.B. New York e.a.: Springer, 2012. V. 5. Part A. P. 578–624.

Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi. H., Xu X.W., De Meyer S., Trujillo M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.

*Evtushenko L.I., Ariskina E.V. Nocardioidaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. 2015. P. 1–18.

https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00042.

*Fiedler F., Schäffler M.J.* Teichoic acids in cell wall of strains of "*nicotianae*" group of *Arthrobacter*: a chemotaxonomic marker // System. Appl. Microbiol. 1987. V. 9. P. 16–21.

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.

*Kim D., Park S., Chun J.* Introducing EzAAI: a pipeline for high throughput calculations of prokaryotic average amino acid identity // J. Microbiol. 2021. V. 59. P. 476-480.

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.

Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 6258–6264.

Nicholson A.C., Gulvik C.A., Whitney A.M., Humrighouse B.W., Bell M.E., Holmes B., Steigerwalt A.G., Villarma A., Sheth M., Batra D., Rowe L.A., Burroughs M., Pryor J.C., Bernardet J.F., Hugo C., Kämpfer P., Newman J.D., McQuiston J.R. Division of the genus Chryseobacterium: Observation of discontinuities in amino acid identity values, a possible consequence of major extinction events, guides transfer of nine species to the genus Epilithonimonas, eleven species to the genus Kaistella, and three species to the genus Halpernia gen. nov., with description of Kaistella daneshvariae sp. nov.

and *Epilithonimonas vandammei* sp. nov. derived from clinical specimens // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 4432–4450.

Nouioui I., Carro L., Garcia-Lopez M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpides N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Goker M. // Genomebased taxonomic classification of the phylum Actinobacteria / Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2007.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02.007

*Pantiukh, K., Grouzdev D.* POCP-matrix calculation for a number of genomes // Figshare. 2017.

https://doi.org/10.6084/m9.figshare.4577953.v1.

Potekhina N.V., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Shash-kov A.S. Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria // Taxonomy of Prokaryotes, Methods in Microbiology / Eds. Rainey F.A. Oren A. London: Academic Press, 2011. V. 38. Ch. 6, P. 132–164.

*Qin Q.L., Xie B.B., Zhang X.Y., Chen X.L., Zhou B.C., Zhou J., Oren A., Zhang Y.Z.* A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights // J. Bacteriol. 2014. V. 196. P. 2210–2215.

Ramírez-Durán N., de la Haba R.R., Vera-Gargallo B., Sán-chez-Porro C., Alonso-Carmona S., Sandoval-Trujillo H., Ventosa A. // Taxogenomic and comparative genomic analysis of the genus Saccharomonospora focused on the identification of biosynthetic clusters PKS and NRPS / Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 603791.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.603791

Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // Peer J. Preprints. 2016. 4:e1900v1.

https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1900v1.

Salam N., Jiao J. Y., Zhang X. T., Li W.J. Update on the classification of higher ranks in the phylum *Actinobacteria* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 1331–355.

*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, V. 38, Ch. 6, 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 *Micrococcineae* // 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.

Zhou Y., Wei W., Wang X., Lai R. Proposal of Sinomonas flava gen. nov., sp. nov., and description of Sinomonas atrocyanea comb. nov. to accommodate Arthrobacter atrocyaneus // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 259—263.

#### Cell Wall Glycopolymers as a Diagnostic Trait of Arthrobacter crystallopoietes

N. V. Potekhina<sup>1, \*</sup>, E. V. Ariskina<sup>2</sup>, A. S. Shashkov<sup>3</sup>, T. M. Tul'skaya<sup>1</sup>, and L. I. Evtushenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

<sup>3</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: potekhina56@mail.ru

Received November 26, 2021; revised January 18, 2022; accepted January 21, 2022

**Abstract**—The composition and structure of the cell wall glycopolymers from *Arthrobacter crystallopoietes* VKM Ac- $1107^{T}$  (family *Micrococcaceae*, phylum *Actinobacteria*), previously assigned to the "*A. globiformis*" group based on the high similarity of 16S rRNA gene sequences and traditional chemotaxonomic markers were studied. Teichoic acid -1,3-poly (glycerol phosphate) substituted with β-glucose residues, and diglycosyl 1-phosphate polymer with -6)-α-D-GalpNAc- $(1 \rightarrow 6)$ -α-D-GlcpNAc-(1-P)- repeating unit were identified by chemical and NMR spectroscopy methods. The results of phylogenomic (taxogenomic) analysis, *viz.* determination of the average amino acid identity (AAI) and the similarity of conserved proteins (POCP), indicate that *A. crystallopoietes* belongs to a new genus and the composition of the cell wall glycopolymers may serve as a diagnostic characteristic of this genus, which will be described on the basis of *A. crystallopoietes*.

**Keywords:** Arthrobacter crystallopoietes, cell wall glycopolymers, teichoic acids, systematics, taxogenomics

#### \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_\_ СТАТЬИ

# ЭФФЕКТЫ ГОРМОНОВ АДРЕНАЛИНА, НОРАДРЕНАЛИНА И ЭСТРАДИОЛА НА ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРСИСТЕРОВ В КУЛЬТУРАХ СТАФИЛОКОККОВ, ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА, И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ГОЛОДАНИЮ И СТРЕССУ НОВОЙ СРЕДЫ

© 2022 г. Т. А. Панкратов<sup>а, \*</sup>, Ю. А. Николаев<sup>а</sup>, А. В. Ганнесен<sup>а</sup>, Г. И. Эль-Регистан<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва, 119071 Россия

> \*e-mail: tpankratov@gmail.com Поступила в редакцию 02.01.2022 г. После доработки 20.01.2022 г. Принята к публикации 20.01.2022 г.

Влияние гормонов, синтезируемых как организмом человека, так и его микробиотой, на рост симбиотрофных и сапротрофных бактерий хорошо известно. Однако о влиянии гормонов на образование и выживание клеток-персистеров как фенотипа, обеспечивающего выживание популяции при действии биоцидных доз антибиотиков, информации нет. Поэтому целью работы было изучить in vitro влияние факторов гуморальной регуляции человека - катехоламинов адреналина (A) и норадреналина (НА), а также стероидного гормона эстрадиола, на частоту образования персистеров (П) и их выживание при резкой смене условий культивирования — голодании с последующим переносом  $\Pi$  в свежую богатую среду. В настоящей работе впервые показано, что A и HA влияют на рост культур микроорганизмов, которые могут быть обитателями кожи человека — Staphylococcus aureus и S. epidermidis, а также на частоту образования антибиотикотолерантных и устойчивых к лизирующим воздействиям клеток-персистеров в зависимости от концентрации А и НА. Новая информация получена при исследовании влияния катехоламинов и эстрадиола на выживание  $\Pi$  *S. epidermidis* при резкой смене условий инкубации. При длительном (12 ч) голодании в 0.9% NaCl присутствие А и НА в физиологической (ф) (4.9 и 3.6 нМ) и более высоких — 10ф и 100ф концентрациях не влияло на выживание П, численность которых в контрольных и опытных вариантах снижалась на 2 порядка (от 108 до 106 КОЕ/мл). На стресс богатой среды, вызывающий, так называемую "ускоренную субстратом смерть клеток" A не влиял, тогда как HA во всех концентрациях вызывал переход  $\Pi$  в некультивируемое состояние с последующей их ресусцитацией — возвратом способности образовывать колонии. Эстрадиол в физиологической (0.22 нМ) концентрации также не влиял на выживание  $\Pi$  в условиях голодания, а в более высоких дозах —  $10 \oplus$  и  $100 \oplus$  защищал  $\Pi$  от стресса голодания, их численность снижалась только в 2 раза. От стресса богатой среды, напротив, защищали только высокие 10ф и 100ф концентрации эстрадиола. Получена новая информация о существенном влиянии факторов гуморальной регуляции человека на: (1) частоту образования П в культурах компонентов микробиоты человека S. aureus и S. epidermidis; (2) выживание  $\Pi$  в условиях голодания и (3) их реверсию к росту в свежей среде, то есть в условиях, которые имеют место в организме человека. Полученная информация может быть полезна при разработке медикаментозных и косметических препаратов для кожи.

**Ключевые слова:** микробиота человека, персистеры, гормоны человека, стресс, *Staphylococcus* **DOI:** 10.31857/S0026365622300061

В литературе имеется обширная информация о влиянии катехоламинов (адреналина, норадреналина и др.) как факторов гуморальной регуляции человека, синтезируемых также микроорганизмами, как сапротрофами, так и симбионтами животных и человека, на рост свободноживущих и симбиотических бактерий и дрожжей (Lyte, 2016; Олескин и соавт., 2020). Показана также стимуляция синтеза катехоламинов в ответ на

стрессорные воздействия (Lyte, 2014), к которым можно отнести стресс новой среды, возникающий при переносе стационарных микробных культур, как инокулюма, в свежую среду (Николаев, 2004; Бухарин и соавт., 2005; Bertrand, 2019). Поэтому как повышение, так и понижение концентрации катехоламинов в лаг-фазе микробной культуры закономерно влияют на ее рост. Дозозависимое действие катехоламинов на развитие

микробных популяций, их планктонный рост, адгезию и биопленкообразование показано для многих бактерий, в том числе кожных симбионтов человека *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis* (Lyte, 2003; Freestone et al., 2008; Олескин и соавт., 2020; Mart'yanov et al., 2021).

Рассматривают два возможных механизма действия нейроактивных катехоламинов на рост бактериальных культур: 1) их способность хелатировать Fe<sup>+3</sup>, делая его доступным для бактерий (Freestone et al., 2000); 2) их функционирование как аналогов аутоиндукторов QS-системы (Bansal et al., 2007; Trueba, Ritz, 2013). Их действие как "триггеров", активирующих рост и деление клеток в начальной фазе онтогенеза микробной культуры, аналогично действию некоторых других микробных ауторегуляторов (Олескин, Шендеров, 2020).

Катехоламины химически сходны с ароматическими спиртами, функционирующими как ауторегуляторы, контролирующие цитолифференцировку у бактерий (Эль-Регистан и соавт., 2006) и дрожжей (Chen, Fink, 2006). У дрожжей был выделен структурно схожий с предшественником катехоламинов ауторегулятор тирозол (Батраков и соавт., 1993; Chen et al., 2004), а у ряда бактерий – алкилоксибензолы (Осипов и соавт., 1988), относящиеся к семейству алкилрезорцинов и контролирующие образование цистоподобных покоящихся форм ( $\Pi\Phi$ ) у многих представителей прокариот и у дрожжей (Эль-Регистан и соавт., 2006). Таким образом, плейотропное действие катехоламинов в зависимости от их структуры и концентраций может не только быть причиной изменения роста микробных культур, но и влиять на цитодифференцировку микроорганизмов, сопряженную с изменением транскрипционных программ, в том числе влиять на фенотипический переход ординарных клеток в фенотип персистеров ( $\Pi$ ) (Balaban et al., 2004, 2019).

Воздействие эстрадиола на бактерии менее изучено. Есть сведения о том, что эстрадиол снижает частоту и клиническую тяжесть артрита, вызванного S. aureus у мышей (Gjertsson et al., 2012). На примере Lactobacillus crispatus, основного вида бактерий вагинальной микробиоты, было показано, что  $17\beta$ -эстрадиол (от  $10^{-6}$  до  $10^{-10}$  M) не оказывает влияния на рост L. crispatus, но заметно влияет на динамику мембран этой бактерии (Clabaut et al., 2021). Этот эффект, по-видимому, соответствует процессу сигнальной трансдукции. Для *E. coli* показано (Engelsoy et al., 2021), что эстрадиол дозозависимым образом увеличивает экспрессию адгезинов fimH и рарС и усиливает колонизацию и инвазию эпителиальных клеток мочевого пузыря человека. А также эстрадиол способен снижать летальность у червей Caenorhabditis elegans, инфицированных E. coli. Однако влияние этого гормона на персистеры бактерий никогда ранее не исследовалось.

Персистеры — это клетки малочисленной субпопуляции, образующиеся стохастически в фазе логарифмического роста бактериальной культуры (персистеры II типа) или под влиянием стрессорных воздействий, например, голодания, и сопряженных с этим клеточных событий. в стационарной фазе (персистеры I типа) (Lewis, 2010; van der Bergh et al., 2017; Balaban et al., 2019). Персистеры – это клетки: 1) не делящиеся или очень медленно делящиеся; 2) с крайне замедленным метаболизмом; 3) устойчивые к индукции автолиза: 4) выживающие в присутствии летальных доз антибиотиков (антибиотикотолерантные); 5) при переносе в свежую среду ревертирующие к вегетативному фенотипу и воспроизводящие родительскую популяцию чувствительных к антибиотиками клеток с образованием вновь малочисленной субпопуляции клеток-персистеров (Gerdt et al., 2013; van der Bergh et al., 2017; Dawson et al., 2021).

С самого начала их открытия в популяциях S. aureus, выживающих в присутствии летальных доз пенициллина (Hobby et al., 1942; Bigger, 1944), персистеры рассматриваются как причина рецидивов хронических инфекций, а в настоящее время и как базовый фенотип в развитии антибиотикорезистентности (van der Bergh et al., 2017; Levin-Reisman et al., 2018; Balaban et al., 2019; Goormaghtigh, Van Melderen, 2019; Lewis, 2020). Однако, несмотря на широкий фронт исследований в области изучения персистеров, влияние на их образование и выживание биотических факторов до сих пор остается мало исследованным. Особый интерес представляет изучение влияния факторов гуморальной регуляции человека на частоту образования персистеров I типа, которые, согласно гипотезе авторов статьи, являются предшественниками покоящихся форм, в которых прошли процессы цитодифференцировки, но не завершены процессы синтеза специфических структур форм покоя и развития анабиотического состояния (Лойко и соавт., 2015; Мулюкин и соавт., 2015). Численность персистеров I типа в стационарных культурах бактерий составляет от долей до нескольких процентов. В процессе пролонгированного культивирования бактерий основная масса стационарных клеток популяции автолизируется, и образовавшийся автолизат (клеточные останки и продукты гидролиза клеточных биополимеров) способствует образованию и необходим для поддержания жизнеспособности персистеров и их созревания в покоящиеся анабиотические формы (Бухарин и соавт., 2005; Эль-Регистан и соавт., 2006; Podlesek et al., 2016, 2020). При этом отсутствует информация о выживании персистеров в условиях полного голодания, а также о влиянии

факторов гуморальной регуляции на их выживание при резкой смене условий культивирования.

Целью настоящего исследования было изучить влияние факторов гуморальной регуляции, гормонов — нейромедиаторов адреналина и норадреналина и стероидного гормона эстрадиола, на частоту образования персистеров в культурах штаммов бактерий, являющихся представителями кожной микробиоты человека, а также на выживание персистеров в условиях голодания и их способность ревертировать к росту в полноценной среде.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и условия культивирования. Объектами исследования были штаммы видовпредставителей кожной микробиоты человека — S. aureus ATCC6538; и S. epidermidis ATCC14990.

Инокулят готовили, внося 1 петлю бактериальной массы 48-ч поверхностной культуры бактерий в 20 мл модифицированной среды RCM  $(\Gamma/\pi)$ : дрожжевой экстракт — 13; пептон — 10; глюкоза -5; NaCl -5; ацетат аммония -3), и инкубировали при перемешивании на шейкере Biosan T-104 (180 об./мин) и температуре 34°C в течение 24 ч. Среда RCM, содержащая глюкозу, использовалась для увеличения эффективности культивирования тестируемых культур, что было проверено в предварительных экспериментах. Выросшую культуру использовали как инокулят, перенося в свежую питательную среду (1 и 2 мл) в пробирках (объем 15 мл) аликвоту объемом 10 и 20 мкл. В опытных вариантах вместе с инокулятом в пробирки вносили растворы гормонов ("Merck", Германия) в физиологической (ф), 10-кратной (10ф) и 100-кратной (100ф) концентрациях. В работе исследовали воздействие растворов усредненных физиологических концентраций гормонов, характерных для биологических жидкостей человека: для адреналина  $-4.9 \times 10^{-9} \,\mathrm{M}$ ; норадреналина  $-3.6 \times 10^{-9}$  M; эстрадиола  $-0.22 \times 10^{-9}$  M. Подготовленные таким образом пробирки контрольных (без внесения гормонов, К1) и опытных вариантов переносили на шейкер и инкубировали в течение 24 ч при перемешивании (180 об./мин; 34°C).

Определение численности персистеров при их селекции антибиотиками и получение кривых отмирания. Через 24 ч инкубации бактерий (стационарная фаза) из пробирок отбирали аликвоту 10 мкл и переносили как инокулят в свежую жидкую среду RCM в пробирки Эппендорфа (2 мл) с 990 мкл среды. В опытных вариантах одновременно с инокулятом вносили раствор ципрофлоксацина до конечной бактерицидной концентрации 10 мкг/мл. В контрольных вариантах (К2) антибиотик не вносили, а в качестве инокулята использовали культу-

ры без воздействия гормонов. Культуры опытных и контрольных вариантов инкубировали в течение 6-7 ч на шейкере Biosan T-104 (180 об./мин) при температуре 34°С. Периодически из пробирок отбирали аликвоту 10 мкл, трижды отмывали клетки от антибиотика физиологическим раствором (0.9% NaCl) с центрифугированием (10 мин, 10000 g, Ерpendorf MicroSpin, "Eppendorf"), из отмытых клеток готовили серийные разведения. Учет КОЕ проводили микрометодом, высевая 5 мкл суспензии соответствующего разведения в 5-кратной повторности на агаризованную среду RCM. Результаты выражали в логарифмах численности КОЕ. Кривые отмирания клеток строили согласно (Balaban et al., 2019), где кривая отмирания соответствовала гибели ординарных клеток, а образующееся плато соответствовало численности персистеров.

Определение численности персистеров при их селекции лизирующим раствором. В другой модификации экспериментов в качестве селектирующего агента использовали лизирующий раствор (лизоцим 20000 ед., "Applichem", 400 мкг/мл; додецилсульфат натрия — 10 мкл 0.1% водного раствора, 20 мкл/мл), который вносили в 24-ч культуры контрольных и опытных (с гормонами) вариантов и инкубировали их в течение 10 ч, периодически отбирая пробы (Николаев и соавт., 2020). В отобранных пробах клетки отмывали физраствором от лизирующего раствора и готовили серийные разведения в физиологическом растворе. Посев и учет КОЕ проводили микрометодом как описано выше.

**Влияние голодания на выживание персистеров.** Культуру выращивали до стационарной фазы в течение 24 ч. Затем в культуру вносили лизирующий

раствор (лизоцим из расчета 400 мкг/мл, додецилсульфат натрия, 0.1% водного раствора, 20 мкл/мл) и инкубировали в течение 7 ч при непрерывном встряхивании и температуре 34°С. По окончании обработки интактные клетки персистеров отделяли от автолизированной массы центрифугированием и промывали физраствором (10 мин, 6000 g, Eppendorf MicoSpin, "Eppendorf"). Надосадочную жидкость сливали, а осадок персистеров ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации ~108 кл./мл. Суспензию клетокперсистеров (2 мл) переносили в пробирки, вносили гормоны (адреналин, норадреналин, эстрадиол) в соответствующих концентрациях (Ф, 10Ф и  $100\Phi$ ) и инкубировали при  $34^{\circ}$ С в течение 12 ч. После окончания инкубации клетки-персистеры снова осаждали центрифугированием, промывали физиологическим раствором, повторно осаждали и вносили 1 мл питательной среды RCM. Количество колоний, выросших из сохранивших жизнеспособность клеток-персистеров, определяли, как описано выше, отбирая пробы в течение 6 ч.

Обработка результатов. Все исследования выполнены в трех биологических повторностях по два параллельных эксперимента в каждом. При расчете титра КОЕ определяли среднее арифметическое и экспериментальную ошибку (используя функцию "среднее отклонений экспериментальных значений от среднего") из 5-7 параллельных проб с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали экспериментальную ошибку, обычно не превышающую 20%, что всегда соответствовало достоверности по критерию Стьюдента для p = 0.05. На рисунках представлены данные типичных экспериментов в виде "среднее арифметическое ± экспериментальная ошибка".

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде исследований отмечаются расхождения между лабораторными данными и клиническими определениями частоты образования персистеров патогенными бактериями (Chang et al., 2020). Неясно, какие механизмы и факторы воздействия организма хозяина вносят вклад в развитие бактериальных культур и частоту образования персистеров, их выживание и реверсию к размножению, что и обусловило формулирование цели настоящей работы — выяснить возможное влияние факторов гуморальной регуляции человека на образование персистеров и их выживание в стрессовых ситуациях.

Второй аспект возможного объяснения различий в результатах клинического и лабораторного определения численности персистеров имеет методический характер. Известны два основных метода, основанные на селектирующем действии на клетки бактериальных культур биоцидных доз антибиотиков. В предложенном группой Keren с сотрудниками (2010) способе антибиотик вносится в растущую культуру, и в периодически отбираемых аликвотах после отмывки антибиотика определяется число выживших клеток (КОЕ/мл). "Плато" (т.е. минимальный и стабильный уровень) КОЕ/мл, образующееся после гибели ординарных клеток, принимается как численность персистеров. В методе, описанном в работах (Balaban et al., 2004, 2019) и более широко применяющимся в настоящее время (Bacterial Persistence: Methods and Protocols, 2021), антибиотик вносится одновременно с аликвотой культуры (инокулята) в свежую ростовую среду, в которой нужно определить численность персистеров. Число персистеров определяется как КОЕ/мл в аликвотах, отмытых от антибиотика, на протяжении лаг-фазы культуры, в которой ординарные клетки лизируются, а персистеры сохраняют КОЕ-образующую способность.

При изучении влияния факторов гуморальной регуляции человека на частоту образования персистеров и их устойчивость к экстремальным стрессорным воздействиям использовали два метода селекции персистеров, основанных на их устойчивости к действию 1) биоцидных доз антибиотика ципрофлоксацина по методу (Balaban et al., 2019) и 2) лизирующего раствора, индуцирующего лизис ординарных клеток, как модификацию метода (Canas-Duarte et al., 2014).

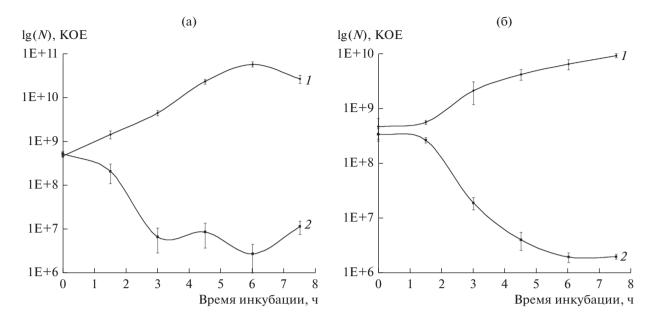
#### Сравнение методов изоляции персистеров

Приведенные на рис. 1 кривые отмирания стационарных культур S. epidermidis и S. aureus при воздействии на них раствором ципрофлоксацина биоцидной концентрации демонстрируют типичную картину снижения численности КОЕ/мл, обусловленного гибелью ординарных вегетативных клеток, с выходом на плато, сформированном сохраняющими жизнеспособность клетками-персистерами (после 3 ч для S. epidermidis и после 6 ч для *S. aureus*). Отмирание стационарных клеток начиналось после небольшого лаг-периода в обеих культурах, выход на плато наблюдался раньше у S. epidermidis. Численность персистеров в обеих культурах составляла около 0.8–1.2%. Отметим, что в стационарных культурах бактерий субпопуляция выживающих клеток (плато) формируется суммарно персистерами I и II типов, где, согласно литературным данным, основную долю составляют персистеры I типа, образующиеся в стационарной фазе роста (van der Bergh et al., 2017; Balaban et al., 2019).

При использовании в качестве селектирующего агента лизирующего раствора кривая отмирания клеток стационарных культур S. aureus (рис. 2) принципиально имела такой же характер, что и при селекции антибиотиками. Отличия состояли в более выраженном ступенчатом характере кривой отмирания клеток, где первая ступень (5-7 ч)формируется при лизисе ординарных стационарных клеток и временном выживании персистеров II типа, менее устойчивых к лизирующему раствору, чем персистеры I типа. Второе плато соответствует оставшимся жизнеспособными персистерам I типа (более 9 ч), как было описано ранее (Canas-Duarte et al., 2014). Численность оставшихся жизнеспособными персистеров, преимущественно I типа, составляла около 4%, что согласуется с результатами, полученными при селекции персистеров антибиотиком, несколько превышая их.

Влияние факторов гуморальной регуляции на рост культур стафилококков и частоту образования персистеров

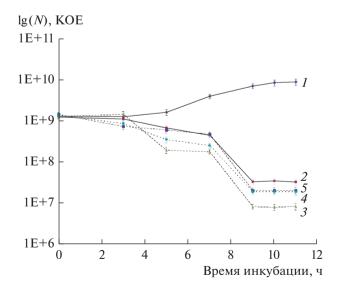
Внесение биогенных аминов – адреналина и норадреналина, вместе с инокулятом влияло на



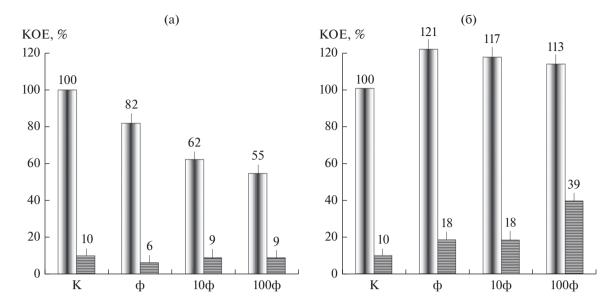
**Рис. 1.** Кривые отмирания ординарных вегетативных клеток с выходом на плато персистеров в культурах *S. epidermi-dis* (а) и *S. aureus* (б) при селектирующем действии ципрофлоксацина: *1* – контроль; *2* – ципрофлоксацин (10 мкг/мл).

развитие бактериальных культур противоположным образом (рис. 3). Адреналин дозозависимо ингибировал рост *S. epidermidis* (на 20—45% при увеличении его концентрации) по сравнению с контрольным вариантом (100%). При этом доля (%) персистеров, которую определили при их селекции лизирующим раствором относительно общей численности клеток популяции (100%) контрольного варианта, растущего без внесения адреналина, практически не менялась (рис. 3а).

Норадреналин, в отличие от адреналина, слабоположительно влиял на рост S. epidermidis, общая численность клеток в стационарных культурах возрастала на 10-20% (рис. 36). Вместе с тем, внесение норадреналина существенно сказывалось на изменении доли образовавшихся персистеров относительно общей численности клеток (100%) в контрольном варианте — без внесения НА. Доля персистеров возрастала в 2 раза в вариантах с внесением физиологической (ф) и 10-кратной (10ф) доз



**Рис. 2.** Кривые отмирания ординарных вегетативных клеток с выходом на плато персистеров в культуре *S. aureus* при селектирующем действии лизирующего раствора: *1* — контроль, рост культуры; *2* — контроль, без внесения норадреналина; *3* — внесение физиологической концентрации норадреналина; *4* и *5* — внесение 10- и 100-кратной концентрации норадреналина.



**Рис. 3.** Зависимость общей численности клеток (левый столбик) и персистеров (правый столбик) в процентах относительно численности клеток популяции в контрольном и опытных вариантах (за 100% принимается общее число клеток и персистеров контроле до и после воздействия лизирующего раствора) от концентрации адреналина (а) и норадреналина (б) в стационарных (24 ч) культурах *S. epidermidis*:  $\phi$  —  $\phi$  физиологическая концентрация;  $10\phi$  — 10-кратная;  $100\phi$  — 100-кратная.

НА и в 4 раза при внесении НА в 100-кратной (100ф) концентрациях.

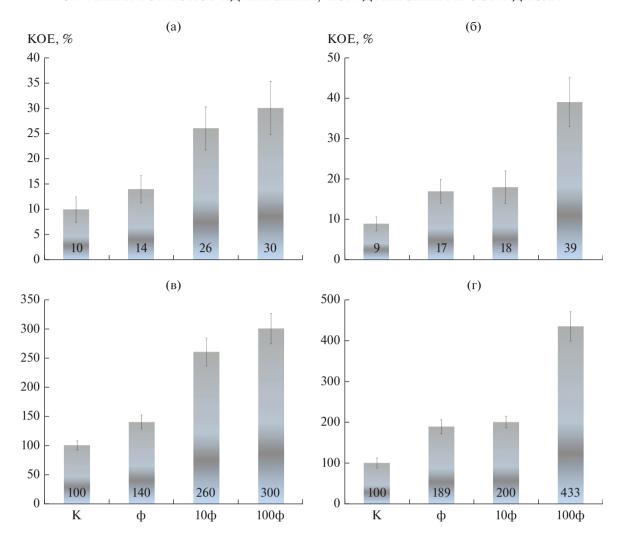
Таким образом, развитие бактериальных культур в присутствии физиологической и более высоких (10ф и 100ф) концентраций адреналина обусловливало дозозависимое ингибирование роста культур S. epidermidis при практически неизменном количестве образующихся персистеров. Норадреналин действовал противоположным образом, его присутствие во всех испытанных концентрациях практически не сказывалось на росте, но приводило к существенному дозозависимому (но не линейно) увеличению численности персистеров. То есть адреналин практически не влияет на количество персистеров в единице объема среды, тогда как в присутствии норадреналина их количество существенно возрастает. Этот показатель отражает экологическую значимость поддержания достаточной численности персистеров для выживания популяций стафилококков, обитающих на коже и слизистых человека, в условиях резко меняющихся концентраций нейромедиаторов, синтезируемых как организмом хозяина, так и его микробиомом в ответ на внешние стрессорные воздей-

Другой алгоритм расчета количества персистеров отражает частоту их образования, как их удельную долю (%), относительно общего количества клеток в популяции конкретного варианта (100%) (рис. 4), которое изменяется при росте бактерий в присутствии различных концентраций нейроме-

диаторов, что было показано выше (рис. 3). Внесение как адреналина, так и норадреналина в культуры S. epidermidis стимулировало формирование персистеров. Их удельное (%) количество увеличивалось в опытных вариантах при всех концентрациях катехоламинов в нелинейной зависимости (рис. 4а). При этом корреляции между влиянием на рост культур и образованием в них персистеров не было. Если адреналин дозозависимо ингибировал рост культур S. epidermidis (рис. 3a), то частота образования персистеров, напротив, возрастала (рис. 4а), увеличиваясь до 300% по сравнению с числом персистеров в контрольной культуре (100%) (рис. 4в). Внесение норадреналина индуцировало незначительную стимуляцию роста популяции (рис. 3б), вызывая при этом увеличение их доли (%) в опытных культурах (рис. 46), что по сравнению с контрольным вариантом составляло от 190 до 430% (рис. 4г).

Оба катехоламина стимулирующе действовали на частоту образования персистеров в культурах *S. epidermidis*.

Влияние нейроактивных аминов на развитие и образование персистеров в культурах *S. aureus* имело иной характер. Оба нейромедиатора ингибировали образование персистеров, снижая их долю (%) от общей численности клеток в культуре (рис. 5а, 5б). Их относительное содержание (%) от численности персистеров в контрольной культуре (100%) также снижалось дозозависимо при



**Рис. 4.** Численность персистеров (%) в культурах *S. epidermidis*, развивающихся в присутствие адреналина (а, в) или норадреналина (б, г) в концентрациях:  $\phi$  —  $\phi$ изиологическая концентрация;  $10\phi$  — 10-кратная;  $100\phi$  — 100-кратная. Числами показаны доли (%) персистеров относительно: а,  $\phi$  — общей численности клеток популяции в данном варианте (100%); в, г — относительно численности персистеров в контрольном варианте без внесения катехоламинов (100%).

внесении адреналина (рис. 5в) и дозонезависимо при внесении норадреналина (рис. 5г).

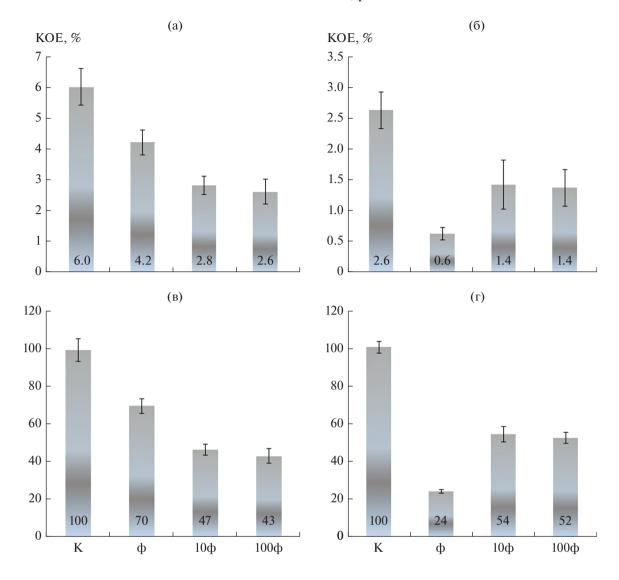
Связь эффектов катехоламинов с таксономической принадлежностью модельных бактерий отмечалась ранее. Так, норадреналин и адреналин стимулировали рост Vibrio parahaemolyticus и V. mimicus, но не V. vulnificus и V. cholerae (Nakano et al., 2007). Положительное влияние возрастающих концентраций адреналина и норадреналина на частоту образования персистеров в культурах стафилококков — контаминантов кожных покровов человека показано впервые.

Влияние факторов гуморальной регуляции на выживание персистеров в стрессовых условиях

Постановка задачи в этой серии экспериментов была обусловлена частыми колебаниями со-

держания источников питания в/на кожных покровах человека, что влияет не только на развитие популяций бактерий, контаминирующих кожу, но и на их выживание в условиях периодически наступающего голодания. Поэтому было исследовано сохранение жизнеспособности персистеров в условиях голодания (суспензия в физрастворе) без и в присутствии факторов гуморальной регуляции — адреналина, норадреналина и эстрадиола. Модельным объектом были персистеры, изолированные из стационарной культуры S. epidermidis при использовании лизирующего раствора, как описано выше, и суспендированные после отмывки в физиологическом растворе (титр КОЕ  $\sim 10^8$  кл./мл).

**Выживание персистеров при длительном (12 ч) голодании.** Длительная инкубация (12 ч) персистеров в условиях голодания (в физиологическом

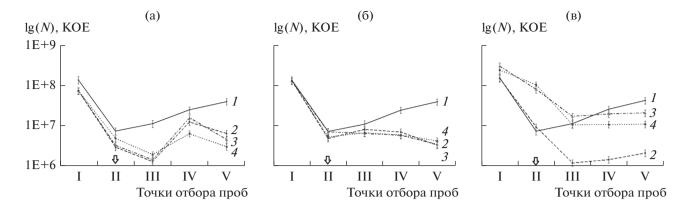


**Рис. 5.** Численность персистеров (%) в культурах *S. aureus*, развивающихся в присутствие адреналина (а, в) или норадреналина (б,  $\Gamma$ ) в концентрациях:  $\Phi$  — физиологическая концентрация;  $10\Phi - 10$ -кратная;  $100\Phi - 100$ -кратная. Числами показаны доли (%) персистеров относительно: а,  $\Phi$  — общей численности клеток в данном варианте (100%); в,  $\Gamma$  — относительно численности персистеров в контрольном варианте без внесения катехоламинов (100%).

растворе) индуцировала снижение КОЕ на 90% в контрольных вариантах (рис. 6). В опытных вариантах инкубации персистеров в присутствии адреналина и норадреналина численность КОЕ также снижалась (рис. 6а, 6б), при этом в большей степени в присутствии адреналина (рис. 6а). Иное действие на выживание персистеров в условиях голодания оказывал эстрадиол: в вариантах с 10- и 100-кратной физиологической концентрацией гормона численность КОЕ снизилась только на 30—40% от исходной, тогда как в контрольных вариантах, а также в присутствии физиологической концентрации эстрадиола — снизилась почти на 2 порядка (рис. 6в). Таким образом, снижение КОЕ-образующей способности персистеров в

условиях голодания, во-первых, отражает гетерогенность их субпопуляции по показателю устойчивости к стрессу голодания, во-вторых, на сохранение КОЕ-способности персистеров в условиях голодания нейроактивные амины практически не влияют, тогда как эстрадиол в высоких (2.2 и 22 нМ) концентрациях повышает сохранность КОЕ-образующей способности персистеров в 3—4 раза по сравнению с контролем.

Устойчивость персистеров к стрессу новой полноценной среды. После перенесения голодавших в физрастворе персистеров в свежую среду очень медленное возрастание численности КОЕ в контроле объясняется, во-первых, необходимостью перестройки молекулярно-генетических и фи-



**Рис. 6.** Динамика изменения численности персистеров (КОЕ/мл) в культурах S. *еріdегтійі*з в условиях 12 ч голодания без гормонов и в присутствии: a — адреналина; b — норадреналина; b — эстрадиола, и последующего развития в свежей полноценной среде. Точки отбора проб для определения титра КОЕ: I — исходная после ресуспендирования персистеров в физрастворе, добавление гормонов в варианты 2—4; II — после 12 ч инкубации в физрастворе c6ез гормонов добавление свежей полноценной средь RCM к отмытым персистерам; III, IV и V — через 2, 4 и 6 ч инкубации соответственно, в свежей полноценной среде. Стрелкой показана точка внесения свежей среды RCM. Варианты опыта (номера кривых): I — контроль, инкубация персистеров без внесения гормонов; 2 — инкубация в присутствии физиологической концентрации гормона; 3 — 10-кратной физиологической концентрации гормона: 4 — 100-кратной физиологической концентрации гормона.

зиологических программ клетки, и, во-вторых, отмеченной выше гетерогенностью популяции персистеров, совокупно влияющих на характер и длительность лаг-фазы (Balaban et al., 2019; Bacterial Persistence: Methods and Protocols, 2021) (рис. 6а—6в).

В опытных вариантах реакции персистеров на их перенесение в свежую среду различались и зависели от гормона, в присутствии которого они голодали. В варианте голодания в присутствии всех доз норадреналина КОЕ-образующая способность персистеров не восстанавливалась в течение всего срока наблюдений (рис. 6б), что свидетельствует о затяжной лаг-фазе как реакции персистеров на действие норадреналина.

Численность КОЕ в вариантах голодания персистеров в присутствии адреналина после их перенесения в свежую среду продолжала снижаться еще в течение 2 ч, но с меньшей скоростью, а затем резко возрастала с некоторым последующем снижением (рис. 6а). Наименьшие колебания в численности КОЕ были отмечены в вариантах голодания персистеров в присутствии 100-кратной физиологической дозы норадреналина. Если учесть, что время генерации клеток стафилококка составляет не менее 40-60 мин, то резкое увеличение численности КОЕ – на порядок за 2 ч, а также отсутствие лаг-фазы нельзя объяснить ростом и делением клеток персистеров. Скорее мы имеем дело с реверсией персистеров к росту (ресусцитацией) из жизнеспособного некультивируемого состояния, в котором они находились вследствие 1) стресса голодания и очень низкой плотности клеток, что было обнаружено (Pruzzo

et al., 2003) для ординарных вегетативных клеток патогенных бактерий, и 2) последующего стресса богатой свежей среды (Postgate, Hunter, 1963). В этом случае резкое возрастание численности КОЕ через 2 ч инкубации персистеров в свежей среде отражает их ресусцитацию, а не увеличение численности клеток (точки III—IV, рис. 6а). Переходу клеток бактерий в состояние некультивируемости в стрессовых ситуациях посвящено много исследований, однако такое состояние для персистеров в условиях их голодания и реактивации описывается впервые.

Несколько отличающееся действие на сохранение КОЕ-способности персистеров в экстремальных ситуациях оказывал эстрадиол (рис. 6в). В период голодания его высокие концентрации (10ф и 100ф) способствовали сохранению персистерами КОЕ-способности: численность образующих колонии персистеров практически не снижалась, тогда как в контрольном варианте она падала на порядок (точки I–II, рис. 6в). Однако эстрадиол во всех концентрациях не предотвращал стрессорного воздействия свежей богатой среды, которое обусловливало или гибель персистеров, так называемую "смерть, ускоренную субстратом", или их переход в некультивируемое состояние с падением численности КОЕ на 2 порядка в вариантах с физиологической (ф) концентрацией гормона. В вариантах предварительного голодания персистеров в присутствии высоких концентраций (10ф и 100ф) эстрадиола численность КОЕ-образующих персистеров снижалась на порядок (до уровня контроля) и в последующие 4 ч наблюдений не изменялась, что, по-видимому, можно рассматривать как лаг-фазу (рис. 6в).

Таким образом, действие факторов гуморальной регуляции на выживание персистеров в условиях 12 ч голодания зависело от концентраций в вариантах воздействия эстрадиолом и не зависело при воздействии катехоламинов. При этом действие гормонов в этот период, безусловно, вызывало физиологические изменения у персистеров, так как реакции персистеров, отмытых от гормонов и затем перенесенных в свежую богатую среду, кардинально различались. Норадреналин дозонезависимо препятствовал как реверсии персик росту, так и их переходу некультивируемое состояние. Адреналин, напротив, способствовал и тому, и другому процессам также дозонезависимо. Эстрадиол в высоких концентрациях обусловливал поддержание КОЕспособности персистеров в условиях голодания, но не предохранял их от стресса новой среды.

Воздействие катехоламинов на развитие бактериальных культур предположительно объясняют их функционированием как аналогов аутоиндукторов OS-системы, которые связываются с рецепторными гистидинкиназами бактерий (Rasco et al., 2008). Катехоламины могут также действовать как плотностные регуляторы, концентрации которых в развивающихся культурах контролируют смену фаз развития бактериальных культур и влияют на цитодифференцировку бактерий (Эль-Регистан и соавт., 2006). Подобное действие катехоламинов объясняет их концентрационное влияние не только на рост культур, но и на частоту образования персистеров, что показано в настоящей работе. Ранее было показано, что максимальные (мкМ) концентрации катехоламинов накапливаются в лаг-фазе роста E. coli, что стало основанием для предположения об их функционировании как "триггеров", активирующих рост и деление клеток в лаг-фазе (Шишов и соавт., 2009). В наших экспериментах отмывка персистеров от катехоламинов с последующим перенесением в богатую среду могла препятствовать их прорастанию.

Эстрадиол является стероидным гормоном, способным физико-химически связываться с гидрофобной липидной стромой цитоплазматической мембраны, обеспечивая ее повышенную стабильность в период голодания. Это объясняет сохранение жизнеспособности персистеров в вариантах с высокими концентрациями гормона (10ф и 100ф) на порядок более высокое, чем в контрольном варианте. После отмывки гормона и перенесения персистеров в богатую среду развивающийся стресс новой среды обусловливает или их частичную гибель, или переход персистеров в некультивируемое состояние. Дозозависи-

мость действия эстрадиола не противоречит этому объяснению.

В настоящей работе получена новая информация о существенном влиянии факторов гуморальной регуляции человека на 1) частоту образования персистеров в культурах стафилококков — контаминантов кожи человека, 2) выживание персистеров в условиях голодания и 3) их реверсию к росту в свежей среде.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РНФ № 19-74-10071 и, частично, Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Батраков С.Г., Эль-Регистан Г.И., Придачина Н.Н., Ненашева В.А., Козлова А.Н., Грязнова М.Н., Золотарева И.Н. Тирозол — ауторегуляторный фактор D1 Saccharomyces cerevisiae // Микробиология. 1993. Т. 62. № 4. С. 633.

Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.Н., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.

Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 512—528.

Loiko N.G., Kozlova A.N., Nikolaev Y.A., El'-Registan G.I., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V. Effect of stress on emergence of antibiotic-tolerant *Escherichia coli* cells // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 595–609.

Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Формы выживания Pseudomonas aeruginosa при антибиотической обработке // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 645—659.

Mulyukin A.L., Kozlova A.N., Sorokin V.V., El'-Registan G.I., Suzina N.E., Cherdyntseva T.A., Kotova I.B., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V. Surviving forms in antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 751–763.

*Николаев Ю.А.* Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. С. 387—397.

*Nikolaev Yu.A.* Extracellular factors of bacterial adaptation to unfavorable environmental conditions // Appl. Biochem. Microbiol. 2004. V. 40. P. 327–336.

Николаев Ю.А., Панкратов Т.А., Ганнесен А.В., Колганова Т.В., Дёмкина Е.В., Сузина Н.Е., Эль-Регистан Г.И. Образование и свойства клеток-персистеров и покоящихся клеток бактерий, обитателей кожи человека Staphylococcus capitis и Staphylococcus epidermidis // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 432—443.

Nikolaev Y.A., Pankratov T.A., Gannesen A.V., Demkina E.V., El'-Registan G.I., Kolganova T.V., Suzina N.E. Formation and properties of persister cells of Staphylococcus capitis and Staphylococcus epidermidis, bacteria inhabiting human skin // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 425–434.

Олескин А.В., Шендеров Б.А. Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2020. № 2. С. 18—28.

Осипов Г.А., Эль-Регистан Г.И., Светличный В.А. О химической природе ауторегуляторного фактора  $D_1$  Pseudomonas carboxydoflava // Микробиология. 1985. Т. 54. С. 186—190.

Osipov G.A., El-Registan G.I., Svetlichny V.A. The chemical nature of the autoregulator factor D<sub>1</sub> in *Pseudomonas carboxydoflava* // Microbiology (Moscow). 1985. V. 54. P. 186–190.

*Хохлов А.Н., Кирнос М.Д., Ванюшин Б.Ф.* Уровень метилирования ДНК и стационарное старение культивируемых клеток // Известия АН СССР. Сер. биол. 1988. № 3. С. 476—478.

Шишов В.А., Кировская Т.А., Кудрин В.С., Олескин А.В. Нейромедиаторные амины, их предшественники и продукты окисления в биомассе и супернатанте культуры *Escherichia coli* К-1 // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. С. 550—554.

Shishov V.A., Kirovskaya T.A., Oleskin A.V., Kudrin V.S. Amine neuromediators, their precursors, and oxidation products in the culture of *Escherichia coli* K-12 // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. P. 494–497.

Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 446—456.

El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Gal'chen-ko V.F., Suzina N.E., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380—389.

Bacterial Persistence: Methods and Protocols. 2nd ed. / Eds. Verstraeten N., Michiels J. Springer Science+Business Media, LL, USA, 2021. 292 p.

Balaban N., Merrin I., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch // Science. 2004. V. 305. P. 1622–1625.

Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.M., Hardt W.D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.W., Tenson T., Van Melderen L.,

Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 441–448.

Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T.K., Jayaraman A. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression // Infect. Immun. 2007. V. 75. P. 4597–4607.

https://doi.org/10.1128/IAI.00630-07

*Bertrand R.L.* Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division // J. Bacteriol. 2019. V. 201. e00697-18.

https://doi.org/10.1128/JB.00697-18

*Bigger J.W.* Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization // Lancet. 1944. V. 244. P. 497–500.

https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3

Canas-Duarte S.J., Restrepo S., Pedraza J.M. Novel protocol for persister cells isolation // PLoS One. 2014. V. 9. Iss.2. e88660.

Chang J., Lee R.E., Lee W. A pursuit of Staphylococcus aureus continues: a role of persister cells // Arch. Pharm. Res. 2020. V. 43. P. 630–638.

https://doi.org/10.1007/s12272-020-01246-x

Chen H., Fink G.R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols // Genes Dev. 2006. V. 20. P. 1150–1161.

https://doi.org/10.1101/gad.1411806

*Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G.R.* Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 5048–5052.

https://doi.org/10.1073/pnas.0401416101

Clabaut M., Suet A., Racine P.J. et al. Effect of  $17\beta$ -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain // Sci. Rep. 2021. V. 11. Art. 7133.

https://doi.org/10.1038/s41598-021-86628-x

*Dawson E., Şimşek E., Kim M.* Observing bacterial persistence at single-cell resolution // Methods Mol. Biol. 2021. V. 2357. P. 85–93.

https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1621-5\_6

Freestone P.P., Haigh R.D., Lyte M. Catecholamine inotrope resuscitation of antibiotic-damaged staphylococci and its blockade by specific receptor antagonists // J. Infect. Dis. 2008. V. 197. P. 1044–1052.

https://doi.org/10.1086/529202

Freestone P.P., Lyte M., Neal C.P., Maggs A.F., Haigh R.D., Williams P.H. The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 6091–6098.

https://doi.org/10.1128/JB.182.21.6091-6098.2000

Gjertsson I., Lagerquist M.K., Kristiansson E., Carlsten H., Lindholm C. Estradiol ameliorates arthritis and protects against systemic bone loss in *Staphylococcus aureus* infection in mice // Arthritis Res. Ther. 2012. V. 14(2). P. R76. https://doi.org/10.1186/ar3799

Goormaghtigh F., Van Melderen L. Single-cell imaging and characterization of Escherichia coli persister cells to ofloxa-

cin in exponential cultures // Sci. Adv. 2019. V. 5. eaav9462. https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9462

*Hobby G.L., Meyer K., Chaffee E.* Observations on the mechanism of action of penicillin // Exp. Biol. Med. 1942. V. 50. P. 281–285.

https://doi.org/10.3181/00379727-50-13773

Levin-Reisman I., Ronin I., Gefen O., Braniss I., Shoresh N., Balaban N.Q. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance // Science. 2017. V. 355. P. 826–830.

Lewis K. Persister cells // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. P. 357–372.

Lyte M., Freestone P.P., Neal C.P., Olson B.A., Haigh R.D., Bayston R., Williams P.H. Stimulation of Staphylococcus epidermidis growth and biofilm formation by catecholamine inotropes // Lancet. 2003. V. 361. P. 130–135. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12231-3

*Lyte M.* Microbial endocrinology: an ongoing personal journey // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. V. 874. P. 1–24. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20215-0 1

*Lyte M.* The effect of stress on microbial growth // Anim. Health Res. Rev. 2014. V. 15. P. 172–174. https://doi.org/10.1017/S146625231400019X

Mart'yanov S.V., Botchkova E.A., Plakunov V.K., Gannesen A.V. The impact of norepinephrine on mono-species and dual-species staphylococcal biofilms // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 820.

https://doi.org/10.3390/microorganisms9040820

Nakano M., Takahashi A., Sakai Y., Kawano M., Harada N., Mawatari K., Nakaya Y. Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species // Lett. Appl. Microbiol. 2007. V. 44. P. 649–653.

https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02136.x

*Podlesek Z., Žgur Bertok D.* The DNA damage inducible SOS response is a key player in the generation of bacterial persister cells and population wide tolerance // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1785.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01785

*Podlesek Z., Butala M., Šakanović A., Žgur-Bertok D.* Antibiotic induced bacterial lysis provides a reservoir of persisters // Antonie Van Leeuwenhoek. 2016. V. 109. P. 523–528. https://doi.org/10.1007/s10482-016-0657-x

*Postgate J., Hunter J.* Acceleration of bacterial death by growth substrates // Nature. 1963. V. 198. P. 273. https://doi.org/10.1038/198273a0

*Pruzzo C., Tarsi R., Lleò M.M., Signoretto C., Zampini M., Pane L., Colwell R.R., Canepari P.* Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water // Environ. Microbiol. 2003 V. 5. P. 850–858. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00498.x

Rasko D.A., Moreira C.G., Li de R., Reading N.C., Ritchie J.M., Waldor M.K., Williams N., Taussig R., Wei S., Roth M., Hughes D.T., Huntley J.F., Fina M.W., Falck J.R., Sperandio V. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development // Science. 2008. V. 321. P. 1078—1080. https://doi.org/10.1126/science.1160354

*Trueba A.F., Ritz T.* Stress, asthma, and respiratory infections: pathways involving airway immunology and microbial endocrinology // Brain Behav. Immun. 2013. V. 29. P. 11–27.

https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.09.012

*Van den Bergh B., Fauvart M., Michiels J.* Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters // FEMS Microbiol. Rev. 2017. V. 41. P. 219–251.

## Effect of Epinephrine, Norepinephrine, and Estradiol on Persister Formation in the Cultures of Staphylococci from the Human Microbiota and Their Resistance to Starvation and New Medium Stresses

T. A. Pankratov<sup>1, \*</sup>, Yu. A. Nikolaev<sup>1</sup>, A. V. Gannesen<sup>1</sup>, and G. I. El'-Registan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: tpankratov@gmail.com

Received January 2, 2022; revised January 20, 2022; accepted January 20, 2022

**Abstract**—Effects of the human hormones and human microbiota on the growth of symbiotrophic and saprotrophic bacteria is well-known. However, no information is available on the effects of hormones on formation and survival of persister cells. Persistence is a phenotype providing the survival of the population in the presence of biocidal doses of antibiotics. Hence, the aim of this work was to investige in vitro the effects of the human humoral regulation factors catecholamines (epinephrine (E) and norepinephrine (NE)) and the steroid hormone estradiol on the frequency of persisters (P) formation and their survival under abrupt changes of cultivation conditions — starvation with subsequent transfer of P into a fresh rich medium. This is the first study demonstrating E and NE to impact on the growth of microorganisms that inhabit human skin, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, as well as the frequency of formation of antibiotic-tolerant and lysing agents-resistant persister cells. The effect of E and NE depended on their concentration. New data were obtained on the effect of catecholamines and estradiol on survival of *S. epidermidis* P under drastic changes of incubation conditions. Under conditions of long-term (12 h) starvation in 0.9% NaCl, E and NE in both physiological (ph) concentrations (4.9 and 3.6 nm) and higher ones (10 ph and 100 ph) did not affect P survival; the P amounts in the control and experimental variants decreased by tow orders of magnitude (from 10<sup>8</sup>)

to 10<sup>6</sup> CFU/mL). E had no effect on the rich medium stress, and caused the so-called substrate-accelerated cell death, while NE at all the tested concentrations induced transition of P to an uncultured state with subsequent resuscitation (return of the colony-forming ability). Estradiol in the physiological concentration (0.22 nM) had no effect on P survival under starvation, while higher doses (10 ph and 100 ph) reduced starvation stress in P, and the amount of P decreased only 2 times. Higher estradiol concentrations (10 ph and 100 ph) alleviated the rich medium stress. There were obtained the data concerning the effect of human humoral regulation factors on: (1) frequency of P formation in the cultures of *S. aureus* and *S. epidermidis*; (2) P survival under starvation; and (3) their reversion to growth in fresh medium, i.e., under conditions closer to that in the human organism.

Keywords: human microbiota, persisters, human hormones, stress, Staphylococcus

## \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_\_ СТАТЬИ

# ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ УГЛЕРОДНОЙ ПРИРОДЫ С РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИЕЙ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ШТАММА ESCHERICHIA COLI K12 TGI

© 2022 г. Е. В. Сорокина<sup>а, \*</sup>, Е. А. Образцова<sup>b</sup>

<sup>а</sup>Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>b</sup>Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия \*e-mail: evsorokina77@mail.ru

> Поступила в редакцию 21.01.2022 г. После доработки 25.01.2022 г. Принята к публикации 26.01.2022 г.

Исследование взаимодействия наночастиц различной природы с биологическими объектами вызывает повышенный интерес, вызванный началом широкого применения нанообъектов в продуктах массового и промышленного потребления. Однако воздействие используемых наноматериалов на биологические системы, в том числе и на человека, полностью не изучено. Результаты, полученные в последнее время в различных лабораториях, не дают точного ответа об их безопасности. Ранее мы обнаружили, что воздействие одностенных и многостенных углеродных нанотрубок на бактериальные клетки приводит к их разрушению. Для объяснения этого эффекта в данной работе был проведен анализ воздействия на бактериальные клетки двух других видов углеродных наночастиц — из алмаза и графита. В качестве тест-системы использованы бактерии штамма Escherichia coli K12 TGI с созданным светящимся фенотипом. Было изучено влияние на эти клетки наночастиц алмаза, полученных детонационным методом, и графита, полученных методом обработки ультразвуком. На основании данных биолюминесценции и растровой электронной микроскопии показано, что данные виды наночастиц не являются токсичными для бактериальных клеток. Полученные результаты демонстрируют, что безопасность наноматериалов зависит не только от их состава, но и от внутренней структуры. Это поможет в дальнейшем разработать критерии безопасности наноматериалов и установить условия и нормы их применения.

**Ключевые слова:** наночастицы, алмаз, графит, биотестирование, биолюминесценция, индекс токсичности, бактериальный рост

**DOI:** 10.31857/S0026365622300073

В мире современных технологий появляется много новых материалов, особое место среди которых занимают наноматериалы. Среди наноструктурированных объектов можно выделить большой класс материалов, имеющих углеродную природу. Углерод является уникальным элементом — он образует достаточно много аллотропов, которые отличаются по своим свойствам кардинально (Carbon, 2006). Наиболее известными формами углерода можно назвать алмаз и графит. В алмазе каждый атом углерода связан с 4 соседями одинаковыми по длине и разделенными одинаковыми углами связями, что обеспечивает высокую стабильность кристаллов алмаза, делая его самым прочным из известных материалов (Pierson, 1994). При этом алмаз является оптически прозрачным в видимой части спектра (поглощение начинается только в ультрафиолетовой области) и является электрическим изолятором. В

графите атомы углерода объединены в слоистую структуру. В плоскости слоя каждый атом углерода связан с 3 соседними атомами, одинаковыми по длине и разделенными равными углами связями. Между слоями связь не такая сильная. В результате атомы внутри каждого слоя связаны очень сильно, обеспечивая с одной стороны прочность, а с другой стороны гибкость и упругость слоя. Слои можно разделить, не прикладывая значительных усилий. Как следствие этих структурных особенностей, электронные свойства графита также являются анизотропными. Графит поглощает свет в широком диапазоне – от далекого ИК до УФ. Одним из наиболее востребованных и перспективных так называемых "новых" углеродных материалов являются углеродные нанотрубки.

Судьба наночастиц в клетке жизненно важна для их применения, биочувствительности, доставки лекарств, подавления лекарственной устойчиво-

сти, доставки генов и анализа цитотоксичности. Чу и соавт. (Chu et al., 2014) показали, что морфология наночастиц определяет их клеточную судьбу. Наночастицы с острыми формами, независимо от их химического состава и размера могут проникать через мембраны эндосом, которые переносят их в клетки, и попадать в цитоплазму, что, в свою очередь, значительно снижает скорость выделения наночастиц из клеток. Такие особенности наночастиц острой формы необходимы для доставки лекарств, доставки генов, субклеточного таргетирования и долгосрочного отслеживания в клетках (Chu et al., 2014).

Ранее было исследовано влияние наноструктур на бактериальные клетки и сделан вывод, что нанотрубки могут механически нарушать клеточную стенку и вызывать гибель бактерий (Образцова и соавт., 2009, Зарубина и соавт., 2009, 2011). Эти данные подтверждаются результатами исследований других групп (Максимова, 2019).

Чтобы более детально разобраться в механизмах взаимодействия углеродных наноструктур с живыми клетками в этой работе мы проанализировали воздействие наночастиц из алмаза и графита на ту же тест-систему. Эти наноструктуры и сами по себе все шире применяются в высокотехнологичных продуктах и даже в предметах повседневного быта, поэтому оценка их безопасности вызывает повышенный интерес (Schrand et al., 2007; Zhang et al., 2012, Zhao et al., 2020).

В настоящее время алмазные частицы нанометрового размера предлагают применять как маркеры для мониторинга различных биомедицинских образцов (Torelli et al., 2019).

Люминесценция (интенсивность и длина волны) наночастиц алмаза чувствительна к изменению электрических, магнитных полей, температуры (Wu et al., 2016). Это позволяет локально детектировать изменение этих параметров, например, в клетке или для отдельных молекул, нанесенных на подложку. Кроме того, интерес к наноалмазу, как носителю биологически активных веществ, в том числе лекарственных, возрастает с каждым годом (Perevedentseva et al., 2021).

Предложено применять наноалмазы для создания износостойких покрытий хирургических инструментов, элементов космических аппаратов (Nistor, May, 2017). В повседневной жизни наночастицы алмаза можно встретить в материалах для шлифования, полировки, в качестве армирующих добавок в сверлах, пилах, бурах и других инструментах. С такими частицами встречается практически каждый человек.

Графитные наноструктуры представляют собой плоские частицы, состоящие из одного (графена) или нескольких слоев атомов. Нано- и микрочастицы графита применяются в смазочных материалах, для создания проводящих покрытий в качестве до-

бавки, улучшающей проводимость различных изделий, в качестве поглощающего покрытия (например, на деталях антенн, детекторов) (Pete, 1996; Camargo et al., 2021). Из графита также изготавливают прочные волокна, которые сейчас применяются даже в спортивном инвентаре, предметах одежды, кухонной утвари и т.д. (Meng et al., 2018). Графитовый порошок добавляют в резины, бетоны, асфальты и т.д. для улучшения механических свойств (Dimov et al., 2018). Таким образом, даже обычный человек сталкивается с этими частицами повсеместно.

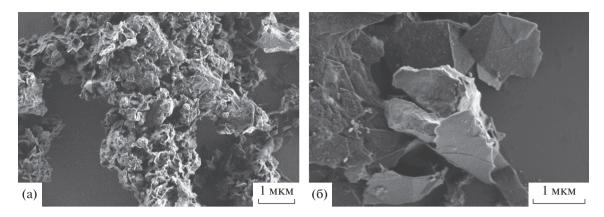
Стремительное развитие нанотехнологий в биологии, медицине и промышленности вызывает необходимость разработки методов оценки рисков использования наночастиц и наноматериалов. В этой связи целью данной работы является сравнительный анализ отмеченных выше углеродных наноматериалов и оценка их биотоксичности на примере штамма *Escherichia coli*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе рассмотрено воздействие двух типов углеродных наноструктур на бактериальные клетки – это наночастицы графита и алмаза. В качестве наночастиц алмаза были использованы порошки ультрадисперсного алмаза типа УДС-С, полученного детонационным методом (ФНЦП "Алтай", Бийск). По данным производителя образцы состоят из агломерированных частиц алмаза размером 4—5 нм и содержат не более 15% неалмазных примесей. Типичное изображение такого образца представлено на рис. 1а. Ранее такие порошки были подробно исследованы (Аполонская и соавт., 2009). Наночастицы графита были получены из кристаллов высокоориентированного пиролитического графита с помощью обработки ультразвуком аналогично (Pavlova et al., 2016), но без использования каких-либо поверхностно-активных веществ для исключения влияния этих веществ на бактериальные клетки.

Отказ от использования поверхностно-активных веществ приводил к снижению стабильности суспензий в долгосрочной перспективе, но на временах проведения экспериментов характеристики образцов можно считать постоянными. Характерное изображение полученного материала представлено на рис. 16. Видно, что полученный материал состоит из плоских частиц графита, состоящих из малого числа слоев и имеющих латеральные размеры от десятков нанометров до нескольких микрон.

Для проведения экспериментов были использованы суспензии этих двух видов наночастиц в дистиллированной воде в концентрациях 160.0 мкг/мл. Непосредственно перед проведением экспери-



**Рис. 1.** Изображения, полученные с помощью растровой электронной микроскопии образцов наночастиц алмаза (а) и графита (б).

ментов суспензии наночастиц дополнительно обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин.

Одним из удобных и доступных методов первичной интегральной оценки действия физических факторов, различных химических веществ и их смесей, объектов окружающей среды (воды, почв, воздуха), а также и в научных исследованиях являются широко используемые тест-системы на основе бактериальной люминесценции. В данной работе мы использовали штамм бактерии Escherichia coli K12 TGI с созданным светящимся фенотипом. В анализах использовали нативные клетки ночной культуры биотеста, бактерии штамма E. coli K12 TGI с созданным светящимся фенотипом при клонировании lux-оперона из светящихся почвенных бактерий Photorhabdus luminescencens ZMI. Штамм получен и хранится на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, известен как биосенсор тест-системы "Эколюм-06". Нативные клетки концентрировали центрифугированием при 6000 g в течение 15 мин. Клетки суспендировали в дистиллированной воде. Исследуемые образцы состояли из суспензии бактерий  $2.6 \times 10^8$  кл./мл. Такие пробы инкубировали с наночастицами 48 ч, далее крупные углеродные частицы осаждали при 6000 g в течение 1 мин. Для анализа показателей индекса токсичности (биологической активности) в пробирки объемом 1.5 мл вносили по 900 мкл надосадочной жидкости каждого образца клеток. Контрольные образцы были без наночастиц, состояли из нативных клеток и дистиллированной воды.

В эксперименте также использовали и лиофильно высушенные клетки биосенсора, которые регидратировали холодной дистиллированной водой в течение 30 мин и использовали водные суспензии клеток  $2.3-2.7 \times 10^7$  кл./мл. Ранее исходный биосенсор был охарактеризован нами с помощью

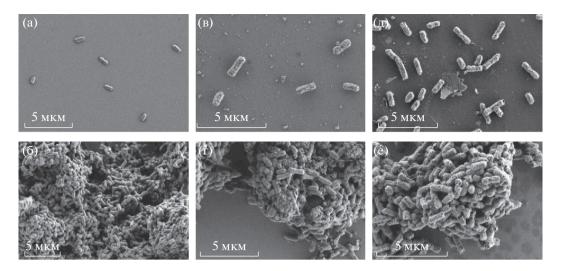
атомно-силовой микроскопии (Образцова и соавт., 2009; Зарубина и соавт., 2009, 2011).

Плотность бактериальных суспензий определяли нефелометрически ( $\lambda = 670$  нм) на фотоэлектроколориметре KF77 и выражали числом клеток в 1 мл по калибровочной кривой.

К клеткам *E. coli* (500 мкл), провзаимодействовавших с наночастицами, добавляли среду LB (500 мкл) и регистрировали изменения роста по плотности бактериальной суспензии, которую определяли при длине волны 560 нм на МФУ Clariostar BMG в культуральных планшетах и выражали в % относительно контроля. Оптическая плотность (ОП) позволила оценить суммарное накопление бактериальной биомассы, включая живые и мертвые, метаболически активные и неактивные, активно растущие и покоящиеся клетки.

Интенсивность свечения бактерий (имп./с) контрольного и опытного образцов регистрировали одновременно с помощью люминометра Биотос-6 при комнатной температуре 20-22°C при экспозиции биосенсора с исследуемыми образцами во времени от 5 мин до 48 ч. Оценивали токсичность исследуемых веществ по снижению интенсивности люминесценции клеток биосенсора. Индекс токсичности (Т) образцов определялся автоматически по формуле:  $T = 100 \times (I_K - I)/I_K$ , где Ік и I — интенсивность свечения контрольного и опытного образцов соответственно. Оценку токсичности классифицировали по трем группам: значение T < 20 — образец нетоксичен; значение T > 20, но <50 — образец токсичен; значение T > 50 — образец очень токсичен (Образцова и соавт., 2009; Зарубина и соавт., 2009, 2011).

Иногда при действии малых концентраций веществ наблюдается стимуляция свечения тесторганизма (Т с отрицательным знаком). Анализ осуществляли при фиксированном времени экспозиции каждого контрольного и опытного об-



**Рис. 2.** Изображения, полученные с помощью растровой электронной микроскопии образцов бактериального биосенсора через 3 ч (a, b, g) и через 2 сут (b, r, e) после начала эксперимента; a, b-1 контрольные образцы; b, b-1 контрольные образцы с наночастицами алмаза; b, b-1 контрольные образцы с наночастицами графита.

разца, одновременно регистрируя их интенсивность люминесценции в трех повторностях.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась стандартными методами с использованием критерия Стьюдента при уровне значимости ( $\alpha=0.1$ ) для проверки гипотезы о значимости различий полученных данных.

Анализ осуществляли при фиксированном времени экспозиции каждого контрольного и опытного образца, одновременно регистрируя их интенсивность люминесценции; погрешность измерений составила не более 5%.

Исследование морфологии клеток бактериального биотеста с созданным светящимся фенотипом до и после взаимодействия с углеродными наночастицами было проведено методом сканирующей электронной микроскопии с помощью микроскопа Zeiss Merlin ("Zeiss", Германия). Для проведения измерений бактериальные клетки наносили на чистые кремниевые подложки. Для фиксации и дегидратации образцов был использован протокол, описанный в работе (Grafskaia et al., 2020). Клетки фиксировали глутаровым альдегидом в течение 12 ч при 4°C. Затем образцы были обезвожены путем постепенного увеличения процентного содержания этанола в растворе (10, 30, 50, 70, 90% с инкубацией 10 мин в каждом растворе). Далее образцы были инкубированы в растворе гексаметилдисилазана в этаноле (1:1) в течение 10 мин и в 100% гексаметилсилазане до полного высыхания. Таким образом, форма бактериальных клеток была сохранена и не повреждалась во время проведения измерений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано действие наночастиц графита и алмаза на нативных клетках *E. coli* с lux-опероном и на биосенсоре "Эколюм-06" по нескольким показателям, в частности, по индексу токсичности (изменению биолюминесценции), выживаемости и по морфологии (методом растровой электронной микроскопии) клеток бактерий.

Регистрируя изменения люминесценции при воздействии различных наноматериалов, мы провели оценку их токсичности. В отличие от наблюдаемого нами ранее разрушающего действия углеродных нанотрубок на клетки биосенсора "Эколюм-06" (Образцова и соавт., 2009; Зарубина и соавт., 2009, 2011), в настоящей работе бактерии, имеющие прямой контакт и с алмазными и графитными наночастицами, сохраняли характерную для данного вида бактерий морфологию (рис. 2). Наблюдения проводили в течение 7 дней. Как видно из изображений, представленных на рис. 2, на протяжении этого периода морфологических изменений бактерий не происходило даже при непосредственном контакте клеток  $E.\ coli\ c$  наночастицами графита и алмаза. Это позволяет нам заключить, что, в отличие от случая взаимодействия с углеродными нанотрубками, клеточная стенка и мембрана бактерий остаются целостными, и клетки более устойчивы к механическому воздействию этих частиц.

Отсутствие негативных изменений в структурах бактериальных клеток было также подтверждено с помощью наблюдения за изменениями интенсивности биолюминесценции и по выживаемости клеток.

Известно, что биотестирование на основе бактериальной люминесценции является экспресс-

ным (30 мин) методом первичной интегральной оценки токсичности. Для выявления токсичности различных наночастиц время экспозиции может быть выбрано индивидуально. Исследования с генно-инженерным биотестом с созданным светящимся фенотипом позволяет использовать его для изучения токсического действия наночастиц на активность люминесценции и других свойств в течение многих суток, в отличие от известных биотестов на основе природных светящихся бактерий (Зарубина, Сорокина, 2017).

Индексы токсичности наночастиц алмаза и графита во времени представлены в табл. 1. Инкубация клеток биосенсора с наночастицами в концентрациях до 160 мкг/мл вызывала даже небольшой стимулирующий эффект.

Анализируя концентрации исследуемых наночастиц на их биологическую активность, можно выделить зоны концентраций, где каждый вид наночастиц был нетоксичен, токсичен или очень токсичен. Частицы алмаза и графита в диапазоне концентраций до 160 мкг/мл были нетоксичны, индекс токсичности регистрировали при значениях  $T \sim -28$  и -21 соответственно. Многие авторы принимают показатели стимуляции люминесценции биотеста, считая их нетоксичными (Дерябин, 2009). Некоторые авторы связывают стимуляцию люминесценции светящихся бактерий с механизмом действия веществ высокой липофильности, в то время как гидрофильные вещества преимущественно вызывают эффект тушения люминесценции. При этом стимуляция и ингибирование свечения бактерий является показателем проявления биологической активности (Зарубина, Сорокина, 2015, 2017).

На сегодняшний день используются различные подходы для оценки токсичности веществ, негативное действие которых может проявляться отдаленно во времени; эти вещества способны нарушать метаболические процессы, протекающие в клетке, и могут оказывать влияние на репродукцию клеток. В нашей работе мы также проанализировали прирост биомассы E. coli на среде LB (см. раздел "Материалы и методы исследования") с помощью мониторинга ОП при 560 нм (рис. 3) и дополнительно регистрировали показатель КОЕ. Исследование кривой роста бактерий после инкубации с наночастицами позволило оценить истинное значение токсичности и биологическую активность исследуемых веществ. На рис. 3 представлен полученный в эксперименте по инкубации бактерий с графитом и с алмазом в течение 24 ч график зависимости ОП от времени. Из рисунка видно, что рост клеток в присутствии наночастиц алмаза оставался на том же уровне, что и в контроле, и не зависел от концентрации наночастиц. Оптическая плотность суспензии после обработки клеток наночастицами алмаза

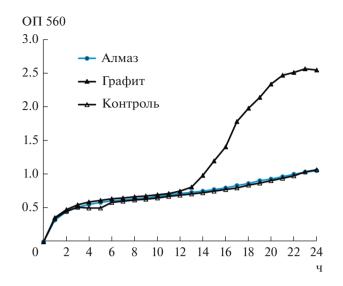
**Таблица 1.** Эффективность действия (по индексу токсичности Т) образцов наночастиц алмаза и графита, определяемая методом биотестирования на основе тюминесценции

| Время                                  | Индекс токсичности (Т)  |                          |  |
|--|-------------------------|--------------------------|--|
| экспозиции биотеста с наночастицами, ч | алмазные<br>наночастицы | графитные<br>наночастицы |  |
| 1                                      | $-28 \pm 2$             | $-21 \pm 1$              |  |
| 24                                     | $-17 \pm 1$             | $3\pm1$                  |  |
| 48                                     | $-9 \pm 1$              | $18 \pm 2$               |  |

возросла максимально на 3%. На основании полученных нами данных можно сделать вывод, что наночастицы алмаза в исследованных концентрациях не оказывали влияния на клеточное деление. Однако частицы графита значительно стимулировали рост оптической плотности, и к 20 ч культивирования клеток наблюдался значительный прирост биомассы в 2.5 раза. Ростовые характеристики изменялись после инкубации с наночастицами графита, стимулируя рост и по плотности, и по КОЕ. Считается, что в зависимости от концентрации наночастиц, у микроорганизмов могут активироваться адаптационные механизмы регуляции на уровне генома, в результате которых бактерии приобретают устойчивость, что повышает их выживаемость в условиях стресса (Зарубина и соавт., 2017). Мы установили, что исследуемые наночастицы графита и алмаза при концентрации 160 мкг/мл обладают слабовыраженной токсичностью.

Таким образом, использованный нами метод на основе бактериальной люминесценции показал различия в действии ранее изученных углеродных нанотрубок, которые были токсичны, и новых наночастиц на основе алмаза и графита. Алмазные и графитные наночастицы в водных суспензиях в изученном диапазоне концентрации оказались безопасными и нетоксичными.

В рамках данной работы установлено, что инкубация наночастиц алмаза и графита в течение 24 ч с клетками биосенсора и с нативными клетками *E. coli* не оказывала на них повреждающего действия, в отличие от углеродных нанотрубок. Полученные результаты интересны как для дальнейших исследований воздействия данных наноматериалов на живые клетки, так и их применения, например, в медицине. Методы биотестирования на основе светящихся микроорганизмов дают полезную информацию о выборе подходящих и безопасных типов наночастиц, их размеров и свойств поверхности, что позволяет свести к минимуму их токсичность и подобрать те концентрации, которые безопасны для исследованных нами микроорганизмов биотеста "Эколюм-06", который, как показано многочисленными исследованиями, кор-



**Рис. 3.** Оптическая плотность при 560 нм в суспензиях клеток биосенсора, выращенных с наночастицами алмаза и графита относительно контроля без наночастиц.

релирует с ответной реакцией высших организмов, оцененной по  $LD_{50}$  (Danilov et al., 2002).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают особую благодарность А.П. Зарубиной за содействие в проведении данного исследования и за ценные советы.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аполонская И.А., Тюрнина А.В., Копылов П.Г., Образцов А.Н. Термическое окисление детонационного наноалмаза // Вестн. Московского ун-та. Серия 3: Физика. Астрономия. 2009. Т. 64. № 4. С. 72—75.

Ароlonskaya І.А., Туитіпа А.V., Коруlov Р.G., Obraztsov А.N. Thermal oxidation of detonation nanodiamond // Moscow University Physics Bulletin. 2009. V. 64. № 4. С. 433—436. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьева Л.Н., Карташев Ф.В., Завильгельский Г.Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе luxоперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестн. Московского ун-та. Серия Биология. 2002. Т. 57. № 3. С. 20—24.

Danilov V.S., Zarubina A.P., Eroshnicov G.E., Solov'eva L.N., Kartashev F.V., Zavil'gelsky G.B. The biolumiscent sensor

systems with lux-operons from various species of luminescent bacteria // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2002, V. 57. № 3. P. 20–24.

Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. 246 с.

Зарубина А.П., Лукашов Е.П., Деев Л.И., Пархоменко И.М., Рубин А.Б. Биотестирование биологических эффектов одностенных углеродных нанотрубок с использованием тест-системы люминесцентных бактерий // Российские нанотехнологии. 2009. Т. 4. № 11—12. С. 152—155.

Зарубина А.П., Лукашов Е.П., Деев Л.И., Пархоменко И.М., Образцова Е.А., Новоселова Л.А., Рубин А.Б. Оценка рисков токсичности углеродных наноматериалов // Нано- и микросистемная техника. 2011. № 10. С. 21—26.

Зарубина А.П., Сорокина Е.В. Первый среди равных. Один из самых экспрессных и доступных методов биотестирования — биолюминесцентный тест // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). Биологические науки. 2015. Т. 17. № 8. С. 161—163.

Зарубина А.П. Сорокина Е.В. Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 6. С. 613—620.

Зарубина А.П., Сорокина Е.В., Пархоменко И.М., Гапочка М.Г. Действие нейромедиаторов в условиях искусственного электромагнитного загрязнения среды // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. № 6. С. 20—30.

Образцова Е.А., Лукашев Е.П., Зарубина А.П., Пархоменко И.М., Яминский И.В. Бактерицидное действие одностенных углеродных нанотрубок // Вестн. Московского ун-та. Серия 3: Физика. Астрономия. 2009. № 3. С. 81-84.

*Obraztsova E.A., Lukashev E.P., Zarubina A.P., Parkhomen-ko I.M., Yaminsky I.V.* Bactericidal action of single-walled carbon nanotubes // Bulletin of Moscow University. Series 3: Physics, Astronomy. 2009. № 3. P. 81—84.

Camargo J.R., Orzari L.O., Araújo D.A.G., Oliveira P.R., Kalinke C., Rocha D.P., Santos A.L., Takeuchi R.M., Munoz R.A.A., Bonacin J.A, Janegitz B.C. Development of conductive inks for electrochemical sensors and biosensors // Microchem. J. 2021. V. 164. P. 105998.

Carbon. The Future Material for Advanced Technology Applications / Eds. Messina G., Santangelo S. Berlin—Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. 551 p.

Chu Z., Zhang S., Zhang B., Zhang C., Fang C.Y., Rehor I., Cigler P., Chang H.C., Lin G., Liu R., Li Q. Unambiguous observation of shape effects on cellular fate of nanoparticles // Sci. Rep. 2014. V. 28. P. 4495.

https://doi.org/10.1038/srep04495

Dimov D., Amit I., Gorrie O., Barnes M.D., Townsend N.J., Neves A.I.S., Withers F., Russo S., Craciun M.F. Ultrahigh performance nanoengineered graphene-concrete composites for multifunctional applications // Adv. Funct. Mater. 2018. V. 28. P. 1705183.

Grafskaia E., Pavlova E., Babenko V.V., Latsis I., Malakhova M., Lavrenova V., Bashkirov P., Belousov D., Klinov D., Lazarev V. The Hirudo medicinalis microbiome is a source of new antimicrobial peptides // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 7141.

Meng F., Wang H., Huang F., Guo Y., Wang Z., Hui D., Zhou Z. Graphene-based microwave absorbing composites: a review

and prospective // Composites. Part B. 2018. V. 137. P. 260–277.

*Nistor P.A., May P.W.* Diamond thin films: giving medical applications new shine // J. Royal Soc. Interface. 2017. V. 14. P. 1–15.

Pavlova A.S., Obraztsova E.A., Belkin A.V., Monat C., Rojo-Romeo P., Obraztsova E.D. Liquid-phase exfoliation of flaky graphite // J. Nanophotonics. 2016. V. 10. P. 012525.

Perevedentseva E., Lin Y., Cheng C. A review of recent advances in nanodiamond-mediated drug delivery in cancer // Expert Opin. Drug Deliv. 2021. V. 18. P. 369—382.

Pete Scala E. A brief history of composites in the U.S. – the dream and the success // J. Minerals. 1996. V. 48. P. 45–48.

*Pierson H.O.* Handbook of Carbon, Graphite, Diamond and Fullerenes. Properties, Processing and Applications. Elsevier Inc., 1994. 400 p.

Schrand A.M., Huang H., Carlson C., Schlager J.J., Osawa E., Hussain S.M., Dai L. Are diamond nanoparticles cytotoxic // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. P. 2–7.

*Torelli M.D., Nunn N.A., Shenderova O.A.* A perspective on fluorescent nanodiamond bioimaging // Small. 2019. V. 15. e1902151.

*Wu Y., Jelezko F., Plenio M., Weil T.* Diamond quantum devices in biology // Angew. Chem. Int. Edn. 2016. V. 55. P. 6586–6598.

Zhang X., Hu W., Li J., Taob L., Weib Y. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond // Toxicol. Res. 2012. V. 1. P. 62.

https://doi.org/10.1039/C2TX20006F

Zhao J., Lin M., Wang Z., Cao X., Xing B. Engineered nanomaterials in the environment: Are they safe? // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 2020. P. 1443—1478. Published online.

https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1764279

## Effect of Carbon Nanoparticles with Different Structural Organization on the Biological Systems of *Escherichia coli* K12 TGI

E. V. Sorokina<sup>1, \*</sup> and E. A. Obraztsova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia
<sup>2</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia
\*e-mail: evsorokina77@mail.ru

Received January 21, 2022; revised January 25, 2022; accepted January 26, 2022

**Abstract**—Due to onset of large-scale industrial and household application of nanoobjects, research on the interaction between nanoparticles of various nature and biological objects is presently of great interest, caused by the beginning of the widespread use of nanoobjects in mass and industrial products. However, the impact of the nanomaterials on biological systems, including humans, has not been fully studied. The results obtained recently in various laboratories do not give an accurate answer about their safety. Previously, we found that the impact of single-walled and multi-walled carbon nanotubes on bacterial cells resulted in their decay. To explain this effect, in this work we analyzed the effect of two other types of carbon nanoparticles, diamond and graphite, on bacterial cells. The cells of *Escherichia coli* strain K12 TGI with the engineered luminous phenotype were used as a test system. The effect on these cells of diamond nanoparticles obtained by the detonation method and of graphite nanoparticles obtained by sonication was studied. Based on bioluminescence and scanning electron microscopy data, it was shown that these types of nanoparticles were not toxic to bacterial cells. Our results demonstrate that the safety of nanomaterials depends not only on their composition, but also on their internal structure. This will help in the future to determine which nanomaterials are safe and when, and for unsafe ones, the conditions and norms for their use will have to be established.

Keywords: nanoparticles, diamond, graphite, biotesting, bioluminescence, toxicity index, bacterial growth

## \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

# БИОДЕГРАДАЦИЯ АЗОКРАСИТЕЛЯ МЕТНҮL RED МЕТАНОГЕННЫМИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ РЕКИ ВОЛГА<sup>1</sup>

© 2022 г. Ю. В. Тактарова<sup>а, \*</sup>, Л. И. Ширинкина<sup>а</sup>, А. С. Будённая<sup>а</sup>, М. А. Гладченко<sup>а</sup>, И. Б. Котова<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия \*e-mail: yvtaktarova@gmail.com

Поступила в редакцию 21.01.2022 г. После доработки 25.01.2022 г. Принята к публикации 26.01.2022 г.

Азокрасители – растворимые, стабильные в окислительных условиях ксенобиотики, которые повсеместно используются в человеческой практике, содержатся в жидких и твердых производственных и бытовых отходах и регулярно попадают в окружающую среду. В работе исследовали возможность деструкции технического азокрасителя Methyl Red (MR) анаэробными микробными сообществами, выделенными из донных отложений реки Волга, и их состояние при контакте с данным ксенобиотиком. Впервые показана способность таких неадаптированных к азокрасителю сообществ к деградации MR с образованием устойчивого N, N-диметил-n-фенилендиамина и биоразлагаемой 2-аминобензойной кислоты. Сравнение активности метаногенеза в сообществах без и с MR показало снижение образования биогаза на 43.80%, что свидетельствует о токсическом действии MR (и, возможно, ароматических интермедиатов его разложения) на микроорганизмы. С помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК показаны значительные изменения в структурно-функциональной организации метаногенного сообщества в присутствии МК и смена доминирующих групп. Так, представительство бактерий сем. Geobacteriaceae в сообществе с MR увеличилось почти в 5 раз, а сем. Clostridiaceae — снизилось в 3 раза, причем доминирующим стал род Proteiniclasticum. При добавлении MR представители сем. Methanobacteriaceae, Methanofastidiosaceae, Methanoregulaceae, Methanosaetaceae, Methanomassillicoccaceae, составляющие в исходном сообществе суммарно 33.32% от общего числа архей, обнаружены не были. Увеличение в сообществе с MR доли микроорганизмов сем. Desulfovibrionaceae, Desulfosarcinaceae и Gallionellaceae предположительно связано с их возможным участием в разрушении MR, так как в метаногенных сообществах они обычно выступают в качестве синтрофов. Подтверждено, что для обесцвечивания МR необходимо присутствие живых клеток, адсорбция является только его начальной стадией, а влияние химического восстановления азосвязи минимально. Наша первичная лабораторная модель показывает, что естественные сообщества потенциально способны разрушить MR, но и азокраситель оказывает значительное воздействие на их структуру.

**Ключевые слова:** биодеградация, азокрасители, анаэробные микробные сообщества, метаногенез **DOI:** 10.31857/S0026365622300085

В настоящее время во всем мире отмечается интенсивное загрязнение биосферы устойчивыми синтетическими соединениями — ксенобиотиками, присутствующими практически во всех объектах и материалах, созданных человеком. Азокрасители относятся к растворимым ксенобиотикам, широко применяемым в лакокрасочной, нефтехимической, текстильной, типографской, фармацевтической и пищевой отраслях (Rawat et al., 2016) и регулярно попадающим в

сточные воды и твердые отходы данных произ-

водств. Значительное присутствие в окружающей среде показывают также ароматические амины, которые используются как самостоятельные вещества или образуются как интермедиаты разложения азокрасителей. Отказаться одномоментно от этих соединений невозможно, поэтому становятся актуальными исследования возможности их микробной деструкции, а также их воздействия на естественные и антропогенные экосистемы. Также малоизученным представляется вопрос об отдаленных последствиях постоянного

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622300085 для авторизованных пользователей.

присутствия азокрасителей и ароматических аминов в природе даже в малых концентрациях.

Азокрасители активно используются из-за простоты синтеза, высокой стабильности, устойчивости к окислению и облучению, а также способности окрашивать разнообразные материалы. Их молекулы содержат азогруппы (—N=N—), связывающие бензольные или нафталиновые кольца (Гордон, Грегори, 1987). Для их удаления из сточных вод применяют физико-химические (адсорбция, осаждение, химическое окисление и восстановление, фото- и электрохимическое разложение) и биологические методы (Линькова и соавт., 2011). Однако остается актуальной задача поиска микробных сообществ, способных осуществлять биодеградацию этих соединений с образованием безопасных продуктов.

В природе микробные сообщества являются деструкторами сложных органических веществ, способствуя самоочищению экосистем. При этом сложное соединение может изменяться незначительно (трансформироваться), распадаться на менее сложные части (фрагментироваться) или превращаться в простые неорганические вещества и метан, т.е. претерпевать полную минерализацию. Ксенобиотики попадают не только в аэрируемую зону водоема, но и в донные отложения, где создаются микроаэрофильные и анаэробные условия. Тогда в конверсии ксенобиотиков участвуют факультативно и облигатно анаэробные микроорганизмы (денитрификаторы, сульфат- и металлоредукторы, метаногены) (Хоменков и соавт., 2008). При окислении одинакового донора электронов выход энергии в электронтранспортной цепи зависит от окислительно-восстановительного потенциала использованного акцептора, который убывает в ряду "кислород—нитрат—желе-зо—сульфат—карбонат". Однако карбонатное дыхание с образованием метана не нуждается в дополнительных экзогенных акцепторах электронов, поскольку углекислый газ образуется повсеместно. Конечный продукт метан может быть использован как энергоресурс.

Разложение азокрасителей состоит из двух этапов — разрыва азосвязей (обесцвечивания) и деградации образовавшихся бесцветных ароматических аминов. В анаэробных условиях обесцвечивание происходит за счет четырехэлектронного восстановления азосвязи. Считается, что эта реакция может приводить к неспецифической детоксикации, так как часто интермедиаты менее токсичны, чем исходные азокрасители (Razo-Flores et al., 1997). Обесцвечивание может происходить как внутри, так и вне клеток различными путями. Ферментативное восстановление может происходить под действием специфичных или неспецифичных азоредуктаз (Stolz, 2001), либо как побочная реакция, катализируемая фермента-

ми с другими функциями. Однако многие азокрасители — это молекулы с большой молекулярной массой, диссоциирующие в растворе, поэтому их проникновение в клетку затруднено. Непрямое биологическое восстановление азосвязей возможно с помощью окислительно-восстановительных медиаторов (НАДН, НАДФН, ФАД и др.) в бескислородных условиях. Их молекулы могут восстанавливаться за счет мембранных ферментов, а некоторое количество внутриклеточных медиаторов может попадать в среду при лизисе клеток.

Прямое и непрямое химическое восстановление азосвязей может происходить за счет восстановленных форм органических и неорганических соединений (часто это цистеин, сульфид, Fe<sup>2+</sup>), присутствующих в среде как химические соединения, либо произведенные за счет метаболизма культивируемых в этой среде микроорганизмов. В первом случае восстановитель непосредственно вступает в химическую реакцию с азокрасителем, а во втором — эта реакция опосредуется транспортом электронов от восстановителя по электрон-транспортной цепи клетки к азокрасителю как акцептору (Stolz, 2001).

При разрыве азосвязи образуются разнообразные аминоароматические интермедиаты, которые в присутствии кислорода подвергаются автополимеризации, поэтому, несмотря на более длинный путь анаэробной конверсии, она является более эффективной для их полной минерализации. В анаэробных условиях наиболее часто периферические метаболические пути приводят к образованию бензоил-КоА, который далее дециклизуется специфической мультисубъединичной АТФ-зависимой редуктазой. Наличие заместителей и химическая стабильность бензольного кольца значительно затрудняет полную минерализацию аминоароматических соединений (Хоменков и соавт., 2008).

Способность к разрушению аминоароматики выявлена у многих нитрат-, сульфат- и железоредукторов (Johann, Georg, 1997; Савельева и соавт., 2002; Savelieva et al., 2004), некоторых фототрофов и бродильщиков (Whittle et al., 1976; Kluge et al., 1990; Johann, Georg, 1997), однако каждый из них характеризуется определенным набором разрушаемых веществ. В анаэробных условиях наибольшая эффективность и глубина биодеструкции таких соединений достигается в агрегированных микробных сообществах, а развитие молекулярно-генетических методов идентификации микроорганизмов позволяет анализировать структуру таких консорциумов и прослеживать их сукцессию при контакте с ксенобиотиками.

Известно, что азокрасители и ароматические амины в зависимости от концентрации могут обладать токсичностью по отношению к микроорганизмам, влияющей на их жизнеспособность и функционирование. У ранее исследованных ме-

| Название   | Молярная масса, г/моль | Назначение  | Характерные максимумы поглощения, нм |
|--|------------------------|-------------|--------------------------------------|
| Methyl Red (Метиловый красный, метиленовый красный, С.І.13020)       | 269                    | Технический | 431                                  |
|  |                        | краситель   |                                      |
| N,N-диметил- <i>n</i> -фенилендиамин (N,N-диметил-1,4-фенилендиамин, | 136                    | _           | 297 и 242                            |
| N,N-dimethyl- $p$ -phenylenediamine, $\mathcal{I}M\Phi$ )            |                        |             |                                      |
| 2-Аминобензойная кислота (2-АБК, o-anthranilic acid)                 | 137                    | _           | 310                                  |
| 1,4-Фенилендиамин (1,4-phenylenediamine)                             | 108                    | _           | 302 и 329                            |

Таблица 1. Основные характеристики азокрасителя Methyl Red и возможных интермедиатов биодеградации MR

таногенных сообществ при контакте с этими веществами снижалось общее количество клеток и биоразнообразие, менялось соотношение компонентов сообщества вплоть до смены доминирования, изменялась морфология агрегатов и клеток и ингибировался ацетокластический метаногенез (Линькова, 2011).

Для прогнозирования локальных и глобальных последствий постоянного присутствия поллютантов в окружающей среде уже недостаточно рассматривать микробный компонент как "черный ящик" (Andren, Balandreau, 1999), поскольку именно микробное разнообразие может быть важным параметром, влияющем на направление развития и функционирования экосистем (Friedlingstein et al., 2006; McGuire et al., 2010).

Поскольку именно микробное сообщество является функциональной единицей, взаимодействующей с окружающей средой, то изменения под действием устойчивых загрязнителей состава физиологических групп и метаболических путей в нем может катастрофически отразиться на всей экосистеме. На начальных этапах прогностического моделирования может помочь использование простых лабораторных моделей влияния ксенобиотика на структурно-функциональную организацию микробного сообщества (содержимое микробного "черного ящика").

Целью настоящей работы было изучение процесса биодеградации технического азокрасителя Methyl Red метаногенными микробными сообществами из донных отложений реки Волга и состояния этих сообществ при контакте с данным ксенобиотиком.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник биологического материала. Источником выделения активных метаногенных микробных сообществ были пробы донных отложений реки Волга (Московская область, г. Дубна, район Ратмино), взятые 06.09.2020 г. Температура воды в месте отбора составляла 17°С, рН 8.09. Усред-

ненные пробы (без сохранения слоев) ила отбирали с помощью пробоотборника на глубине около 7 м в 40 м от берега. Мощность донных отложений в этом месте составляла 80-120 см. Пробу ила хранили при  $3-5^{\circ}$ С в герметичных флаконах без доступа воздуха в течение 7 сут, а затем использовали в качестве инокулята при посеве.

Исследуемый ксенобиотик и предполагаемые интермедиаты. В качестве субстрата был использован технический азокраситель Methyl Red (MR, Метиловый красный, 4-диметиламиноазобензол-2-карбоновая кислота), его основные характеристики приведены в табл. 1. Это синтетический анилиновый краситель, кислотно-основный индикатор, в кислой среде (при рН от 0 до 4.4) имеющий красный цвет, а в нейтральной и щелочной (при рН от 6.2 до 14) — желтый. Представляет собой порошок темно-красного цвета, плохо растворимый в воде. Его получают из антраниловой кислоты и диметиланилина путем диазотирования. Метиловый красный используют для титрования алифатических аминов, гетероциклов, содержащих азот, и различных фармацевтических препаратов в 1,4-диоксане (Красько и соавт., 2017). Также используется в качестве индикатора в химической промышленности. Метиловый красный относится к 3-му классу опасности для человека.

Азокраситель хранили в виде анаэробного концентрированного раствора в стерильной дистиллированной воде и добавляли в опытные флаконы с помощью стерильных шприцев. В качестве предполагаемых интермедиатов разложения азокрасителя рассматривали (табл. 1, рис. 1): N,N-диметил-*n*-фенилендиамин (ДМФ), 1,4-фенилендиамин, 2-аминобензойную (антраниловую) кислоту (2-АБК).

Среды и условия культивирования. Инкубацию осуществляли в анаэробных условиях на минеральной среде (Razo-Flores et al., 1997) следующего состава (мг/л):  $NH_4Cl - 280$ ;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O - 10$ ;  $K_2HPO_4 - 250$ ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 100$ ;  $NaHCO_3 - 5000$ ; дрожжевой экстракт -100; резазурин -0.2; раствор микроэлементов:  $H_3BO_3 - 0.05$ ;  $FeCl_3 \cdot 4H_2O - 2$ ;

**Рис. 1.** Структурные формулы MR (а);  $ДМ\Phi$  (б); 2-АБК (в); 1,4-фенилендиамина (г).

 $ZnCl_2 - 0.05$ ;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O - 0.05$ ;  $CuCl_2 \cdot 2H_2O -$ 0.03; AlCl<sub>3</sub> ·  $6H_2O - \overline{2}$ ; NiCl<sub>2</sub> ·  $6H_2O - 0.05$ ; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ·  $\cdot$  5H<sub>2</sub>O - 0.1 и 36% HCl (100 мкл/л); рН 7.0. Накопительные культуры культивировали во флаконах объемом 120 мл с герметично закрывающимися резиновыми пробками, зажатыми алюминиевыми колпачками, в минеральной среде. Объем жидкой фазы составлял 40 мл. Газовая фаза была заменена на инертный газ (аргон) для создания анаэробиоза. В каждый флакон после стерилизации добавляли азокраситель из анаэробного концентрированного раствора до конечной концентрации 1.0 мМ и вносили инокулят в количестве 10% от объема среды. Культивирование проводили при 30°С без перемешивания. Отбор проб, а также внесение различных добавок осуществляли с помощью стерильных шприцев, не нарушая условий анаэробиоза и стерильности. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Для отслеживания метаногенеза за счет биоразложения азокрасителя были поставлены контрольные варианты: с биологическим материалом, но без добавления азокрасителя (биологический контроль) и без биологического материала, но с добавлением азокрасителя (абиотический контроль). Культивирование проводили в статичных условиях, в темноте при 30°C.

Аналитические методы исследования. Спектрофотометрическое сканирование проводили в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм в фосфатном буфере, предварительно центрифугируя пробу, на спектрофотометре "Shimadzu" UV-1202 (Япония). Концентрации МR и возможных интермедиатов его разложения (табл. 1) определяли по величине оптической плотности при длинах волн максимумов поглощения (431 нм для MR, 310 нм для 2-АБК, 297 и 242 нм для ДМФ, 302 и 329 нм для 1,4-фенилендиамина), используя калибровочные кривые для каждого вещества. Расчет концентрации субстрата проводили по формуле:

$$C(MM) = \frac{OD}{tg\alpha} \frac{X}{M},$$

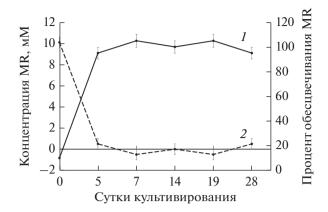
где C (мМ) — концентрация вещества; OD — оптическая плотность;  $tg\alpha$  — тангенс угла наклона калибровочной кривой; X — разведение азокрасителя; M — молекулярная масса.

Концентрацию ароматических аминов определяли также с помощью ВЭЖХ на хроматографе "Gilson" (Франция), используя колонку с обращенной фазой 250  $\times$  4 мм, Диасорб 130-С<sub>16</sub>Т, 6 мкм, "ВСМ" (Россия) в системе уксусная кислота (1%)-метанол (в соотношении 50 : 50 по объему). Скорость подачи элюента — 0.6 мл/мин, давление — 150 бар. Времена удержания ароматических аминов составляли: для 1,4-фенилендиамина — 3.2 мин, для  $ДМ\Phi - 4.4$  мин и для 2-АБК - 5.2 мин. В качестве детектора использовали спектрофотометр, настроенный на длину волны 225 нм (оптимум поглощения ароматических соединений). Объем вводимой пробы — 20 мкл. Расчет концентрации компонентов смеси проводили по площадям пиков, отнесенным к площадям пиков веществ в стандартных растворах.

Для анализа состава газообразных (водород, метан и углекислый газ) продуктов применяли газовую хроматографию (ГХ) на хроматографе Кристалл 2000М (ЗАО СКБ "Хроматэк", Россия) со следующими параметрами: детектор: ДТП (детектор по теплопроводности, катарометр), колонка: набивная, с внутренним диаметром 3 мм, длиной 1 м, неподвижная фаза — уголь. Температура термостата колонок: 110°C. Температура детектора: 150°C. Газ-носитель – аргон, расход 30 мл/мин, давление 20 кПа. Объем вводимой пробы 1 мл, время анализа — 4 мин. Программное обеспечение "Хроматэк-аналитик 2.5". Пробу отбирали из газовой фазы флаконов с помощью стерильных шприцев и вводили образец в хроматографическую колонку через систему ввода. Количественное определение компонентов рассчитывали по площади под хроматографическим пиком. Избыточное давление во флаконах измеряли с помощью манометра "WIKA" (Германия) и учитывали эти данные при расчете конечных концентраций газовых метаболитов. Для пересчета числового значения объемной концентрации газа, выраженной в процентах, в молярную концентрацию (мМ) использовали следующую формулу:

$$Y = \frac{(P_1 P_{06\text{III}} T_0 V_{r.\phi.})}{(P_0 \times 22.4 T_1 V_{\text{x.}\phi.})} \times 1000,$$

где  $P_1$  — парциальное давление газа (%/100);  $V_{\text{ж.ф.}}$  — объем жидкой фазы во флаконе, мл;  $V_{\text{г.ф.}}$  — объем газовой фазы во флаконе, мл;  $T_0$  — температура



**Рис. 2.** Обесцвечивание азокрасителя MR микробными сообществами из донных отложений р. Волга: 1 – убыль субстрата; 2 – процент обесцвечивания.

при нормальных условиях,  $273^{\circ}$ K;  $T_1$  — рабочая температура, K;  $P_0$  — давление при нормальных условиях, 1 атм.;  $P_{\text{общ}}$  — общее давление во флаконе, атм.; 22.4 — объем 1 моль газа при 273 K, л моль $^{-1}$ .

Морфологические изменения в сообществах отслеживали с помощью световой микроскопии фиксированных окрашенных препаратов при общем увеличении 1000×. Препараты фиксировали в пламени горелки, окрашивали фуксином и просматривали с помощью масляной иммерсии.

Филогенетический анализ состава микробных сообществ был проведен на основе данных высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S рРНК. Для выделения тотальной ДНК из проб использовали набор FastDNA Spin Kit for Soil ("MP Biomedicals", США), следуя инструкциям производителя. Концентрацию и чистоту препаратов ДНК оценивали спектрофотометрически при  $\lambda$  260 и 280 нм на приборе NanoDrop 2000C ("Thermo Fisher Scientific", США). Фрагменты генов 16S рРНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием "универсальных" праймеров для участка V4 в соответствии с ранее описанной методикой (Fadrosh et al., 2014). Ис-

пользовали систему праймеров 515F (5'-GTGB-CAGCMGCCGCGGTAA-3') (Hugerth et al., 2014) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCTA-ATCC-3') (Merkel et al., 2019). Эти ПЦР-фрагменты секвенировали на высокопроизводительном геномном анализаторе MiSeq "Illumina" (США) с использованием набора реактивов для считывания 150 нуклеотидов с каждого конца в Центре "Биоинженерия" ФИЦ Биотехнологии РАН. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили при помощи программного пакета QIIME (версия 1.9.0) – http://qiime.org (Bolyen et al., 2019). Для построения круговых диаграмм, иллюстрирующих целостный филогенетический состав микробных сообществ, использовали графическую программу Krona.

Статистическую обработку данных проводили, используя пакет программ MS Excel 2016, 2019.

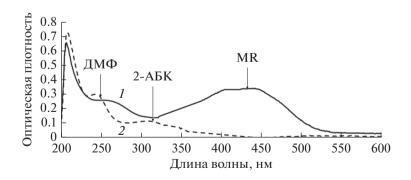
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс биодеградации MR метаногенными микробными сообществами, выделенными из донных отложений реки Волга. На протяжении 28 сут наблюдения во всех опытных и контрольных образцах рН оставался равен 7. В вариантах абиотического контроля концентрация азокрасителя оставалась неизменной, тогда как в опытных вариантах наблюдали обесцвечивание культуральной жидкости (доп. материалы, рис. S1).

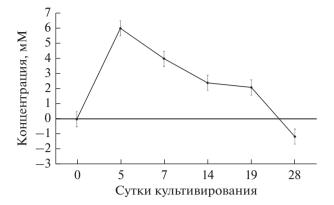
В этих вариантах спектрофотометрический анализ культуральной жидкости в динамике показал полное исчезновение пика азокрасителя на 7 сут, что свидетельствует о его разложении (рис. 2).

На 7 сут в культуральной жидкости были зафиксированы интермедиаты процесса —ДМФ и 2-АБК. Концентрация 2-АБК была максимальной на 5 сут, затем начинала снижаться, т.е. интермедиат подвергался дальнейшему разрушению. На 28 сут 2-АБК в опытных вариантах не регистрировалась (рис. 3, 4).

Анализ структурной формулы азокрасителя MR позволяет предположить, что при восстанов-



**Рис. 3.** Изменение спектров в образцах с азокрасителем MR и микробными сообществами из донных отложений р. Волга: I-0 сут; 2-7 сут.



**Рис. 4.** Изменение концентрации 2-аминобензойной кислоты, интермедиата разложения азокрасителя MR микробными сообществами из донных отложений р. Волга.

лении азосвязи могут образоваться ДМФ и 2-АБК с максимумами поглощения 242 и 310 нм (рис. 5). Это подтверждено и результатами ВЭЖХ: появлением пиков на 4.4 и 5.2 мин соответственно, и не противоречит данным литературы (Емашова и соавт., 2009).

Образование биогаза (смеси СН<sub>4</sub> и СО<sub>2</sub>) как конечного продукта деструкции шло и в опытных вариантах, и в биоконтроле (рис. 6). Выделение молекулярного водорода зарегистрировано не было. В случае опытных вариантов биогаз образовывался в меньших количествах по сравнению с биоконтролем (на 43.8%), что свидетельствует о токсичном воздействии МR на микробиоту донных осадков р. Волга. Это согласуется с имеющимися литературными данными для микробных сообществ другого происхождения (Емашова и соавт., 2009).

Таким образом, микробные сообщества, выделенные из илов р. Волга, способны к частичной деградации MR при инкубации в синтетической среде с азокрасителем в качестве единственного источника углерода и энергии, при 30°С и нейтральном рН. Однако присутствие в среде азокрасителя и, возможно, образовавшихся ароматических аминов приводит к подавлению метаногенеза в них и тормозит полную минерализацию начального субстрата.

Анализ компонентного состава микробных сообществ из донных отложений р. Волга. Для изучения

влияния MR (и, возможно, интермедиатов его обесцвечивания) на микробные сообщества из донных осадков р. Волга были просмотрены фиксированные окрашенные препараты для исходных образцов и опытных вариантов, обесцвечивающих азокраситель. Основная часть клеток во всех препаратах проб ила была представлена короткими палочками и кокками, иногда встречались спириллы. В сообществе, продолжительное время контактировавшем с азокрасителем, наблюдали значительное снижение численности клеток. Часть клеток имела неправильную форму и поврежденные края, что может свидетельствовать об их нежизнеспособности (рис. 7).

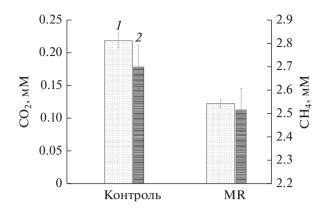
Аналогичные результаты получены для анаэробных сообществ из очистных сооружений и илов озера Цайдам (Емашова и соавт., 2009; Линькова и соавт., 2013).

Анализ филогенетического разнообразия микроорганизмов из донных отложений р. Волга до и после контакта с азокрасителем MR проводили с помощью высокопроизволительного секвенирования гена 16S рРНК. Исследование выявило значительные отличия в составе сообществ, контактировавших с MR. Так, доминирующие группы среди бактерий в контрольном образце были представлены видами из семейств Clostridiaceae (4.73-5.05%), Anaerolineaceae (5.99-6.10%), Geobacteriaceae (2.90-3.03%), а также штаммами LCP-89 (3.21–3.37%), Bacteroidetes vadinHA17 (11.03-11.19%) (рис. 8). Среди архей наиболее многочисленными оказались семейства Nitrososphaeraeae (15.38%), Methanobacteriaceae (10.99%), Methanosarcinaceae (5.52%), и некоторые другие (рис. 9).

В сообществе с азокрасителем МR доминирующими семействами среди бактерий оказались Geobacteriaceae (14.18—14.32%), Anaerolineaceae (6.91—6.93%), Comamonadaceae (4.46—4.56%), Rhodocyclaceae (6.03—6.29%), Prolixibacteriaceae (5.67—5.71%), а также штамм Bacteroidetes vadinHA17 (9.36—9.49%). Среди архей в этом случае наиболее многочисленными были семейства Nitrososphaeraceae (24.32%), SCGCAAAO11-D5 (8.11%), Altiarchaeaceae (8.11%).

При добавлении MR снизилось общее разнообразие архей. Семейства Methanobacteriaceae, Methanofastidiosaceae, Methanoregulaceae, Methanosaetaceae, Methanomassillicoccaceae, составляющие в контроле суммарно 33.32% от общего числа ар-

Рис. 5. Предполагаемая схема распада красителя MR при восстановлении азосвязи в анаэробных условиях.

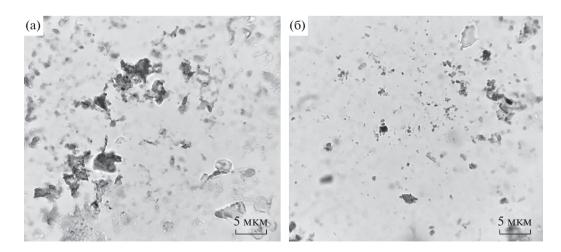


**Рис. 6.** Образование газов микробными сообществами из донных отложений р. Волга, 28 сут:  $1-\mathrm{CO}_2; 2-\mathrm{CH}_4$ .

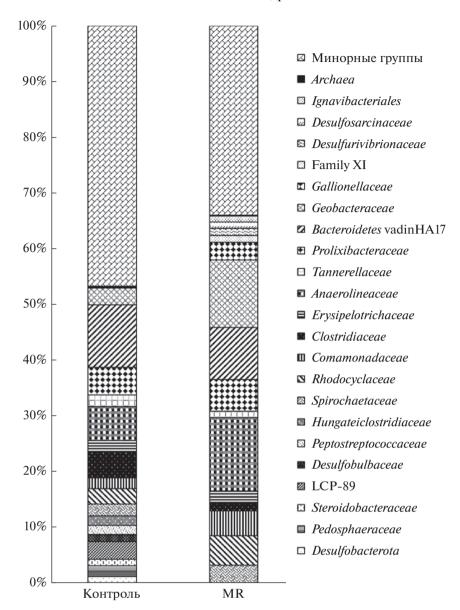
хей, не были представлены в опытном варианте, что подтверждает данные об угнетении метаногенеза под действием азокрасителя. Семейства Altiarchaeaceae, Methanoperedenaceae, а также штаммы SCGCAAA011-D5, GW2011, DSEG выявлены в образце с азокрасителем, но отсутствуют в контроле. В опыте процентное соотношение представителей сем. Nitrososphaeraceae и пор. Woeseaechaeales с неопределенным семейством увеличивается на 7.64 и 6.26% соответственно, а сем. Methanomassiliicoccaceae и типа Bathyarchaeia с неопределенным семейством, наоборот, снижается на 2.82 и 11.58% соответственно.

Семейство *Geobacteriaceae*, представленное в контроле 2.90—3.00% от общего числа видов, в варианте с красителем увеличило долю до 14.18—14.32%, тогда как представители семейства *Clostridiaceae* после контакта с азокрасителем снизили свою численность с 4.73 до 1.22—1.37% от общего числа видов. В контрольной пробе данное семейство

представлено в основном родом Clostridium (sensu stricto, 86.00%), тогда как в образце с MR на этот род приходится 2.00%, а на род Proteiniclasticum 82.00-83.00%. Группа *Proteiniclasticum*, согласно литературным данным (Zhang et al., 2010), встречается в илах очистных сооружений, участвуя в синтрофных взаимодействиях посредством ускорения разложения пропионата. Довольно многочисленным и в контроле (11.19%), и в опыте (9.48%) является штамм *Bacteroidetes* vadinHA17. Представители шести групп (сем. Pedosphaeraceae, Steroidobacteraceae, Peptostreptococcaceae, Desulfobulbaceae, Hungateiclostridiaceae и штамм LCP89), имеющиеся в контроле в количестве 1% и более, практически не встречаются в пробе с азокрасителем. Возможно, на данные группы микроорганизмов азокраситель MR оказывает токсическое воздействие. Однако есть микроорганизмы, встречающиеся в вариантах с азокрасителем чаще, чем в контроле: сем. Desulfovibrionaceae (0.52-0.55% в контроле, 1.25-1.37% в опыте), Desulfosarcinaceae (0.90-0.92% в контроле, 1.17-1.29% в опыте), штаммы PHOS-HE36 (0.54-0.58% в контроле, 1.05% в опыте), Family XI (0.11-0.18% в контроле, 1.22-1.23% в опыте). Представители сем. Gallionellaceae, также увеличившие свое представительство в варианте с MR (0.08-0.12% в контроле, 2.98-3.15% в опыте), по литературным данным являются индикатором биодеградации загрязняющих веществ, в частности, хлорированных углеводородов в грунтовых водах (Guan et al., 2013). Микроорганизмы сем. Desulfosarcinaceae это сульфатредуцирующие бактерии, способные к анаэробной деградации различных органических веществ, в том числе, насыщенных углеводородов (Watanabe et al., 2017). Не исключено, что увеличение количества микроорганизмов этих групп связано с их возможным участием в различных стадиях процесса минерализации азокраси-



**Рис. 7.** Морфология клеток контрольных (а) и опытных (б) образцов из донных отложений р. Волга. Окраска фуксином, увеличение ×1000.

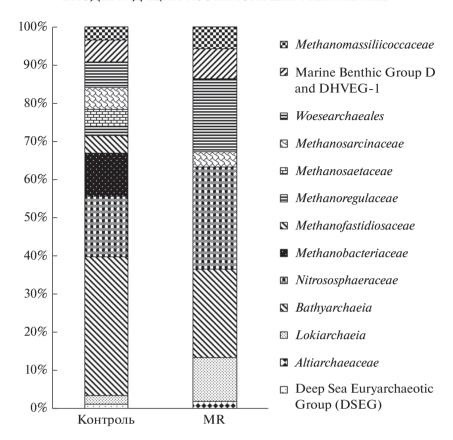


**Рис. 8.** Состав микробного сообщества из донных отложений р. Волга до и после контакта с азокрасителем MR, по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК.

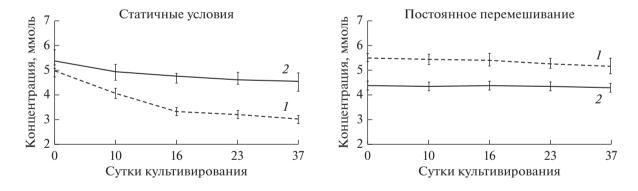
теля MR, так как в метаногенных сообществах они обычно выступают в качестве синтрофов. Таким образом, согласно полученным данным, можно сделать вывод о смене доминирующих микробных групп в сообществе в результате добавления азокрасителя MR.

В целом, под действием этого ксенобиотика меняется структурно-функциональная организация исходных анаэробных сообществ донных отложений р. Волга.

Оценка вклада небиологических факторов в процесс разложения азокрасителя. Одним из методов удаления азокрасителей из сточных вод является их адсорбция на частицах биомассы (живых или мертвых клетках), во время которой концентрация соединения достигает насыщения. Такой адсорбент нуждается в регенерации, либо должен быть удален вместе с азокрасителем и утилизирован. Однако адсорбция может быть начальной стадией процесса биодеградации азокрасителя. Для проверки вклада адсорбции в этот процесс нами были поставлены на инкубацию варианты с живым и автоклавированным при 1 атм илом из р. Волга в той же среде при 30°С в статичных условиях и при перемешивании (220 об./мин). В пенициллиновые флаконы объемом 15 мл вносили раствор МR до конечной концентрации 5 мМ, 5 мл посевного материала и 5 мл анаэробной среды. Газовая фаза была заменена на аргон. Эксперимент продолжался 29 сут, отбор проб проводи-



**Рис. 9.** Археи, представленные в сообществе из донных отложений р. Волга, до и после контакта с азокрасителем MR, по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК.



**Рис. 10.** Убыль азокрасителя MR в статичных условиях (а) и в условиях постоянного перемешивания (б) в присутствии анаэробных консорциумов: I — живого; 2 — автоклавированного.

ли 1 раз в неделю. Показано, что в течение первых 9 сут происходило снижение концентрации субстрата в среде, вероятно, вызванное адсорбцией, причем в статичных вариантах (рис. 10а) этот процесс шел более активно, чем при инкубации на качалке (рис. 10б), где одновременно происходила десорбция субстрата из-за перемешивания.

Позднее в вариантах с автоклавированным илом наблюдали только незначительные колебания концентрации субстрата, тогда как в вариан-

тах с живыми клетками обесцвечивание MR протекало полностью. Разложение азокрасителя живым илом активнее идет в статичных условиях, поскольку для стабильности и эффективности синтрофных процессов важна определенная пространственная организация сообщества, которая нарушается перемешиванием. Адсорбция практически не осуществляется в условиях постоянного перемешивания, поэтому снижения концентрации MR в пробах с автоклавированным

анаэробным илом не наблюдали. Полученные данные подтверждают, что обесцвечивание азокрасителя в основном эксперименте не является следствием исключительно адсорбции, а происходит в результате начальной стадии адсорбции и, что более важно, последующего восстановления азосвязи живыми микроорганизмами.

Естественные водоемы в зависимости от условий могут содержать большое количество экологических ниш. Микробные сообщества донных отложений имеют большое значение, так как для них характерны высокая концентрация клеток и разнообразие групп микроорганизмов-деструкторов, и они могут быстрее реагировать на изменение внешних условий. Так, для представителей Bacteroidetes показана способность к разложению высокомолекулярных органических веществ (Kirchman, 2002), а планктомицеты могут участвовать в гидролизе сложных углеводов (Glöckner et al., 2003). Для анаэробных сообществ, выделенных из илов природных водоемов, установлена возможность полной минерализации до биогаза различных ароматических ксенобиотиков: бисфенола F (Inoue et al., 2008), полихлорбифенилов (Ye, 1992), хлорзамещенных фенолов и бензойной кислоты (Hagglbom et al., 1993), полициклических ароматических углеводородов (Hilvard, 2008). Такие исследооценки важны ДЛЯ возможности самоочищения из-за высокой ценности водоемов и большого количества локальных загрязнений. В то же время, результаты лабораторных экспериментов нельзя напрямую экстраполировать на условия реального загрязнения водоемов, так как они представляют собой гетерогенные системы. включающие большое количество взаимосвязанных биотических и абиотических факторов.

Полученные нами данные можно рассматривать в качестве приближенной модели взаимодействия широко распространенного ксенобиотика и микробиоты донных отложений естественного водоема, которая определяет подходы к более глубоким исследованиям. Показано, что имеется потенциальная возможность деструкции азокрасителя анаэробными микробными сообществами донных отложений природного водоема. Однако поскольку условия в естественном месте обитания обычно не соответствуют оптимальным для быстрой минерализации ксенобиотика, а физико-химические параметры часто флуктуируют, то полное разрушение азокрасителя, скорее всего, будет длительным. Поскольку контакт микробного сообщества с азокрасителем (и интермедиатами его разрушения) приводит, как показано нами, к негативным морфологическим и структурно-функциональным изменениям, то очевидно, что такие ксенобиотики не являются веществами инертными и безразличными для микробных сообществ, а значит и для всей экосистемы. Лабораторное моделирование ответа резидентных микроорганизмов на присутствие азокрасителя в среде поможет прогнозированию потенциальной реакции микробного компонента экосистемы в реальных условиях.

Наши данные еще раз подтверждают необходимость удаления азокрасителей из сточных вод и тщательного слежения за их присутствием в биосфере.

Другим аспектом данной работы является возможность адаптации анаэробных микробных сообществ из донных отложений естественных водоемов для деградации азокрасителей.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность старшим научным сотрудникам ФИЦ Биотехнологии РАН А.Ю. Меркелю и А.А. Поповой за помощь в проведении молекулярно-биологических исследований.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300094-7.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Гордон П., Грегори П.* Органическая химия красителей. М.: Мир, 1987. 344 с.

Емашова Н.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И., Калюжный С.В. Особенности разложения азокрасителей анаэробными микробными сообществами // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. С. 95–201.

Yemashova N.A., Kotova I.B., Netrusov A.I., Kalyuzhnyi S.V. Special traits of decomposition of azo dyes by anaerobic microbial communities // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. P. 176–181.

Линькова Ю.В., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Способность микробных сообществ из донных отложений оз. Цайдам к метаногенной деструкции аминоароматических ксенобиотиков // Вода: химия и экология. 2013. № 1. С. 64—70.

Линькова Ю.В., Куликова И.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Деградация азокрасителей и ароматических аминов метаногенными микробными сообществами из илов очистных сооружений // Вода: химия и экология. 2011. № 7. С. 51–58.

Красько С.А., Богомазова А.А., Михайлова Н.Н., Дехмярь  $T.\Phi$ . Индикаторы. Уч. пособие / Под общ. ред. проф. Злотского С.С. М.: УГНТУ, 2017. Вып. 7. 62 с.

Савельева О.В., Котова И.Б., Скляр В.И., Калюжный С.В., Нетрусов А.И. Выделение штамма Pseudomonas ASA2 из метаногенного сообщества, расщепляющего аминобензоат и аминосалицилат // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 1—2.

Savel'eva O.V., Kotova I.B., Sklyar V.I., Kalyuzhnyi S.V., Netrusov A.I. Isolation of strain *Pseudomonas* sp. ASA2 from a methanogenic community degrading aminobenzoate and aminosalicylate // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 241–242.

Хоменков В.Г., Шевелёв А.Б, Жуков В.Г., Загустина Н.А. Организация метаболических путей и молекулярногенетические механизмы биодеградации ксенобиотиков у микроорганизмов (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. С. 132—152.

Khomenkov V.G., Shevelev A.B., Zhukov V.G., Zagustina N.A., Bezborodov A.M., Popov V.O. Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic degradation in microorganisms: a review // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. V. 44. P. 117–132.

Andren O., Balandreau J. Biodiversity and soil functioning — from black box to can of worms? // Appl. Soil. Ecol. 1999. V. 2. P. 105–108.

Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodríguez A.M., Chase J., Caporaso J.G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.

Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // Microbiome. 2014. V. 2. P. 1–7.

*Friedlingstein P., Betts R.A., Bopp L.* Climate—carbon cycle feedback analysis: Results from the C4 MIP model intercomparison // J. Climate. 2006. V. 19. P. 3338—3353.

Glockner F.O., Kube M., Bauer M. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 8298–8303.

Guan X., Liu F., Xie Y. et al. Microbiota associated with the migration and transformation of chlorinated aliphatic hydrocarbons in groundwater // Environ. Geochem. Health. 2013. V. 35. P. 535–549.

Hagglbom M.M., Rivera M.D., Young L.Y. Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids // Appl. Env. Microbiol. 1993. V. 59. P. 1162–1167.

Hilyard E.J., Jones-Meehan J.M., Spargo B.J., Hill R.T. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbondegrading bacteria from Elizabeth River sediments // Appl. Env. Microbiol. 2008. V. 74. P. 1176–1172.

Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime,

a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116–5123.

Inoue D., Hara S., Kashihara M., Murai Y., Danzl E., Sei K., Tsunoi S., Fujita M., Ike M. Degradation of bis(4-hydroxyphenyl) methane (bisphenol F) by Sphingobium yanoikuyae strain FM-2 isolated from river water // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 352–358.

*Johann H., Georg F.* Microbial anaerobic aromatic metabolism // Anaerobe. 1997. V. 3. P. 1–22.

*Kirchman D.L.* The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 39. P. 91–100.

Kluge C., Tschech A., Fuchs G. Anaerobic metabolism of resorcylic acid and resorcinol in a fermenting and in denitrifying bacterium // Arch. Microbiol. 1990. V. 155. P. 68–74.

*McGuire K.L., Treseder K.K.* Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study // Soil Biol. Biochem. 2010. V. 42. P. 529–535.

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

Rawat D., Mishra V., Sharma R.Sh. Detoxification of azo dyes in the context of environmental processes // Chemosphere. 2016. V. 155. P. 591–605.

*Razo-Flores E.* Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge. Ph.D. Thesis. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands. 1997. 162 p.

Savelieva O., Kotova I., Roelofsen W., Stams A.J.M., Netrusov A. Conversion of aminoaromatic acids by a methanogenic enrichment and by a novel *Citrobacter freundii* strain // Arch. Microbiol. 2004. V. 181. P. 163–170.

*Stolz A.* Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 56. P. 69–80.

Watanabe M., Higashioka Y., Kojima H., Fukui M. Desulfosarcina widdelii sp. nov. and Desulfosarcina alkanivorans sp. nov., hydrocarbon-degrading sulfate-reducing bacteria isolated from marine sediment and emended description of the genus Desulfosarcina // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 2994–2997.

Whittle P.J., Lunt D.O., Evans W.C. Anaerobic photometabolism of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas* sp. // Biochem. Soc. Trans. 1976. V. 4. P. 490–491.

Ye D., Quensen J.F. 3rd, Tiedje J.M., Boyd S.A. Anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls (Aroclor 1242) by pasteurized and ethanol-treated microorganisms from sediments // Appl. Env. Microbiol. 1992. V. 58. P. 1110–1114.

Zhang K., Song L., Dong X. Proteiniclasticum ruminis gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic proteolytic bacterium isolated from yak rumen // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2221–2225.

## Biodegradation of the Methyl Red Azo Dye by Methanogenic Microbial Communities Isolated from Volga River Sediments

Yu. V. Taktarova<sup>1, \*</sup>, L. I. Shirinkina<sup>1</sup>, A. S. Budennaya<sup>1</sup>, M. A. Gladchenko<sup>1</sup>, and I. B. Kotova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University, Moscow, 119234 Russia \*e-mail: vytaktarova@gmail.com

Received January 21, 2022; revised January 25, 2022; accepted January 26, 2022

Abstract—Azo dves are soluble xenobiotics stable under oxidizing conditions, which are widely used in human practice; they are present in liquid and solid industrial and household wastes and regularly enter the environment. In this work, we investigated the possibility of degradation of the technical azo dye Methyl Red (MR) by anaerobic microbial communities isolated from the Volga River sediments, and MR effect on community composition and methanogenic activity. This is the first report on ability of such azo dve-unadopted communities to degrade MR with production of stable N,N-dimethyl-p-phenylenediamine and biodegradable 2-aminobenzoic acid. Comparison of methanogenesis rates in communities with and without MR revealed a decrease in biogas production by 43.80% due to the toxic effect of MR (and, possibly, of aromatic intermediates of its decomposition) on microorganisms. Next-generation sequencing of the 16S rRNA gene revealed significant changes in the structural and functional organization of the methanogenic community in the presence of MR and a shift among the dominant groups. In the community with MR the share of bacteria of the family Geobacteriaceae increased almost 5-fold, while that of the family Clostridiaceae decreased 3fold, and the genus *Proteiniclasticum* became dominant. In the presence of MR, representatives of the families Methanobacteriaceae, Methanofastidiosaceae, Methanoregulaceae, Methanosaetaceae, and Methanomassillicoccaceae, which constituted 33.32% of the total number of archaea in the initial community, were not detected. An increase in the proportion of microorganisms of the families Desulfovibrionaceae, Desulfosarcinaceae, and Gallionellaceae was presumably related to their possible involvement in MR degradation, since they usually act as syntrophs in methanogenic communities. MR decolorization was confirmed to require the presence of living cells, adsorption being only its initial stage, and the effect of chemical reduction of the azo bond was minimal. Our preliminary laboratory model shows that while natural communities are potentially capable of destroying MR, the azo dye also has a significant effect on their structure.

Keywords: biodegradation, azo dyes, anaerobic microbial communities, methanogenesis

## \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

# КАСКАДНАЯ БИОКОНВЕРСИЯ ФИТОСТЕРИНА В ТЕСТОСТЕРОН ШТАММАМИ MYCOLICIBACTERIUM NEOAURUM BKM Ac-1815Д И NOCARDIOIDES SIMPLEX BKM Ac-2033Д

© 2022 г. Д. Н. Текучева<sup>а, \*</sup>, В. В. Фокина<sup>а</sup>, В. М. Николаева<sup>а</sup>, А. А. Шутов<sup>а</sup>, М. В. Карпов<sup>а</sup>, М. В. Донова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ "Пущинский научный центр биологических исследований РАН", Пущино, 142290 Россия

\*e-mail: tekuchevadn@gmail.com Поступила в редакцию 13.12.2021 г.

После доработки 24.01.2022 г. Принята к публикации 25.01.2022 г.

Разработаны методы получения тестостерона на основе двухэтапной трансформации фитостерина при использовании культур актинобактерий Mycolicibacterium neoaurum ВКМ Ac-1815Д и Nocardioides simplex BKM Ac-2033Д. Эффективное окисление боковой цепи фитостерина культурой M. neoаигит приводило к образованию основного и побочного продуктов; андрост-4-ен-3,20-диона (АД) и андроста-1,4-диен-3,20-диона (АДД) соответственно, которые затем превращались клетками штамма N. simplex в тестостерон. 17β-Восстановление является обратимой реакцией и катализируется мембрано-ассоциированной 17β-гидроксистероиддегидрогеназой (17β-ГСД), способной как к окислению, так и восстановлению 17-оксо-группы АД(Д). Обнаружено, что добавки глюкозы и ограниченная аэрация являются ключевыми факторами, которые обеспечивают сдвиг активности 17β-ГСД N. simplex в сторону восстановительной реакции. Получение тестостерона из фитостерина реализовано с использованием двух подходов: 1) при инактивации клеток М. neoaurum после конверсии фитостерина на первом этапе и применении покоящихся клеток N. simplex для восстановления АД(Д) на втором этапе: 2) при последовательном применении двух растуших культур. В оптимизированных условиях общий выход тестостерона из фитостерина (10 г/л) достигал 53 мол. %. Полученные результаты по каскадной биоконверсии фитостерина в тестостерон превосходят известные данные и являются научно-практической основой для разработки новых биотехнологий получения ценных стероидных соединений — интермедиатов синтеза современных лекарственных препаратов.

**Ключевые слова:** каскадная биотрансформация, тестостерон, фитостерин, актинобактерии, *Mycolicibacterium neoaurum*, *Nocardioides simplex* 

**DOI:** 10.31857/S0026365622300097

Тестостерон (андрост-4-ен-17β-ол-3-он) — андрогенный стероидный гормон, агонист андрогеновых рецепторов. Тестостерон широко используется в медицине и ветеринарии, а также применяется в качестве важного предшественника при получении некоторых фармацевтических препаратов. Прямой химический синтез тестостерона затруднен из-за сложного строения и асимметричности тетрациклической структуры стероидного ядра. В настоящее время тестостерон производится химически или с применением энзиматических методов из АД (Perez et al., 2006). Применение в медицине химически синтезированного тестостерона может вызывать побочные реакции (Sood et al., 2016).

Наиболее перспективным способом производства тестостерона является его биотехнологи-

ческое получение из дешевого и доступного фитостерина в силу экологичности и экономической привлекательности способа. Фитостерин представляет собой смесь растительных стеринов; получают фитостерин из отходов производства масложировой или целлюлозно-бумажной промышленности (Donova et al., 2005a). Попытки создания прямого биотехнологического метода трансформации фитостерина в тестостерон были предприняты с использованием культур *Mycobac*terium sp. (Lo et al., 2002), Mycobacterium sp. BKM Ac-1815Д и Mycobacterium sp. BKM Ac-1816Д (Egorova et al., 2009). Однако в указанных исследованиях при использовании относительно невысоких концентраций фитостерина  $(0.1-5 \Gamma/\pi)$ выход тестостерона составлял 31-55% (мол.).

Следует отметить, что на основании результатов полногеномного секвенирования и филогенетического анализа (Bragin et al., 2013; Shtratnikova et al., 2014) штаммы BKM Ac-1815Д и BKM Ac-1816Д были определены до вида *М. пеоаигит*, а в 2018 г. филогенетически связанная группа микобактерий, включавшая сапрофитные быстрорастущие штаммы данного вида, была реклассифицирована в род *Mycolicibacterium* (Gupta et al., 2018). Таким образом, современное название штаммов ВКМ Ac-1815Д и ВКМ Ac-1816Д – *Mycolicibacterium пеоаигит*.

Штамм M. neoaurum BKM Ac-1815Д способен продуцировать АД в качестве основного продукта из фитостерина, поскольку у него блокирована активность ключевого фермента деструкции стероидного ядра — 3-кетостероид-9 $\alpha$ -гидроксилазы и снижена активность 3-оксостероид- $\Delta^1$ -дегидрогеназы при эффективном функционировании ферментов окисления алифатической боковой цепи фитостерина при C17 (Bragin et al., 2013). Дальнейшее восстановление 17-кето-группы АД с образованием тестостерона можно осуществлять с использованием штамма  $Nocardioides\ simplex\ BKM\ Ac-2033Д\ (Sukhodolskaya\ et al., 2017).$ 

Одной из основных проблем в достижении высокой эффективности биотрансформации стероидов является их низкая доступность для микробных клеток из-за чрезвычайно малой растворимости в воде (Goetschel, Bar, 1992). Частичное решение проблемы достигается путем применения смешивающихся с водой органических растворителей и детергентов (Sharma et al., 2012; Shao et al., 2016; Fernandez-Cabezon et al., 2017). Другим подходом является использование циклических олигосахаридов - циклодекстринов и, главным образом, их химически модифицированных производных, таких как метилированный В-циклодекстрин (МЦД), которые обеспечивают более высокую растворимость липофильных соединений даже при их высоких концентрациях. Повышение эффективности биоконверсии в присутствии МЦД было продемонстрировано при трансформации стеринов различными актинобактериями (Donova et al., 2007; Shen et al., 2011); а также для процессов восстановления АД до тестостерона с помощью дрожжей Saccharomyces cerevisiae (Singer et al., 1991) и мутантного штамма Mycobacterium sp. Et1 (Egorova et al., 2009); восстановления АДД до 1(2)-дегидротестостерона при последовательном использовании двух культур: Arthrobacter simplex CPCC 140451 и Pichia pastoris GS115 (Tang et al., 2019а), а также для других процессов биотрансформации стероидов.

Ранее было описано несколько каскадных микробиологических процессов биотрансформации стероидов. Например, биотрансформация холестерина в АДД осуществлялась путем поэтапного

применения штаммов A. simplex U-S-A-18 (=Rhodococcus equi USA-18; Yeh et al., 2014) и Mycobacterium sp. NRRLB-3683 (Lee et al., 1993). Нами был разработан эффективный способ получения 11αгидрокси-АД из фитостерина, основанный на окислении фитостерина бактериальным штаммом М. пеоаигит ВКМ Ас-1815Д до АД и его последующем селективном 11α-гидроксилировании штаммом гриба Aspergillus ochraceus BKM F-830 в одном биореакторе (Dovbnya et al., 2017). Недавно был описан двустадийный метод получения 1(2)дегидротестостерона из АД, предусматривающий 1(2)-дегидрирование АД клетками A. simplex СРСС 140451, инактивацию бактериальных клеток и последующее 17β-восстановление образующегося АДД рекомбинантным штаммом дрожжей P. pastoris GS115 до 1(2)-дегидротестостерона (Tang et al., 2019a). Другой метод получения 1(2)-дегидротестостерона, разработанный этими же авторами, основан на двуступенчатой биоконверсии фитостерина мутантными штаммами М. neoaurum TCCC 11028 и P. pastoris GS115, у которых были сверхэкспрессированы гены 3-оксостероид- $\Delta^1$ дегидрогеназы и 17В-ГСД соответственно (Tang et al., 2019b).

В настоящей работе мы исследовали возможность каскадного микробиологического получения тестостерона из фитостерина с использованием штаммов *М. пеоаигит* ВКМ Ас-1815Д и *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д. Трансформацию фитостерина указанными штаммами проводили как 1) последовательно, с инактивацией клеток *М. пеоаигит* после завершения первого этапа и последующим внесением покоящихся клеток *N. simplex* на втором этапе; 2) без инактивации миколицибактерий и внесением *N. simplex* непосредственно в ростовую среду. Предложены подходы, способствующие эффективному получению тестостерона при высоких нагрузках фитостерина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Реактивы.** В работе использовали следующие реактивы: фитостерин с общим содержанием стеринов 95.47% ("Jiangsu Fruit Biological Products Co., Ltd.", Китай); андростендион (АД), андростадиендион (АДД), тестостерон и 1(2)-дегидротестостерон ("Steraloids", США); НАД, НАД(Н) и  $\alpha$ , $\alpha$ -дипиридил ("Merk", Германия); дрожжевой экстракт ("Difco", США); соевый пептон ("Hi Media", Индия); МЦД ("Wacker Chemie", Германия). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации х.ч. или ч.д.а.

**Микроорганизмы.** Штаммы *М. пеоаигит* ВКМ Ac-1815Д и *N. simplex* ВКМ Ac-2033Д получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (ВКМ).



**Рис. 1.** Схема фракционирования биомассы *N. simplex*.

Культивирование штаммов. Культуры М. пеоаиrum BKM Ac-1815Д и N. simplex BKM Ac-2033Д выращивали при 30°C в течение 48 ч. Для культивирования М. neoaurum использовали среду следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O - 0.5$ ;  $KH_2PO_4 - 0.5$ ;  $(NH_4)_2HPO_4 - 1.5$ ; глицерин -10.0; дрожжевой экстракт — 10.0. Среда для культивирования N. simplex включала (г/л):  $K_2HPO_4$  ·  $3H_2O$  – 4.0;  $KH_2PO_4 - 2.0$ ; дрожжевой экстракт -6.0; соевый пептон -6.0; глюкоза -15.0. В обеих средах использовали дистиллированную воду и минеральные соли (г/л):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0.2$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O -$ 0.005; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O -0.002; pH доводили до 7.0-7.2до стерилизации. Штаммы выращивали в аэробных условиях в орбитальном шейкере-инкубаторе при 200 об./мин и 30°С.

Определение внутриклеточной локализации и активности  $17\beta$ -ГСД N. simplex in vitro. Для экспериментов in vitro замороженные при  $-70^{\circ}$ С клетки N. simplex разрушали на Фрэнч-прессе (при  $10.3 \, \mathrm{M}$  Па) и суспендировали в  $40 \, \mathrm{m}$ л  $50 \, \mathrm{m}$  М Трис-HCl с  $1 \, \mathrm{m}$  ЭДТА, рН 8 (Буфер A). Клеточный дебрис отделяли центрифугированием в течение  $2 \, \mathrm{u}$  при  $30\,000\,g$ ,  $4^{\circ}$ С. Мембранные фракции получали центрифугированием супернатанта в течение  $3 \, \mathrm{u}$  при  $100\,000\,g$ ,  $4^{\circ}$ С. Мембранные фракции ресуспендировали в  $40 \, \mathrm{m}$ л буфера  $\mathrm{A}$  и повторно центрифугировали (рис. 1).

Оценку активности полученных фракций в отношении АД и АДД проводили в присутствии НАД. Реакцию проводили в смеси: 100 мМ буфер Трис-HCl (рН 7.0); 100 мМ NaCl; 1.4 мМ НАДН или НАД (указано в тексте), 120 мМ субстрата; 500 мкл полученных активных клеточных фракций; 2 мл дистиллированной воды при 30°С, в течение 15 ч в микроаэрофильных (без перемешивания) или аэробных условиях (при перемешивании на орбитальном шейкере при 120 об./мин). Стероиды экстрагировали этилацетатом, экстракт упаривали, а затем ресуспендировали в этиловом спирте для анализа методом ТСХ.

**Биоконверсия АД и АДД культурой** *N. simplex*. Штамм *N. simplex* культивировали, как описано ра-

нее (Sukhodolskaya et al., 2017), затем клетки осаждали центрифугированием (4000 об./мин, 30 мин, 4°С) и вносили в количестве 8 г/л (с.б.) в 0.02 М Nа-фосфатный буфер (рН 7.0), добавляли 20 г/л глюкозы и 2 г/л АД или АДД, растворенных в диметилсульфоксиде (ДМСО) (4% об.). Инкубирование проводили при 30°С в микроаэрофильных условиях (в колбах объемом 100 мл, содержащих 50 мл итоговой смеси (соотношение газовой и жидкой фаз -1:1) при слабом перемешивании (70 об./мин).

Каскадная биоконверсия фитостерина в тестостерон. Трансформацию фитостерина (10 г/л) штаммом M. neoaurum проводили на среде для миколицибактерий (Egorova et al., 2002), как описано ранее (Bragin et al., 2013), в присутствии МЦД при мольном соотношении фитостерин—МЦД от 1:0.8 до 1:1.6.

По завершении трансформации фитостерина в АД (определяли методом TCX) 50 мл культуры M. neoaurum (подход 1) инактивировали путем прогревания при  $50^{\circ}$ С в течение 20 мин, переносили в колбы объемом 100 мл, затем вносили дополнительные компоненты (r/л): глюкозу (20), осажденные  $(4000 g, 30 \text{ мин, } 4^{\circ}\text{С})$  клетки N. simplex  $(4-36 r c.б./л (указано в тексте)). В отдельных экспериментах добавляли <math>\alpha,\alpha$ -дипиридил (4 мг/л), метанол (0.5-4%, об.), диметилформамид (1-4%, об.), ДМСО (2-8%, об.). Начальный рН среды составлял 7-8 (отмечено в тексте).

При реализации подхода 2 инактивацию *М. пеоаигит* не проводили, а переносили 25 мл культуральной жидкости с клетками миколицибактерий в колбу объемом 100 мл, содержащую 25 мл культуры *N. simplex* (8 г/л, с.б.) в стационарной фазе роста (48 ч) в ростовой среде, добавляли глюкозу (20 г/л) или глицерин (10 г/л), α,α-дипиридил (4 мг/л), ДМСО (4%, об.); рН смеси доводили до 8. Трансформацию проводили при 30°С в микроаэрофильных условиях (в колбах объемом 100 мл, содержащих 50 мл культуральной смеси (объемное соотношение газовой и жидкой фаз — 1:1) при слабом перемешивании (100 об./мин).

| , ,  | <i>I</i>                                 | ., ,                  | 7 · · · ·    |                         |
|--|--|-----------------------|--------------|-------------------------|
| Coformal                                     | Продукты биоконверсии и их выход, мол. % |                       |              |                         |
| Субстрат и кофактор -                        | АД                                       | АДД                   | тестостерон  | 1(2)-дегидротестостерон |
| Микроаэрофильные условия (без перемешивания) |  |                       |              |                         |
| АД + НАД(Н)                                  | _  | $21 \pm 5.4$          | $23 \pm 1.9$ | $10 \pm 2.1$            |
| АДД + НАД(Н)                                 | $10 \pm 2.3$                             | _                     | $7 \pm 1.1$  | $27 \pm 3.7$            |
| Тестостерон + НАД                            | $15 \pm 5.6$                             | $12 \pm 4.3$          | _            | $19 \pm 3.1$            |
| ı  | Аэробны                                  | е условия (орбитальны | ый шейкер)   | 1                       |
| Тестостерон + НАД                            | $40 \pm 4.2$                             | $24 \pm 2.7$          | _            | $9 \pm 0.9$             |

**Таблица 1.** Биоконверсия АД, АДД и тестостерона в присутствии коферментов НАД(Н) или НАД соответственно клеточным дебрисом *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д в аэробных и микроаэрофильных условиях

Определение веса сухой биомассы. Перед вторым центрифугированием клетки N. simplex отмывали от остатков среды  $0.02\,\mathrm{M}$  фосфатным буфером, рН 7.0, осаждали центрифугированием при  $4000\,g$ ,  $30\,\mathrm{M}$  мин при  $4^\circ\mathrm{C}$  и высушивали при  $105^\circ\mathrm{C}$  до постоянного веса.

Стероиды анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (TCX) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как описано panee (Lobastova et al., 2021).

Воспроизводимость результатов и статистические тесты. Эксперименты проводили в трех независимых повторностях, на основании которых рассчитывалась величина стандартного отклонения, отображенная на графиках и в табл. 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

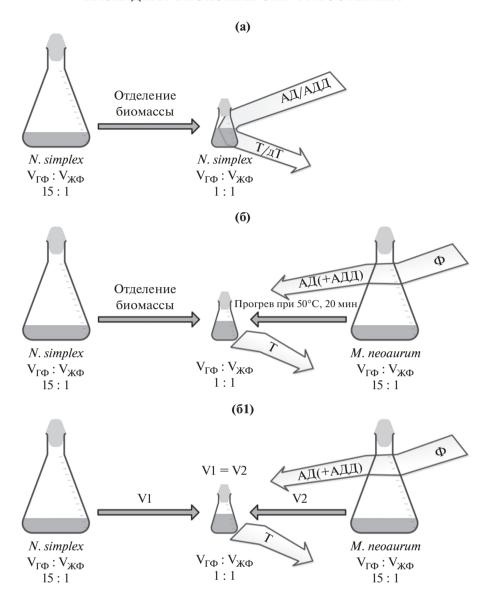
Изучение 17В-гидроксистероиддегидрогеназной активности (17-ГСД) штамма N. simplex in vitro. Клеточные фракции N. simplex, полученные как описано в разделе Материалы и методы (рис. 1), тестировали на активность в отношении С<sub>19</sub>-стероидов в аэробных или микроаэрофильных условиях. 17-ГСД-ферментативную активность наблюдали только во фракции клеточного дебриса. В микроаэрофильных условиях и в присутствии НАД(Н) АД и АДД конвертировались в тестостерон и 1(2)дегидротестостерон соответственно. Кроме этого, регистрировали образование АДД из АД, что свидетельствует о наличии 3-оксостероид- $\Delta^1$ -дегидрогеназной активности. Наблюдали и обратную реакцию гидрирования С1–С2-двойной связи, то есть превращение АДД в АД (табл. 1). Продуктами превращения тестостерона микроаэрофильных условиях были 1(2)-дегидротестостерон, АД и АДД (табл. 1). Таким образом, в микроаэрофильных условиях реакции 17β-восстановления и 1(2)-гидрирования протекали параллельно с 1(2)-дегидрированием.

Скорость ферментативного НАД(Н)-зависимого восстановления 17-кетогрупп АД и АДД за счет  $17\beta$ -ГСД-активности была практически одинаковой, а общий выход  $17\beta$ -восстановленных производных (тестостерон и 1(2)-дегидротестостерон) составлял 33 и 34% из АД и АДД соответственно (табл. 1). Таким образом, эксперименты *in vitro* подтвердили, что эффективное восстановление 17-кетогруппы 3,17-дикетоандростанов клетками N. *simplex* возможно только в восстановительных условиях.

Большинство 17 $\beta$ -ГСД могут катализировать обратимые окислительно-восстановительные реакции, но активность бактериальных ферментов, как правило, смещена в сторону окисления гидроксильной группы при С17, тогда как 17 $\beta$ -ГСД грибов предпочтительно катализируют восстановление С17-карбонильных групп (Donova et al., 2005b; Fernandez-Cabezon et al., 2017).

Об обратимом окислении двойной связи C1—C2 стероидного ядра сообщалось ранее (Hung et al., 1994; Egorova et al., 2002). Также известно, что микробиологическое восстановление АДД до тестостерона, при котором происходит восстановление как двойной связи C1—C2, так и восстановление C17-кетогруппы, часто протекает более эффективно, чем восстановление только C17-кетогруппы АД (Hung et al., 1994; Egorova et al., 2009). Это было показано также для штаммов рода Nocardia (Sharma et al., 2012) и подтверждается для N. simplex (табл. 1). Для эффективного восстановления 17-кетогруппы необходим высокий уровень НАД(H) (Fogal et al., 2010).

Таким образом, для эффективного восстановления карбонильной группы при С17 3,17-дикето-андростанов штаммом *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д необходимы восстановительные условия — снижение концентрации растворенного кислорода и обеспечение пула восстановительных кофакторов (НАД(Н)).



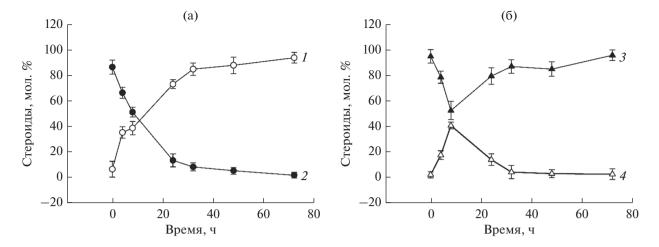
**Рис. 2.** Схема проведения экспериментов, в которых (а) экзогенные химически чистые АД и АДД трансформируются осажденными клетками N. simplex; (б) каскадная биотрансформация 10 г/л фитостерина в тестостерон осуществляется с применением инактивированной культуральной жидкости M. neoaurum и осажденных клеток N. simplex или (б1) неинактивированной культуры M. neoaurum и культуры N. simplex. Обозначения:  $\Phi$  — фитостерин, T — тестостерон, T — T

Дальнейшие эксперименты проводили *in vivo* в присутствии 20 г/л глюкозы в микроаэрофильных условиях, которые создавали добавлением большой биомассы осажденных клеток штамма *N. simplex*, использованием слабого перемешивания и сокращения объема газовой фазы.

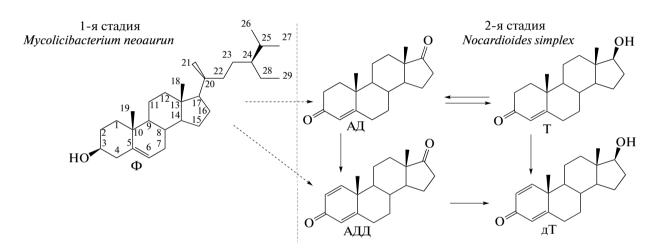
Биотрансформация АД и АДД штаммом *N. sim-plex in vivo*. В модельных экспериментах изучали особенности трансформации экзогенных химически чистых АД и АДД клетками *N. simplex* (рис. 2а и 3). Это исследование было необходимо для подтверждения возможности применения каскадной схемы, в которой культура *N. simplex* вносится в

содержащую АД(+АДД) культуральную жидкость, полученную в ходе трансформации фитостерина штаммом M. neoaurum.

В вышеуказанных условиях АДД почти полностью трансформировался клетками N. simplex в 1(2)-дегидротестостерон в течение 72 ч (рис. 3а). Биотрансформация АД в тестостерон активно протекала только в первые часы инкубирования, накопление тестостерона достигало  $40.8 \pm 2.7$  мол. % за 8 ч конверсии (рис. 36, кривая 4), затем наблюдалось обратное окисление тестостерона до АД (рис. 36, кривые 3 и 4). Известно, что в клетках микроорганизмов активность  $17\beta$ -ГСД зависит от



**Рис. 3.** Биотрансформация 2 г/л АДД (а) и АД (б) клетками N. simplex ВКМ-Ac 2033Д (по рис. 2a). Обозначения кривых: I — накопление 1(2)-дегидротестостерона; 2 — убыль АДД; 3 — изменение концентрации АД; 4 — изменение концентрации тестостерона.



**Рис. 4.** Схема каскадного получения тестостерона из фитостерина с применением штаммов *М. пеоаигит* ВКМ Ас-1815Д и *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д. Обозначения:  $\Phi$  — фитостерин, T — тестостерон, дT — 1(2)-дегидротестостерон.

соотношения концентраций НАД(H) к НАД (Kristan et al., 2003). Вероятно, истощение пула НАД(H) при трансформации АД является причиной сдвига  $17\beta$ -ГСД-активности в сторону окисления.

На рециклизацию восстановленной формы НАД может положительно влиять внесение глюкозы. Так, для штаммов *Rhodococcus ruber* Chol-4 и *Lactobacillus bulgaricus* было показано, что нежелательное окисление тестостерона до АД уменьшалось при добавлении глюкозы (Guevara et al., 2019).

Предпочтительное восстановление АДД по сравнению с АД в качестве субстрата для бактериальных 17β-ГСД было описано ранее (Singer et al., 1991; Egorova et al., 2009; Shao et al., 2016; Fernandez-Cabezon et al., 2017; Guevara et al., 2019). В некоторых случаях получить тестостерон из АД не

удалось совсем (Hung et al., 1994). Среди возможных причин авторы указывали более высокую токсичность АД для клеток микроорганизмов, а также различия физико-химических характеристик АД и АДД (Fernandes et al., 2003; Egorova et al., 2009).

Каскадная трансформация фитостерина в тестостерон при инактивировании культуры *М. пеоаигит* и последующем внесении осажденных клеток *N. simplex*. Изучали возможность применения каскадной биотрансформации фитостерина в тестостерон при последовательном использовании культур *М. пеоаигит* и *N. simplex*, которые конвертировали фитостерин в АД(+АДД), а затем в тестостерон соответственно (рис. 4).

Биотрансформацию 10 г/л фитостерина проводили с использованием культуры M. neoaurum (рис. 4) с получением 4.4 г/л АД и 0.5 г/л АДД. По-

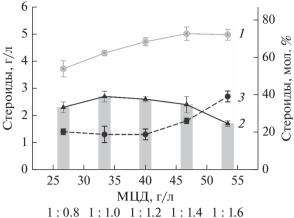
сле прогревания культуры M. neoaurum осажденные клетки N. simplex ресуспендировали в полученной культуральной жидкости, содержащей АД и АДД. Для оптимизации условий биоконверсии оценивали влияние содержания МЦД, вносимой биомассы N. simplex, значения pH, типа и концентрации органических растворителей, ингибитора активности  $9\alpha$ -гидроксилазы.

Влияние концентрации МЦД на каскадную биотрансформацию фитостерина. Как показано на рис. 5, суммарный выход АД и АДД (первая стадия каскадного процесса) увеличивался при повышении концентрации МЦД (кривая I). Однако максимальный выход тестостерона на второй стадии каскадного процесса незначительно изменялся в диапазоне мольных соотношений фитостерин—МЦД (1:0.8-1:1.4 (рис. 5, кривая 2)). При оптимальном содержании МЦД выход тестостерона из фитостерина (10 г/л) в варианте с использованием инактивации M. neoaurum составлял 35.3-36.7 мол. % (2.6-2.7 г/л).

Как отмечалось выше, циклодекстрины могут оказывать воздействие не только на стероиды, но и на клетки актинобактерий (Donova et al., 2007; Shen et al., 2011). До сих пор не сообщалось об отрицательном влиянии МЦД на миколицибактерии, в то время как в среде с гидроксипропил-βщиклодекстрином потеря как мембранных, так и внутриклеточных белков и липидов клетками *N. simplex* достигала в общей сложности более 40% по сравнению с контролем без применения циклодекстринов (Shen et al., 2011). Было также описано снижение эффективности биотрансформации АД при концентрации циклодекстринов выше оптимальной (Shao et al., 2016; Tang et al., 2019а).

Влияние количества вносимой биомассы N. sim*plex*. Увеличение содержания осажденных клеток N. simplex в 3-9 раз (с 4 до 36 г/л, с.б.) незначительно влияло на выход тестостерона при каскадной биотрансформации фитостерина (данные не представлены). Однако при трансформации АД рекомбинантным штаммом *P. pastoris* GS115 увеличение биомассы в 5-6 раз (до 200 г/л влажной биомассы) повышало выход тестостерона более чем в два раза (Shao et al., 2016). При каскадной трансформации фитостерина рекомбинантными штаммами M. neoaurum TCCC 11028 и P. pastoris GS115 более высокая биомасса дрожжей (концентрация влажных клеток 175 г/л) обеспечивала максимальную продукцию 1(2)-дегидротестостерона (Tang et al., 2019b).

Влияние α,α-дипиридила. В ходе биотрансформации АД(Д) штаммом *N. simplex* из-за наличия 9α-гидроксилазной активности, приводящей к разрыву кольца В стероидного ядра 1(2)-дегидрированных производных (Shtratnikova et al., 2021), наблюдали неполный материальный баланс стероидов. Бактериальная 3-оксостероид-9α-гидрокси-



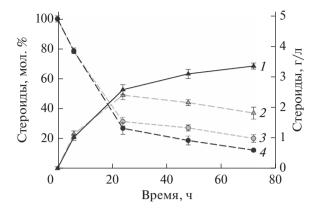
Молярное соотношение фитостерина к МЦД

**Рис. 5.** Влияние концентрации МЦД на суммарный выход АД и АДД (I) на стадии биотрансформации  $10 \, г/л$  фитостерина, осуществляемой M. neoaurum, а также на выход тестостерона (2) и содержание остаточного АД (3) на второй стадии каскадной биоконверсии, осуществляемой N. simplex (по рис. 26).

лаза состоит из субъединиц KshA (монооксигеназа) и KshB (редуктаза), кодируемых генами kshA и kshB соответственно. В геноме N. simplex выявлено три ортолога гена kshA (Shtratnikova et al., 2016), причем транскрипция двух из них увеличивалась при индукции фитостерином. Таким образом, деградация стероидного ядра по 9(10)-ceko-пути у N. simplex, по-видимому, обеспечивается продуктами генов kshA и kshB (Shtratnikova et al., 2021).

В данном исследовании концентрация тестостерона не увеличивалась после 24 ч инкубирования N. simplex с использованием культуральной жидкости, содержащей АД (рис. 6, кривая 2), в то время как уровень АД (рис. 6, кривая 3), АДД и 1(2)-дегидротестостерона снижался, что может быть связано с разрушением стероидного ядра. Добавление неспецифического ингибитора  $9\alpha$ -гидроксилазы,  $-\alpha$ ,  $\alpha$ -дипиридила, увеличивало период накопления тестостерона до 72 ч с увеличением его конечного выхода до 64.5-71.2 мол. % (рис. 6, кривая I), что свидетельствовало о снижении деструкции стероидов.

Влияние диметилсульфоксида (ДМСО). Известно, что органические растворители и детергенты обеспечивают распределение гидрофобных субстратов, таких как стероиды, в водной среде, тем самым обеспечивая более высокую скорость биоконверсии. Например, покоящиеся клетки штамма *A. simplex* (=*N. simplex*) ТССС 11037, обработанные 8% (об.) этанола, проявляли максимальную 1(2)-дегидрогеназную активность (Luo et al., 2014). С другой стороны, органические растворители могут вызывать повреждение клеточных мембран.

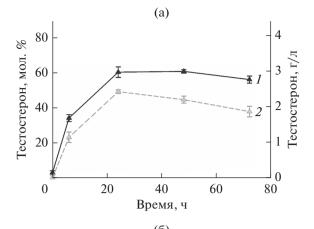


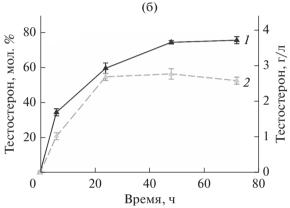
**Рис. 6.** Влияние  $\alpha$ , $\alpha$ -дипиридила на выход тестостерона (1, 2) и остаточную концентрацию АД (3, 4). 1, 4 — дополнительное внесение 0.4 мг  $\alpha$ , $\alpha$ -дипиридила; 2, 3— без внесения  $\alpha$ , $\alpha$ -дипиридила. Биотрансформацию 10 г/л фитостерина проводили с использованием штамма *М. пеоаигит* (по рис. 26) с выходом 4.4 г/л АД и 0.5 г/л АДД.

ДМСО — малотоксичный биполярный апротонный органический растворитель, который может изменять проницаемость клеточных мембран, облегчая перенос субстратов в клетки при сохранении их жизнеспособности. В наших экспериментах метанол (0.5—4.0%, об.) или диметилформамид (1.0—4.0%, об.) незначительно влияли на образование тестостерона во время второй фазы каскадной биотрансформации. Добавление 4% (об.) ДМСО обеспечивало увеличение выхода тестостерона на 11—13 мол. % (рис. 7а).

Влияние рН. Ранее было показано, что рН влияет на биотрансформацию АД в тестостерон актинобактериями (Liu, Lo, 1997; Egorova et al., 2009; Fernandez-Cabezon et al., 2017). В данной работе влияние рН на эффективность второй фазы каскадного превращения фитостерина оценивали в диапазоне рН 7.0-8.0. Восстановление 17-карбонильной группы АД(Д) наиболее активно протекало при рН 8.0 с достижением максимального выхода тестостерона 50.4 мол. % за 48-72 ч. Комбинированный эффект ДМСО (4%, об.) и рН 8.0 заключался в увеличении скорости накопления тестостерона и достижения его концентрации 3.6-3.7 г/л, что соответствует 75.5 мол. % на второй стадии каскадного процесса (АД → тестостерон) (рис. 7б). Выход тестостерона из фитостерина в этом случае составил 51.8-53.2 мол. %.

Каскадная биотрансформация фитостерина в тестостерон с применением неинактивированной культуры *М. пеоаигит* и клеток *N. simplex* в ростовой среде. С целью упрощения общей схемы получения тестостерона из фитостерина из нее исключили этапы инактивации культуры *М. пеоаигит* и отделения клеток *N. simplex* центрифугированием. При этом клетки *N. simplex* добавляли непосредственно в культуральную жидкость, содержа-





**Рис. 7.** Влияние рН и ДМСО на накопление тестостерона в ходе трансформации АД(+АДД)-богатой инактивированной культуральной жидкости M. neo-aurum осажденными клетками N. simplex. Биотрансформацию 10 г/л фитостерина проводили с использованием штамма M. neo-aurum (рис. 26) с выходом 4.4 г/л АД и 0.5 г/л АДД. Начальное значение рН содержащей АД(+АДД) инактивированной культуральной жидкости M. neo-aurum доводили до (a) 7.0, (б) 8.0. Обозначения кривых: I — дополнительно вносили 4% (об.) ДМСО; 2 — ДМСО не вносили.

щую культуру M. *пеоаигит* после биоконверсии фитостерина в АД(+АДД) (рис. 261).

Биоконверсию 10 г/л фитостерина культурой M. neoaurum проводили при молярном соотношении фитостерина к МЦД, равном 1:1.6 с получением 4.8 г/л АД. Таким образом, молярное отношение фитостерина к МЦД на второй стадии каскадной биотрансформации составило 1:0.8 (за счет двукратного разбавления при добавлении культуры N. simplex). Выход тестостерона из 10 г/л фитостерина при реализации этой схемы составил 2.40-2.65 г/л.

В контрольном варианте (без добавления клеток *N. simplex*) накопления тестостерона не наблюдали. Замена глюкозы глицерином на втором этапе полностью изменяла ход биотрансформации: тестостерон не образовывался, а основным стероидным продуктом был АД.

Ранее сообщалось, что при каскадной биотрансформации инактивация культуры, используемой на первом этапе, может положительно влиять на выход целевого продукта. Так, при внесении растущих культур A. simplex CPCC 140451 и P. pastoris GS115 в один биореактор биотрансформация АД в 1(2)-дегидротестостерон (болденон) была неэффективной, в то время как инактивация культуры A. simplex CPCC 140451 после первого этапа каскадной трансформации способствовала увеличению общего выхода 1(2)-дегидротестостерона (Tang et al., 2019a). В другом случае отсутствие этапа инактивации клеток стерилизацией культуральной жидкости при биотрансформации фитостерина культурой М. neoaurum M3M-ksdDR2 приводило к потере 1(2)-дегидротестостерона на 13% по сравнению с контролем (Тапд et al., 2019b).

Использование растущих культур M. neoaurum и N. simplex имеет практическое преимущество перед применением осажденных клеток N. simplex и инактивированной с помощью стерилизации культуральной жидкости M. neoaurum в перспективе промышленного получения тестостерона, поскольку позволяет сократить продолжительность каскадной биотрансформации, а также оборудование, энерго- и трудозатраты.

В данной работе были изучены особенности каскадной двуступенчатой биотрансформации фитостерина в тестостерон с использованием двух штаммов актинобактерий — M. neoaurum ВКМ Ac-1815Д и N. simplex ВКМ Ac-2033Д, осуществляющими селективную окислительную деградацию боковой цепи фитостерина и  $17\beta$ -восстановление образующихся андростендионов до тестостерона соответственно.

В экспериментах *in vitro* было показано, что восстановление 17-кетогруппы андростендионов (АД и АДД) наиболее эффективно катализируется мембранно-связанными ферментами в микроаэрофильных условиях в присутствии НАД(Н). В отличие от восстановления АЛЛ до 1(2)-дегидротестостерона, восстановление его 1(2)-насыщенного аналога, АД, в тестостерон с использованием клеток штамма N. simplex является обратимым. Для эффективной продукции тестостерона из АД необходимо повышение пула восстановительных эквивалентов, что может быть достигнуто путем добавления глюкозы и создания микроаэрофильных условий. Реализация каскадной биоконверсии фитостерина в тестостерон возможна как с использованием осажденных клеток, так и растущей культуры N. simplex. Найдены условия, обеспечивающие выход тестостерона до 53 мол. % при использовании высокой концентрации фитостерина (10 г/л).

Полученные результаты могут быть использованы в качестве основы создания "белой" био-

технологии производства тестостерона из возобновляемых растительных материалов на основе проведения двустадийной микробиологической трансформации фитостерина в одном биореакторе.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность к. б. н. Галине Викторовне Суходольской, прежде всего, за идею исследования, а также за неоценимую помощь в выборе и разработке методов, получении и обсуждении результатов и формулировке выводов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-64-00024).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данного исследования не имеют конфликта интересов и выполняли работу в соответствии с научной этикой и законодательством.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Dovbnya D.V., Schelkunov M.I., Pekov Y.A., Malakho S.G., Egorova O.V., Ivashina T.V., Sokolov S.L., Ashapkin V.V., Donova M.V. Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing Mycobacterium spp. strains // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2013. V. 138. P. 41–53.

Donova M.V., Dovbnya D.V., Sukhodolskaya G.V., Khomutov S.M., Nikolayeva V.M., Kwon I., Han K. Microbial conversion of sterol-containing soybean oil production waste // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2005a. V. 80. P. 155–160.

Donova M.V., Egorova O.V., Nikolayeva V.M. Steroid 17β-reduction by microorganism — a review // Process Biochem. 2005b. V. 40. P. 2253–2262.

Donova M.V., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V. Gulevskaya S.A., Suzina N.E. Methyl-β-cyclodextrin alters growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming mycobacteria // Microbiology (SGM). 2007. V. 153. P. 1981–1992.

Dovbnya D., Khomutov S., Kollerov V., Donova M.V. Obtaining of 11α-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from natural sterols // Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology. 2017. V. 1645. P. 259–269.

Egorova O.V., Gulevskaya S.A., Puntus I.F., Filonov A.E., Donova M.V. Production of androstenedione using mutants of Mycobacterium sp. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2002. V. 77. P. 141–147.

Egorova O.V., Nikolayeva V.M., Sukhodolskaya G.V., Donova M.V. Transformation of C 19-steroids and testosterone produc-

- tion by sterol-transforming strains of *Mycobacterium* spp. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2009. V. 57. P. 198–203.
- Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiroa H.M., Cabral J.M.S. Microbial conversion of steroid compounds: Recent developments // Enzyme Microb. Technol. 2003. V. 32. P. 688–705.
- Fernandez-Cabezon L., Galan B., Garcia J.L. Engineering Mycobacterium smegmatis for testosterone production // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 151–161.
- Fogal S., Motterle R., Castellin A., Arvotti G., Bergantino E. Biocatalyzed synthesis of testosterone // Chem. Eng. Trans. 2010. V. 20. P. 61–66.
- *Goetschel R., Bar R.* Formation of mixed crystals in microbial conversion of sterols and steroids // Enzyme Microb. Technol. 1992. V. 14. P. 462–469.
- Guevara G., Olortegui Flores Y., Fernández de las Heras L., Perera J., Navarro Llorens J.M. Metabolic engineering of Rhodococcusruber Chol-4: A cell factory for testosterone production // PLoS One. 2019. V. 14. e0220492.
- Gupta R.S., Lo B., Son J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 67.
- *Hung B., Falero A., Llanes N., Pérez C., Ramirez M.A.* Testosterone as biotransformation product in steroid conversion by *Mycobacterium* sp. // Biotechnol. Lett. 1994. V. 16. P. 497–500.
- Kristan K., Rizner T.L., Stojan J., Gerber J.K., Kremmer E., Adamski J. Significance of individual amino acid residues for coenzyme and substrate specificity of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus Cochliobolus lunatus // Chem. Biol. Interact. 2003. V. 143–144. P. 493–501.
- *Lee C.H.*, *Chen C.*, *Liu W.H.* Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using two-step microbial transformation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 38. P. 447–452.
- *Liu W.H.*, *Lo C.K.* Production of testosterone from cholesterol using a single-step microbial transformation of *Mycobacterium* sp. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 19. P. 269–272.
- *Lo C.K., Pan C.P., Liu W.H.* Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by a mutant of *Mycobacterium* sp. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 28. P. 280–283.
- Lobastova T., Fokina V., Tarlachkov S., Shutov A., Bragin E., Kazantsev A., Donova M. Steroid metabolism in thermophilic actinobacteria Saccharopolyspora hirsuta subsp. Hirsuta VKM Ac-666T // Microorganisms. 2021 Dec; 9(12): 2554
- Luo J., Ning J., Wang Y., Cheng Y., Zheng Y., Shen Y., Wang M. The effect of ethanol on cell properties and steroid 1-en-dehydrogenation biotransformation of *Arthrobacter simplex* // Biotechnol. Appl. Biochem. 2014. V. 61. P. 555–564.
- *Perez C., Falero A., LuuDuc H., Balcinde Y., Hung B.R.* A very efficient bioconversion of soybean phytosterols mixtures to androstanes by mycobacteria // J. Ind. Microbiol. 2006. V. 33. P. 719–723.
- Shao M., Zhang X., Rao Z., Xu M., Yang T., Li H., Xu Z., Yang S. Efficient testosterone production by engineered *Pichia pastoris* co-expressing human 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 and *Saccharomyces cerevisiae* glucose

- 6-phosphate dehydrogenase with NADPH regeneration // Green Chem. 2016. V. 18. P. 1774–1784.
- Sharma P., Slathia P., Somal P., Mehta P. Biotransformation of cholesterol to 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) by *Nocardia* species // Ann. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1651–1659.
- Shen Y., Wang M., Zhang L., Ma Y., Ma B., Zheng Y. Effects of hydroxypropyl-β-cyclodextrin on cell growth, activity, and integrity of steroid-transforming *Arthrobacter simplex* and *Mycobacterium* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. P. 1995–2003.
- Shtratnikova V., Schelkunov M., Fokina V., Bragin E.Y., Shutov A.A., Donova M.V. Different genome-wide transcriptome responses of *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D to phytosterol and cortisone 21-acetate // BMC Biotechnol. 2021. V. 21. Art. 7.
- Shtratnikova V.Y., Bragin E.Y., Dovbnya D.V., Pekov Y.A., Schelkunov M.I., Strizhov N.I., Ivashina T.V., Ashapkin V.V., Donova M.V. Complete genome sequence of sterol transforming Mycobacterium neoaurum strain VKM 1815D // Genome Announc. 2014. V. 2. P. e01177-13.
- Shtratnikova V.Y., Schelkunov V.I., Fokina V.V., Pekov Y.A., Ivashina T., Donova M.V. Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in Nocardioides simplex VKM Ac-2033D // Curr. Genet. 2016. V. 62. P. 643–656.
- Singer Y., Shity H., Bar R. Microbial transformations in a cyclodextrin medium. Part 2. Reduction of androstenedione to testosterone by Saccharomyces cerevisiae // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 35. P. 731–737.
- Sood U., Singh Y., Shakarad M., Lal R. Highlight on engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 73–75.
- Sukhodolskaya G., Fokina V., Shutov A., Nikolayeva V., Savinova T., Grishin Y., Kazantsev A., Lukashev N., Donova M. Bioconversion of 6-(N-methyl-N-phenyl)aminomethylandrostane steroids by *Nocardioides simplex* // Steroids. 2017. V. 118. P. 9–16.
- Tang R., Shen Y., Wang M., Zhou H., Zhao Y. Highly efficient synthesis of boldenone from androst-4-ene-3,17-dione by Arthrobacter simplex and Pichia pastoris ordered biotransformation // Bioproc. Biosyst. Eng. 2019a. V. 42. P. 933–940.
- Tang R., Shen Y., Xia M., Tu L., Luo J., Geng Y., Gao T., Zhou H., Zhao Y., Wang M. A highly efficient step-wise biotransformation strategy for direct conversion of phytosterol to boldenone // Bioresour. Technol. 2019b. V. 283. P. 242—250.
- Yeh C.-H., Kuo Y.-S., Chang C.-M., Liu W.-H., Sheu M.-L., Meng M. Deletion of the gene encoding the reductase component of 3-ketosteroid 9α-hydroxylase in *Rhodococcusequi* USA-18 disrupts sterol catabolism, leading to the accumulation of 3-oxo-23,24-bisnorchola-1,4-dien-22-oic acid and 1,4-androstadiene-3,17-dione // Microb. Cell Fact. 2014. V. 13. Art. 130.

## Cascade Biotransformation of Phytosterol to Testosterone by *Mycolicibacterium* neoaurum VKM Ac-1815D and *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D Strains

D. N. Tekucheva<sup>1, \*</sup>, V. V. Fokina<sup>1</sup>, V. M. Nikolaeva<sup>1</sup>, A. A. Shutov<sup>1</sup>, M. V. Karpov<sup>1</sup>, and M. V. Donova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia \*e-mail: tekuchevadn@gmail.com

Received December 13, 2021; revised January 24, 2022; accepted January 25, 2022

**Abstract**—New methods for testosterone production from phytosterol were developed based on its cascade two-stage transformation by actinobacteria *Mycolicibacterium neoaurum* VKM Ac-1815D and *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. Efficient oxidation of the phytosterol side chain by *M. neoaurum* resulted of androstenones, which were subsequently converted to testosterone by *N. simplex*. The latter reaction was reversible and catalyzed by the membrane-associated  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $17\beta$ -HSD) capable of both oxidation and reduction of androstendione at C17. Addition of glucose and limited aeration were found to be the key factors providing for a shift of the  $17\beta$ -HSD activity towards reduction in whole *N. simplex* cells. Testosterone production from phytosterol was realized using two approaches: (i) based on *M. neoaurum* cells inactivation after phytosterol conversion and application of the resting *N. simplex* biomass for androstenedione reduction and (ii) based on sequential application of the two living cultures. Under optimized conditions, the total yield of testosterone from phytosterol (10 g/L) reached 53 mol %. The results exceeded those reported so far for cascade phytosterol bioconversion to testosterone and may be used as a basis for development of new biotechnologies for production of the valuable steroid compounds, intermediates in the synthesis of modern medical preparations.

**Keywords:** cascade biotransformation, testosterone, phytosterol, actinobacteria, *Mycolicibacterium neoau*rum, *Nocardioides simplex* 

## \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

## АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА МАНУСКРИПТА XI ВЕКА КУЛЬТУРАЛЬНЫМИ И НЕ ИСПОЛЬЗУЮЩИМИ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕТОДАМИ<sup>1</sup>

© 2022 г. Н. Раисния<sup>а</sup>, Е. Арефян<sup>а, \*</sup>, М. А. Амузегар<sup>а, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran \*e-mail: arefian@ut.ac.ir

\*\*e-mail: amoozegar@ut.ac.ir

Поступила в редакцию 14.12.2021 г. После доработки 22.01.2022 г. Принята к публикации 22.01.2022 г.

Микробное сообщество (Bacteria, Archaea, Fungi) исторической рукописи было исследовано с помощью микроскопии (полевая эмиссионная сканирующая электронная микроскопия), культуральных методов и секвенирования на платформе Illumina MiSeq. Была изучена продукция гидролитических ферментов (целлюлаз, амилаз и протеаз) выделенными штаммами. Микроскопия напыленных золотом образцов бумаги выявила бактериальные клетки, конидии и мицелий грибов. Выделенные 11 бактериальных штаммов (роды Bacillus, Streptomyces, Corynebacterium) и 4 штамма грибов (роды Aspergillus и Alternaria) были идентифицированы с помощью сравнения последовательностей генов 16S рРНК и ITS фрагментов с последовательностями из баз данных EzBioCloud и MycoBank. Секвенирование на Illumina MiSeq выявило присутствие 20 родов бактерий, включая Pseudomonas, Bacillus, Citrococcus, Promicromonospora, Carnobacterium, Arthrobacter, Salinibacterium и Streptomyces. Pseudomonas лидировал по числу ридов (58%), а P. stutzeri был наиболее многочисленным видом бактерий (55.2%). Данные по ампликонам грибов указывали на присутствие 62 родов, в том числе Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Mucor и Chaetomium. Наиболее многочисленными родами были Penicillium (58.89%) и Aspergillus (33.02%), а P. polonicum (55.45%) и A. ruber (22.55%) были наиболее многочисленными видами грибов. Попытки обнаружения архей с помощью культуральных методов и высокопроизводительного секвенирования дали отрицательный результат. Анализ ферментативной активности микробных изолятов выявил опасность биодеградации. Было показано, что комбинация культуральных методов и высокопроизводительного секвенирования предпочтительнее использования этих подходов по отдельности.

**Ключевые слова:** биодеградация, культивируемые микроорганизмы, секвенирование нового поколения, Illumina MiSeq, ферментная активность, бумажные материалы

**DOI:** 10.31857/S0026365622300115

Архивные и библиотечные ресурсы — это ценная часть культурного наследия, представляющая различные аспекты культурной и общественной жизни народа и его научные достижения в различные исторические периоды. Защита этих сокровищ — важное и ответственное дело. Постоянный мониторинг и контроль вредных факторов являются важнейшими компонентами стратегии хранения и помогают увеличить стабильность и сохранность документальных памятников. Факторы, разрушающие бумагу, можно разделить на три группы: физические, химические и биологические. Микроорганизмы играют ключевую роль в разрушении библиотечных ресурсов. Таким об-

разом, описание разнообразия микробных сообществ – важный шаг в разработке превентивных стратегий сохранения и соответствующих восстановительных мер. Бумажные материалы, так же как и другие объекты культурного наследия, могут быть заселены различными группами микроорганизмов. Большинство грибов и бактерий, заселяющих эти материалы, устойчивы к таким неблагоприятным факторам окружающей среды, как низкая влажность и могут разрушать органические вешества, проявляя мошную ферментативную активность (Savković et al., 2019). Биоразрушение, вызванное микроскопическими грибами и бактериями, может проявляться, например, как появление цветных пятен и снижение механической прочности бумажных материалов (Gutarowska, 2016; Sequeira et al., 2019) вследствие синтеза пигментов микроорганизмами, а также взаимодей-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622300115 для авторизованных пользователей.

ствия между секретируемыми ими веществами и составляющими бумаги, образования биопленок и разрушения органических соединений (Sterflinger, Pinzari, 2012).

Ранее состав микробных сообществ, связанных с бумагой и объектами культурного наследия, изучался с помощью микроскопии и культуральных методов (Tarsitani et al., 2014). Культуральные методы - золотой стандарт микробиологических исследований - позволяют изучить физиологические и метаболические характеристики биодеструкторов. Однако было показано, что этими методами выявляется лишь небольшая доля (<1%) разнообразия микробных сообществ архивных и библиотечных материалов (Karakasidou et al., 2018). Они могут идентифицировать только живые культивируемые микроорганизмы. С другой стороны, многие микроорганизмы, культивируемые in vitro, растут медленно или требуют специальных сред (Schabereiter-Gurtner et al., 2001; Duan et al., 2017). В последние десятилетия для определения факторов, разрушающих объекты культурного наследия, стали применяться молекулярные методы на основе ПЦР, такие как клонирование и секвенирование по Сэнгеру (технология первого поколения). В то же время, микробные сообщества нескольких объектов культурного наследия были охарактеризованы с помощью методов ДНК фингерпринтинга, например, гель-электрофореза в денатурирующем градиенте (Joseph, 2021). Большинство этих методов имеют недостатки, такие как высокая стоимость, значительные затраты времени и низкая производительность, и тоже определяют только небольшую часть микробного разнообразия естественных образцов (Otlewska et al., 2014). К счастью, в последнее время, благодаря разработке технологий секвенирования нового поколения (NGS), таких как платформа Illumina, стало возможным осуществлять одновременно тысячи и миллионы реакций секвенирования в бесклеточных системах. В результате микробные сообщества различных систем, в том числе, объектов культурного наследия, можно идентифицировать с более высокой эффективностью при меньших затратах (Duan et al., 2017; Liu et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Манускрипт Al-adoviah al-Mufradah — шедевр фармакологии. Автором этого труда был врач и фармацевт из Андалузии Абу Бакр Хамед Ибн Самаджун (XI в. н. э.). Составляя эту книгу, Ибн Самаджун с критической точки зрения представил сведения о ряде лекарственных средств, разработанных его предшественниками и современниками, и выразил собственные взгляды. В 1992 г. Fuad Sezgin опубликовал все известные на тот момент разделы в виде четырех иллюстрированных томов и в предисловии отметил, что часть манускрипта, содержавшая введение и сведения о лекарствах на первых пять букв алфавита, была

утрачена. К счастью, усилиями экспертов Национальной Библиотеки и Архивов Ирана (NLAI) эта утраченная часть была обнаружена в личной библиотеке коллекционера из Табриза, и уникальное медицинское собрание удалось восстановить. В настоящее время манускрипт находится в хранилище редких книг NLAI.

В числе видимых повреждений структуры и бумажных листов книги можно назвать обесцвечивание бумаги, фоксинг (красновато-коричневые цветные пятна), расплывчатые коричневые и серые пятна, хрупкость, ухудшение состояния полей и переплета книги. Ввиду исторической древности этого произведения и его длительного хранения в неблагоприятных условиях окружающей среды, существовала возможность его биологического загрязнения и колонизации разрушающими микроорганизмами (рис. S1).

В данной работе ставились следующие задачи: дать описание микробных сообществ (грибов, бактерий и архей), населяющих манускрипт, с помощью культуральных методов и высокопроизводительного секвенирования ампликонов, оценить продукцию гидролитических ферментов микробными изолятами, которые, вероятно, участвовали в деградации органических соединений материала рукописи, и идентифицировать микробные группы, присутствующие в хранилище редких книг, с целью оценки потенциальных биологических рисков для других объектов из бумаги.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы. Манускрипт Al-adoviah al-Mufradah хранится на компактных полках при температуре 23-25°C и относительной влажности 30-40% в хранилище редких книг NLAI. Пробы для изучения культивируемых микроорганизмов были взяты в десяти разных местах книги, каждая с площади примерно 1 см $^2$  (общая площадь 10 см $^2$ ), в том числе четыре пробы с первой страницы (FP1-FP4), одна проба с передней кромки (FE), две пробы с внутренних страниц (IP1 и IP2) и три пробы с последней страницы книги (ЕР1–ЕР3). Пробы из этих областей были собраны с помощью стерильных тампонов и сразу же использованы для биологической культуры (табл. S1 и S2). Для метагеномного исследования пробы с этих участков были отобраны повторно с помощью стерильных тампонов и скальпелей. С учетом исторической ценности книги и во избежание физических повреждений, было собрано минимальное количество бумажных фрагментов, только с полей и пустых страниц. Некоторые из этих бумажных фрагментов были использованы для полевой эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (ПЭСЭМ). Поскольку материал каждого отдельного фрагмента был непредставителен для выделения ДНК, кусочки бумаги, полученные с десяти участков, объединили в общий образец. До момента выделения ДНК мазки и фрагменты бумаги хранились при –20°С.

ПЭСЭМ. Фрагменты бумаги (диаметром примерно 2—3 мм) помещали на предметное стекло на двустороннюю углеродную клейкую ленту и напыляли слоем золота толщиной примерно 15 нм в устройстве для напыления Quorum Q150T ES. Затем образцы анализировали и фотографировали с помощью ПЭСЭМ (Nova NanoFESEM 450) в режиме высокого вакуума при давлении в камере 0.10 мбар и напряжении 10 кВ, чтобы оценить их возможную колонизацию микробными сообществами и физическую деформацию целлюлозных волокон.

Измерение рН. рН бумаги определяли по методу, предложенному Strlič и соавт., с небольшими изменениями (Strlič et al., 2004). На бумагу наносили каплю дистиллированной воды и к влажной поверхности аккуратно прижимали электрод с плоским наконечником (Metrohm 6, 0253, 100); значение рН фиксировали через 30 с (когда оно стабилизировалось) с помощью рН-метра Metrohm 691 (Швейцария). Окончательный результат определяли как среднее значений, полученных в пяти различных точках.

**Культуральные методы.** Мазки проб культивировали на среде SDA (Sabouraud Dextrose Agar, "Merck", Германия) для выделения грибов, на средах R2A (Reasoner's 2A agar, "Merck") и TSA (Tryptic Soy Agar, "Merck") для выделения бактерий и на среде MGM (Modified Growth Medium) с общим содержанием солей 23% для выделения осмофильных и галофильных архей (Nikou et al., 2017). Среда MGM (23%) имела следующий состав (г  $\pi^{-1}$ ): NaCl, 184; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 23; MgSO<sub>4</sub>, 26.83; KCl, 7.76; NaBr, 0.61; пептон, 5.0; дрожжевой экстракт, 1.0, и агар, 18; рН доводили до 7.5 с помощью Трис-HCl. Для выделения грибов и бактерий чашки инкубировали 7 сут при 28°C, а для выделения архей — 21 сут при 37°C.

После очистки изолятов и их первичной идентификации на основе морфологии колоний, данных микроскопии и биохимических тестов для бактерий (в том числе на каталазу и оксидазу), повторяющиеся штаммы были классифицированы и подсчитаны. Молекулярную идентификацию штаммов проводили путем амплификациии и секвенирования бактериальных генов 16S рРНК и фрагментов ITS грибов. Геномную ДНК изолятов выделяли с помощью специализированных наборов: Gram-positive bacteria miniprep genomic DNA extraction kit (Iranian Biological Resource Center, IBRC) для бактерий и Plant Mini-Prep genomic DNA Extraction Kit (IBRC) для грибов, в соответствии с протоколом производителя. Качество выделенной ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Гены

16S рРНК изолятов бактерий амплифицировали с помощью универсальных праймеров 27F и 1492R: в изолятах грибов участок ITS амплифицировали с праймерами ITS4 и ITS5. Последовательности праймеров приведены в табл. S3. Реакционная смесь имела следующий состав: 0.25 мкл Таа ДНК полимеразы (1 ед./мкл), 2.5 мкл ПЦР буфера (1×), 1.5 мкл MgCl<sub>2</sub> (2.5 мМ), 2 мкл dNTPs (0.6 мМ), по 0.5 мкл (0.4 мкМ) прямого и обратного праймеров, 1 мкл (20 нг) матрицы ДНК, стерильная деионизованная вода до общего объема 25 мкл. ПЦР проводили при следующих условиях: стартовая денатурация при 95°C (5 мин); 35 циклов денатурации при  $94^{\circ}$ C (20 c), отжига при  $54^{\circ}$ C (30 c) и синтеза при 72°C (45 c): заключительная достройка при 72°C (10 мин). Продукты ПЦР выявляли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с маркером 1 kb plus DNA ladder ("Sigma-Aldrich"). Продукты ПЦР очищали с помощью набора для экстракции из геля (IBRC, Иран) согласно инструкции и секвенировали в компании FAZA Biotech (Иран). Полученные последовательности редактировали с помощью программы Chromas Рго и сравнивали с геномными базами данных EzBioCloud и MycoBank для изолятов бактерий и грибов соответственно. Последовательности генов 16S рРНК и фрагментов ITS были выложены в базу данных NCBI (коды доступа приведены в табл. 1 и 2).

Оценка ферментативной активности. Выделенные штаммы были исследованы с точки зрения их способности разрушать основные органические соединения в составе манускрипта (целлюлозу, крахмал и белок). Для оценки целлюлозолитической, амилолитической и протеолитической активности изоляты грибов и бактерий высевали точечно на среды CMC Agar (состав,  $\Gamma \pi^{-1}$ : карбоксиметилцеллюлоза, 0.5; NaNO<sub>3</sub>, 0.1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1; MgSO<sub>4</sub>, 0.05; дрожжевой экстракт, 0.05; агар, 15), Starch Agar ("Himedia", Германия) и Skim milk Agar ("Himedia") соответственно. Чашки с культурами бактерий и грибов инкубировали при 28°С в течение 48 и 72 ч соответственно. Для обнаружения целлюлозолитической активности чашки окрашивали Конго красным (0.01%) и раствором йода по Граму и измеряли зону просветления (гало) вокруг колоний (Kasana et al., 2008). Чашки с крахмальным агаром окрашивали раствором йода по Граму. Амилолитическую и протеолитическую активность оценивали, измеряя диаметр светлой и прозрачной зоны на агаре с крахмалом и с обезжиренным молоком соответственно.

Выделение геномной ДНК из смеси фрагментов бумаги и мазков проводили с помощью коммерческого набора QIAamp Fast DNA Stool Mini-Kit (Germany) в соответствии с инструкцией изгото-

| Изоляты<br>бактерий | Длина<br>последовательности,<br>п.н | Ближайший идентифицированный<br>филогенетический родственник<br>(номер в базе данных EzBioCloud | Сходство,<br>% | Номер доступа<br>в базе NCBI |
|---------------------|-------------------------------------|---|----------------|------------------------------|
| B1                  | 1071                                | Bacillus atrophaeus, JCM 9070 (AB021181)  | 99.9           | MT279976                     |
| B2                  | 1279                                | Bacillus mojavensis, RO-H-1 (GH600280)  | 99.84          | MT273667                     |
| В3                  | 1071                                | Corynebacterium sanguinis, CCUG 58655 (FJ269041)  | 100            | MT274328                     |
| B4                  | 1408                                | Bacillus filamentosus, SGD-14 (KF265351)  | 99.9           | MT274417                     |
| B5                  | 1404                                | Bacillus velezensis, CR-502 (AY603658)  | 99.7           | MT276229                     |
| B6                  | 1362                                | Streptomyces rochei, NPRL B-2410 (MUMD01000370)   | 99.9           | MT276256                     |
| B7                  | 1414                                | Bacillus humi, LGM 22167 (AJ627210)   | 98.6           | MT276316                     |
| B8                  | 1416                                | Bacillus niacini, IFQ 15566 (AB021194)  | 100            | MT276317                     |
| B9                  | 1105                                | Bacillus cheonanensis, PFS-5 (JQ966280)   | 99.7           | MT276846                     |
| B10                 | 1404                                | Bacillus licheniformis, ATCC 14580 (AE017333)   | 99.6           | MT276852                     |
| B11                 | 1415                                | Bacillus idriensis, SMC 4352-2 (AY904033)   | 100            | MT277111                     |

**Таблица 1.** Результаты секвенирования генов 16S рРНК бактериальных изолятов и определение ближайших родственных штаммов в соответствии с базой данных EzBioCloud

**Таблица 2.** Результаты секвенирования ITS фрагментов изолятов грибов и определение ближайших родственных штаммов в соответствии с базой данных MycoBank

| Изоляты<br>грибов | ПОСПЕПОРЯТЕПЬНОСТИ | Ближайший идентифицированный филогенетический родственник (номер в базе данных МусоВапк |      | Номер доступа<br>в базе NCBI |
|-------------------|--------------------|---|------|------------------------------|
| F1                | 549                | Aspergillus versicolor  | 100  | MT277425                     |
| F2                | 788                | Aspergillus sydowii   | 99.8 | MT277426                     |
| F3                | 707                | Alternaria alternata  | 99.5 | MT277427                     |
| F4                | 623                | Aspergillus niger   | 100  | MT277428                     |

вителя. Результат проверяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле.

ПЦР. Для амплификации генов 16S рРНК прокариот и фрагментов ITS грибов использовался двухэтапный протокол ПЦР. На первом этапе проводили ПЦР с геноспецифичными праймерами, а на втором этапе использовали набор праймеров с адапторами (для совместимости матрицы с ячейкой) и индексными последовательностями (уникальными для каждого образца). В первом туре участок V3—V4 генов 16S рРНК бактерий и архей амплифицировали с метагеномными праймерами 0341F/0785R и 0349F/0785R. Фрагмент ITS2 грибов амплифицировали с праймерами ITS3F/ITS4R. Последовательности праймеров приведены в табл. S4.

В первом туре ПЦР реакционная смесь имела следующий состав: 2.5 мкл буфера для ПЦР (1×), 2.5 мкл MgCl<sub>2</sub> (2.5 мМ), 1.5 мкл dNTPs (0.6 мМ), по 0.75 мкл (0.3 мкМ) прямого и обратного праймеров, 0.2 мкл Taq ДНК полимеразы (1 ед./мкл), 1 мкл (5 нг) матрицы ДНК, стерильная деионизованная вода до общего объема 25 мкл. Реакцию

проводили при следующих температурных условиях: начальная денатурация при 95°C (5 мин); 25 циклов денатурации при 95°C (20 c), отжига при 55°С (30 с) и синтеза при 72°С (40 с); завершающая достройка при 72°C (10 мин). Чтобы проверить качество амплификации, продукты первого тура ПЦР анализировали в 1.5% агарозном геле с маркером размеров Gene ruler 50bp ("Thermo Scientific"). Далее продукт первого тура служил матрицей во втором туре ПЦР. Концентрации компонентов и температурные условия во втором туре ПЦР были такими же, как и в первом туре, с тем отличием, что проводилось 15 циклов реакции вместо 25 (последовательности праймеров с бар-кодами приведены в табл. S5). Продукты второго тура ПЦР наносили на агарозный гель (1.5%), разделяли электрофорезом, вырезали полосы с ампликонами ллиной 480-580 п.н. и очищали их с помощью набора для экстракции из геля ("Qiagen", Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Подготовка библиотек и секвенирование. Концентрацию ДНК в препаратах очищенных ампли-

конов бактерий и грибов определяли с помощью набора Invitrogen<sup>тм</sup> Qubit<sup>тм</sup> dsDNA BR Assay Kit (Великобритания) и приводили к стандарту 10 нг  $\pi^{-1}$ . Затем препараты отправляли в компанию "Масrogen" (Korea) для секвенирования на платформе Illumina MiSeq  $2 \times 300$ .

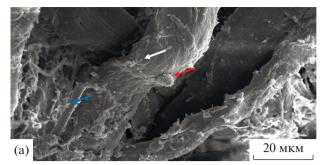
Обработка и анализ данных секвенирования. Сырые данные FASTQ обрабатывали и анализировали с помощью программного пакета ОПМЕ2-2019.4. После демультиплексирования исходных данных с помощью плагина q2-demux качество прочтений визуализировали на графике Interactive Quality и определяли параметры для удаления шумов. Парные прочтения объединяли командой qiime dada2 denoise-paired. Таксономическую классификацию операционных таксономических единиц (ОТЕ) проводили с помощью a2-feature-classifier, сравнивая репрезентативные последовательности с базами данных Greengenes (v. 13.8) для бактерий и UNITE (v. 8.3) для грибов. Следует отметить, что классификация грибов, используемая в нашей работе, соответствует ссылкам, приведенным в базе данных UNITE (Tedersoo et al., 2018). Необработанные риды FASTQ были выложены в раздел Sequence Read Archive (SRA) базы данных NCBI (номер доступа SRA: PRJNA658545).

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Физические характеристики. При анализе образцов бумаги с золотым напылением с помощью ПЭСЭМ в режиме высокого вакуума среди целлюлозных волокон были видны клетки бактерий, конидии и мицелий грибов. По-видимому, присутствие микробного сообщества вызвало разрушение и расслаивание целлюлозных волокон (рис. 1). Среднее значение рН образцов — 4.1.

Микробное разнообразие по данным культуральных методов. Из проб, взятых с тестируемых участков, были выделены четыре штамма грибов и 11 штаммов бактерий; эти штаммы идентифицировали молекулярными методами. Следует отметить, что на чашках со средой МGМ для выделения осмофильных и галофильных архей роста не наблюдалось, и культивируемых архей выделено не было. Результаты секвенирования фрагментов генов 16S рРНК и ITS и их сравнения с базами данных EzBioCloud и МусоВапк представлены в табл. 1 и 2 соответственно. Число колоний (КОЕ/см²), связанных с изолятами бактерий и грибов в различных местах рукописи приведено в табл. S1 и S2.

Синтез гидролитических ферментов. Результаты тестов на продукцию ферментов гидролиза (целлюлаз, амилаз и протеаз) выделенными микробными штаммами приведены в табл. 3. Результаты оценивались по диаметру зоны просветления в соответствующих средах культивирования.



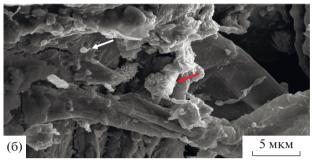


Рис. 1. Микрофотографии бумаги из манускрипта *Aladoviah al-Mufradah*, полученные с помощью ПЭСЭМ в высоком вакууме с золотым напылением образцов. (а) Общий вид заселения целлюлозных волокон клетками бактерий (белая стрелка), мицелием и спорами грибов (красная стрелка). Видны кристаллы соли (синяя стрелка) и расслоение волокон целлюлозы. Увеличение 4000×. (б) Отдельные клетки бактерий и цепочки клеток; структуры с отростками, напоминающими конидии грибов. Можно отличить клетки бактерий (меньше 1 мкм, белая стрелка) от конидий грибов (красная стрелка). Увеличение 13000×.

Применительно к результатам, полученным нами для изолятов бактерий и грибов (табл. 3), стоит отметить следующее. Три из девяти штаммов рода Bacillus, а именно: B1, B5 и B10 (родственные В. atrophaeus, В. velezensis и В. licheniformis соответственно), производили все три типа ферментов (целлюлазы, амилазы и протеазы). Для трех штаммов *Bacillus*, а именно: В2 (родственный В. mojavensis), В4 (родственный В. filamentosus) и В11 (В. idriensis), наблюдался синтез двух ферментов: амилазы и протеазы у В2 и целлюлазы и протеазы у В4 и В11. У двух других штаммов рода Bacillus, В8 (В. niacini) и В9 (родственного B. cheonanensis), наблюдался только один тип ферментативной активности: целлюлазная у В8 и протеазная у В9. У штамма В7 (родственного В. humi) гидролитическая активность отсутствовала. Два изолята, представляющих Actinobacteria, B3 (Corynebacterium sanguinis) и B6 (родственный Streptomyces rochei), синтезировали только целлюлазу. Тесты на ферменты гидролиза у изолятов грибов показали, что три штамма (F1, F2 и F3), в том числе два штамма рода Aspergillus (poдственные A. versicolor и A. sydowii) и один штамм рода Alternaria (Alt. alternata), проявляли

**Таблица 3.** Гидролитическая активность штаммов бактерий (В) и грибов (F), наблюдаемая после 48 и 72 ч культивирования соответственно

| Изоляты<br>бактерий<br>и грибов | Целлюлазы | Амилазы | Протеазы |
|---------------------------------|-----------|---------|----------|
| B1                              | ++        | +       | +++      |
| B2                              | _         | ++      | +++      |
| B3                              | +         | _       | _        |
| B4                              | +         | _       | ++       |
| B5                              | ++        | ++      | +++      |
| B6                              | ++        | _       | _        |
| B7                              | _         | _       | _        |
| B8                              | ++        | _       | _        |
| B9                              | _         | _       | +        |
| B10                             | ++        | +       | ++       |
| B11                             | ++        | _       | +++      |
| F1                              | +         | +       | +        |
| F2                              | ++        | +       | ++       |
| F3                              | +         | +       | ++       |
| F4                              | +++       | _       | _        |

Гидролизная активность: "-" — отсутствует (нет гало); "+" — низкая (гало до 1.5 см в диаметре); "++" — умеренная (гало до 2.5 см в диаметре); "+++" — сильная (гало до 3.5 см в диаметре).

все три типа активности. У изолята F4 (*A. niger*) был подтвержден синтез целлюлазы, но активности амилаз и протеаз не наблюдалось. Таким образом, подавляющее большинство изолятов бактерий и грибов (за исключением штаммов B2, B7 и B9) могли производить целлюлазу. Протеазная активность наблюдалась у меньшего числа изолятов, и часть штаммов (B3, B6, B7, B8, и F4) не проявляли протеазной активности. Амилазная активность наблюдалась у семи из 15 изолятов (B1, B2, B5, B10, и F1, F2, F3).

Микробное разнообразие по данным высокопроизводительного секвенирования. Результаты секвенирования на платформе Illumina были получены в форме двух файлов FASTQ, представляющих библиотеки грибов и бактерий. Тот факт, что в первом туре ПЦР не наблюдалось амплификации архейных генов 16S рРНК (участок V3—V4) указывает, что этот домен не представлен в составе микробного сообщества манускрипта.

Состав сообщества бактерий по данным секвенирования. После обработки данные по бактериям включали 6589 валидных ридов, которые были отнесены к 63 ОТЕ; в результате таксономической классификации были идентифицированы 20 родов и семь видов. Согласно данным метагеномного секвенирования, сообщество бактерий включало три филума. Самым многочисленным

был филум *Proteobacteria* (74.16% ридов; 41 ОТЕ); за ним следовали Actinobacteria (16.57% ридов; 10 OTE) и Firmicutes (9.12% ридов; 10 OTE). На уровне класса, 70.92% ридов относились к Gammaproteobacteria, 16.57% ридов — к Actinobacteria, 9.12% ридов — к Bacilli и 3.25% ридов — к Alphaproteobacteria. На уровне семейства наиболее многочисленными были Pseudomonadaceae (58.0%), Enterobacteriaceae (11.1%), Micrococcaceae (10.1%), и Bacillaceae (5.9%). Остальные 15% ридов составляли другие семейства бактерий. На уровне рода самыми многочисленными были представители Pseudomonas (58%), а самым многочисленным видом по числу ридов был Pseudomonas stutzeri (55.2%). Состав сообщества бактерий на уровне филумов, семейств и родов представлен на диаграммах рис. 2.

Состав сообщества грибов по данным секвенирования. Данные, относящиеся к грибам, после удаления шумов, слияния и фильтрации химер включали 57 353 достоверных прочтений и были отнесены к 139 ОТЕ. Наиболее представленным по числу ридов и ОТЕ был филум Ascomycota: 96.55% ридов; 96 ОТЕ. Кроме того, в сообществе были обнаружены представители филумов Миcoromycota (1.70% ридов; 3 ОТЕ) и Basidiomycota (1.04% ридов; 26 ОТЕ); небольшое число оставшихся ридов были отнесены к Rozellomycota (0.41% ридов; 1 OTE) и Entorrhizomycota (0.003% ридов; 1 ОТЕ). Всего в сообществе грибов было аннотировано 59 семейств, 62 рода и 54 вида. Наиболее представленным семейством оказались Aspergillaсеае (92.0%). Наиболее многочисленными таксонами в сообществе оказались *Penicillium* (58.89%) и Aspergillus (33.02%) на уровне рода и Penicillium polonicum (55.45%) и Aspergillus ruber (22.55%) на уровне вида. Состав сообщества грибов на уровне филумов, семейств и родов представлен на диаграммах рис. 3.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительный анализ фрагментов бумаги с помощью ПЭСЭМ выявил сравнительно плотное микробное обсеменение бумажных волокон, в том числе клетки бактерий и структуры грибов (конидии и мицелий). Изображения, полученные при меньшем увеличении, показали отложение кристаллов соли вдоль целлюлозных волокон, что может быть обусловлено процессами производства бумаги, проклейкой и примесями в материалах. Согласно исследованиям биодеградации объектов культурного наследия, некоторые бактерии и грибы, в том числе Aspergillus, Penicillium, Bacillus, Arthrobacter и Streptomyces, могут выделять органические кислоты, которые растворяют материал и образуют отложения соли, видимые на изображениях SEM (Bicchieri et al., 2019).

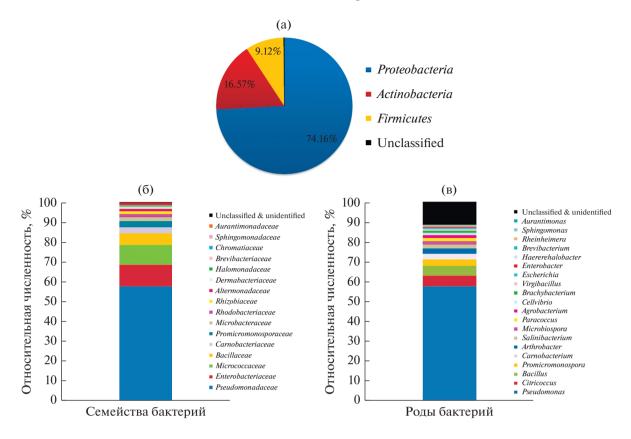


Рис. 2. Доля в сообществе различных групп бактерий на уровне филумов (а), семейств (б) и родов (в).

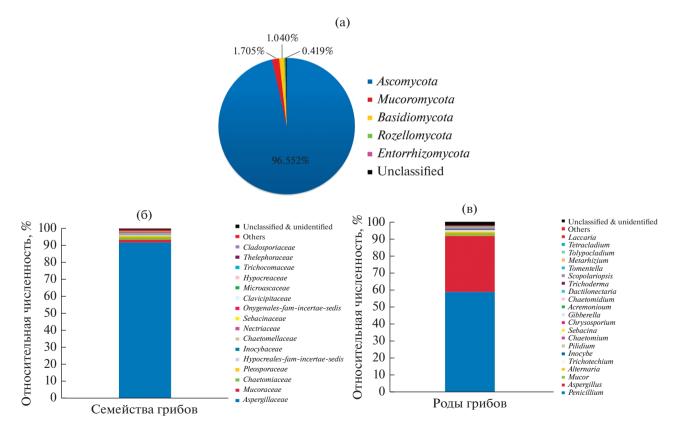


Рис. 3. Доля в сообществе различных групп грибов на уровне филумов (а), семейств (б) и родов (в).

После предварительной оценки с помощью ПЭСЭМ с нескольких участков бумаги были неинвазивно взяты пробы, чтобы оценить жизнеспособность микроорганизмов. В результате последующего культивирования были выделены штаммы, представляющие сообщества бактерий и грибов. Поиск архей в микробном сообществе манускрипта, как культуральными методами, так и с помощью высокопроизводительного секвенирования, дал отрицательный результат. Данные, приведенные в табл. S1 и S2, показывают, что плотность культивируемых микроорганизмов на единицу площади (KOE/cm<sup>2</sup>) на первой и последней страницах была выше, чем в середине книги, возможно, потому, что эти страницы больше подвергались воздействию пыли и грязных рук.

Как отмечено выше, культуральными методами было выделено девять штаммов рода *Bacillus*; они были идентифицированы секвенированием генов 16S рРНК. Ранее сообщалось, что различные виды рода Bacillus участвуют в заселении и разрушении культурных артефактов из бумаги (Principi et al., 2011; Piñar et al., 2015). Бактерии этого рода, по-видимому, вносят вклад в развитие пятен фоксинга (Karakasidou et al., 2018), которые обильно присутствуют на исследуемом манускрипте. Среди штаммов, выделенных с манускрипта, был и штамм *B. licheniformis*. В работе Jacob et al. (2015) описано выделение этой бактерии из бумажных документов XIX в. Согласно этой статье, низкомолекулярные пептиды, синтезирумые *B. licheni*formis, могут действовать как внутренний фактор, сдерживающий развитие разрушающих сообществ грибков на поверхности бумаги (Jacob et al., 2015). Кроме того, выделение других видов рода Bacillus, в частности, В. atrophaeus, В. idriensis и В. niacini, согласуется с результатами более ранних исследований бактериальных сообществ бумажных объектов и целлюлозных материалов (Suihko, Stackebrandt, 2003; Gutarowska, 2016). Peзультаты секвенирования на платформе Illumina тоже указывают на присутствие членов рода Ваcillus в микробном сообществе (4.9% ридов). За исключением B. muralis, эти риды были аннотированы до уровня семейства или рода, что объясняет более высокое разнообразие видов Bacillus, обнаруженных культуральным методом. *В. тига*lis обнаруживали и в других исследованиях микробных сообществ культурных и исторических артефактов, например, настенных росписей в Испании и Германии (Heyrman et al., 2005), и бумажных манускриптов, например, "Атлантического кодекса" Леонардо да Винчи (Tarsitani et al., 2014).

Кроме того, с манускрипта были выделены и идентифицированы частичным секвенированием еще два вида: Corynebacterium sanguinis и Streptomyces rocheie (Actinobacteria). Наиболее существенное свойство актинобактерий — устойчивый вторичный

метаболизм пигментов и органических кислот, которые играют ключевую роль в биодеградации культурного наследия, окрашивая материалы и разрушая органические вещества (Duan et al., 2017). Согласно Jaén-Luchoro et al. (2020), штаммы C. sanguinis ранее выделялись из естественных (водных и промышленных) образцов. Этот вид имеет большое генетическое сходство с С. lipophyloflavum, видом с выраженной способностью к синтезу целлюлазы (Sakthivel et al., 2010; Jaén-Luchoro et al., 2020). В работе Sato et al. штаммы рода Streptomyces были выделены из пятен и поврежденных участков бумажных объектов, затопленных в результате цунами 2011 г. в Японии (Sato et al., 2014). С другой стороны, оценивалась также роль различных видов рода Streptomyces, в том числе S. rocheie, в разрушении древесины и целлюлозных материалов (Lupan et al., 2014). Результаты тестов на синтез ферментов указывают, что выделенные штаммы могут иметь потенциал к разрушению бумажных материалов.

Согласно данным секвенирования на платформе Illumina, самым представленным видом по числу ридов был P. stutzeri. Различные штаммы рода Pseudomonas ранее выделялись из памятников культуры (поверхность фрески) и окружающей воздушной среды (Pangallo et al., 2012); из-за высокой устойчивости к антимикробным биоцидам они могут вызывать вторичный микробный кризис (Bastian et al., 2009). Виды рода Pseudomonas не переносят кислых условий, и ни один из них не способен расти при pH ниже 4.5 (Lalucat et al., 2006). Можно сделать вывод, что в определенный момент манускрипт был заражен этим штаммом. Однако химический распад бумаги и синтез органических кислот вследствие грибковой колонизации привели к тому, что материал приобрел кислую реакцию рН (рН 4.1), и в результате рост и выживание штаммов Pseudomonas стали невозможны. С другой стороны, тот факт, что представители Pseudomonas не формируют спор, тоже повлиял на их плохую выживаемость и на невозможность выделить их культуральными методами.

Присутствие рода *Promicromonospora* (3.1% ридов) может быть связано с загрязнением среды, где хранилась рукопись, пылью и кутикулами насекомых (Mohammadipanah et al., 2017). Представители рода *Arthrobacter* (2.9% ридов) ранее идентифицировались в почве, в воздухе старых зданий и на культурных артефактах. Мембраны бактерий рода *Arthrobacter* содержат каротиноидные пигменты, например β-каротин и α-бактериоруберин. Таким образом, колонизация этими штаммами может привести к обесцвечиванию и развитию фоксинга (Piñar et al., 2015; Duan et al., 2017).

В сообществе были идентифицированы представители родов *Escherichia* (0.6%) и *Enterobacter* (0.5%), принадлежащих к семейству *Enterobacteri*-

aceae и включающих колиформные бактерии; следовательно, существовала возможность загрязнения манускрипта в результате контакта с грязными руками или фекалиями животных.

В нашей работе был аннотирован (на уровне рода или вида) также ряд других бактерий, которые ранее определялись в работах на бумажных материалах или других объектах культурного наследия, а именно: Carnobacterium и Salinibacterium, 2.9 и 2.0% ридов соответственно (Gutarowska 2016); Microbispora rosea, 1.7% ридов (Karbowska-Berent et al., 2011); Paracoccus marcusii, 1.6% ридов (Lupan et al., 2014); Cellvibrio, 1.21% ридов (Harkawy et al., 2011); Brachybacterium, 1.1% ридов (Zhgun et al., 2020); Virgibacillus picturae, 1.0% ридов (Sterflinger, Piñar, 2013).

Большинство видов рода Aspergillus, выделенных с манускрипта, в том числе A. versicolor, A. niger и A. svdowii, могут расти в условиях низкой доступности воды и играют значимую роль в разрушении архивных и библиотечных материалов, синтезируя ферменты гидролиза (Zghair, 2019). В то же время, результаты секвенирования на платформе Illumina показали, что представители Aspergillus составляли значительную долю сообщества (33.02%). Некоторые виды, идентифицированные этим методом, например, A. ruber (22.55%) и A. penicillioides (0.84%), ранее выделялись с целлюлозных материалов, например, исторических рукописей и музейных предметов из материала dluwang (ткань из коры, изготавливаемая путем отбивания коры тутового дерева); оценивалась их роль в разрушении бумаги и образовании кирпично-красных пятен (Oetari et al., 2016; Liu et al., 2018).

Согласно результатам секвенирования на платформе Illumina, наиболее многочисленным родом грибов был *Penicillium* (58.89%). Большинство видов рода *Penicillium* проявляют значительную ферментативную активность и могут разлагать органические вещества. Представители *Penicillium* выделялись из проб аэрозолей, отобранных в музеях, библиотеках и архивах, так что при наличии подходящих условий для роста они могут представлять собой угрозу для бумажных материалов (Karbowska-Berent et al., 2011; Zhang et al., 2019).

Род Alternaria — еще одна составляющая сообщества грибов, обнаруживаемая как при культивировании, так и секвенированием. Различные виды Alternaria часто обнаруживаются в зонах хранения библиотек и архивов; известно, что они могут быть факторами биоразрушения бумаги и целлюлозных материалов (Mesquita et al., 2009).

Представители *Chaetomiaceae*, в том числе родов *Chaetomium* и *Chaetomidium*, составляли 1.4% ридов. Ранее оба рода выделялись из атмосферы хранилищ (Skóra et al., 2015) и объектов письменного наследия (Gutarowska, 2016). Представители

этих родов синтезируют гидролитические ферменты и антибиотики и, таким образом, обладают разрушающей и бактериолитической активностью (Sterflinger, Piñar, 2013; Piñar et al., 2015).

Кроме того, секвенирование на Illumina выявило таксоны *Mucor*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Acremonium* и *Scopulariopsis*, которые также отмечались в предыдущих исследованиях грибковых сообществ библиотек и архивов (Pinheiro et al., 2011, 2019).

Проведенные тесты ферментативной активности (табл. 3) показали, что большинство микробных изолятов производят целлюлазу и несут риск разрушения объектов из бумаги. Выделение штаммов с протеолитической и амилолитической активностью может быть связано с возможным использованием на поверхности исторических бумаг животных клеев с белковой структурой и крахмальным наполнителем. В то же время, образцы с первой и последней страниц книги (прилегающих к кожаной обложке богатой коллагеном) могут послужить для выделения протеолитических штаммов.

Бумага рукописи имела кислую реакцию (рН 4.1). Под воздействием кислой среды волокна, состоящие из целлюлозных цепочек, регулярно распадаются на меньшие фрагменты. Присутствие закисляющих веществ в бумаге может быть связано с разными факторами, в том числе с абсорбцией загрязняющих веществ из воздуха и окружающей среды (оксиды серы и азота в воздухе, низкокачественные контейнеры) и с внутренними характеристиками бумаги (исходный материал и процесс производства). В то же время, грибы могут выделять соединения с кислой реакцией, чтобы изменить рН субстрата в соответствии со своими потребностями роста (Area, Cheradame, 2011). Некоторые виды Aspergillus (A. niger и A. versicolor) и Penicillium оказались способны значительно снижать рН среды (до 4 единиц рН). Поскольку бумажные материалы очень чувствительны к кислотному гидролизу, тот факт, что обычные виды грибков имеют выраженную способность синтезировать метаболиты с кислой реакцией, подразумевает ключевую роль сообщества грибов в их разрушении (Pinheiro et al., 2019).

Результаты нашей работы показали, что ПЭСЭМ — подходящий инструмент предварительного скрининга микробного заселения объектов из бумаги. Сравнение результатов, полученных культуральными методами и с помощью высокопроизводительного секвенирования, показало, что последний метод имел преимущество при описании микробного разнообразия исторических документов. С другой стороны, в обнаружении потенциально активных разрушительных штаммов главная роль принадлежит культуральным исследованиям и анализу ферментативной

активности. Таким образом, наилучшим выбором было бы сочетать эти подходы для многофакторной оценки микробных сообществ. Вопрос о присутствии архей в микробных сообществах различных объектов исторического наследия и их участии в биоразрушении требует дальнейшего изучения.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за поддержку этого исследования Университету Тегерана и Национальной Библиотеке и Архивам Ирана за предоставленные возможности. Мы также признательны Dr. Sajjad Sarikhan, менеджеру Молекулярного Банка Иранского Центра Биологических Ресурсов (Iranian Biological Recourse Center, IBRC), и другим экспертам этого центра за ценную научную помощь.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что им не известно о конфликтах финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на публикуемую работу. Эта статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались бы люди или животные.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Area M.C.*, *Cheradame H.* Paper aging and degradation: recent findings and research methods // BioResources. 2011. V. 6. P. 5307–5337.

https://doi.org/10.15376/biores.6.4.5307-5337

Bastian F., Alabouvette C., Jurado V., Saiz-Jimenez C. Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave // Naturwissenschaften. 2009. V. 96. P. 863–868.

https://doi.org/10.1007/s00114-009-0540-y

*Bicchieri M., Biocca P., Colaizzi P., Pinzari F.* Microscopic observations of paper and parchment: the archaeology of small objects // Herit. Sci. 2019. V. 7(1). P. 1–12. https://doi.org/10.1186/s40494-019-0291-9

Duan Y., Wu F., Wang W., He D., Gu J.D., Feng H., Chen T., Liu G., An L. The microbial community characteristics of ancient painted sculptures in Maijishan Grottoes, China // PLoS One. 2017. V. 12 (7).

https://doi.org/10.1371/Journal.Pone.0179718

Gutarowska B. (Ed.). A Modern Approach to Biodeterioration Assessment and Disinfection of Historical Book, Lodz Univ. Technol., 2016. https://docplayer.net/50335305-Modern-approach-for-biodeterioration-assessment-and-disinfection-of-historical-book-collections.html

Harkawy A., Górny R.L., Ogierman L., Wlazło A., Ławniczek-Wałczyk A., Niesler A. Bioaerosol assessment in naturally ventilated historical library building with restricted personnel access // Ann. Agric. Environ. Med. 2011. V. 18. P. 323–329. http://www.aaem.pl/Bioaerosol-assessment-in-naturally-ventilated-historical-library-building-with-restricted,71708,0,2.html

Heyrman J., Logan N.A., Rodríguez-Díaz M., Scheldeman P., Lebbe L., Swings J., Heyndrickx M., De Vos P. Study of mural painting isolates, leading to the transfer of "Bacillus maroccanus" and "Bacillus carotarum" to Bacillus simplex, emended description of Bacillus simplex, re-examination of the strains previously attributed to "Bacillus macroides" and description of Bacillus muralis sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 119—131. https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ ijs.0.63221-0 https://doi.org/10.1099/ijs.0.63221-0

Jacob S., Bhagwat A.M., Kelkar-mane V. Bacillus species as an intrinsic controller of fungal deterioration of archival documents // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2015. V. 104. P. 46–52.

https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.001

Jaén-Luchoro D., Gonzales-siles L., Karlsson R., Svensson-stadler L., Molin K., Cardew S., Jensie-Markopolous S., Ohlén M., Inganäs E., Skovbjerg S., J. Tindall B., Moore E., Corynebacterium sanguinis sp. nov., a clinical and environmental associated Corynebacterium // Syst. Appl. Microbiol. 2020. V. 43.

https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126039

*Joseph E.* (Ed). Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage. Springer Nature, 2021.

Karakasidou K., Nikolouli K., Amoutzias G.D., Pournou A., Manassis C., Tsiamis G., Mossialos D. Microbial diversity in biodeteriorated Greek historical documents dating back to the 19th and 20th century: a case study // Microbiologyopen. 2018. V. 7.

https://doi.org/10.1002/mbo3.596

*Karbowska-Berent J., Górny R.L., Strzelczyk A.B., Wlazło A.* Airborne and dust borne microorganisms in selected Polish libraries and archives // Build. Sci. 2011. V. 46. P. 1872–1879.

https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2011.03.007

*Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A.* A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine // Curr. Microbiol. 2008. V. 57. P. 503–507.

https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8

Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., García-Valdés E., Palleroni N.J. Biology of Pseudomonas stutzeri // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. V. 70. P. 510–547.

https://doi.org/10.1128/mmbr.00047-05

Liu Z., Zhang Y., Zhang F., Hu C., Liu G., Pan J. Microbial community analyses of the deteriorated storeroom objects in the Tianjin Museum using culture-independent and culture-dependent approaches // Front. Microbiol. 2018. V. 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00802

*Lupan I., Ianc M.B., Keleme B.S., Carpa R., Rosca-Casian O., Chiriac M.T., Popescu O.* New and old microbial communities colonizing a seventeenth-century wooden church // Folia Microbiol. 2014. V. 59. P. 45–51.

https://doi.org/10.1007/s12223-013-0265-3

Mesquita N., Portugal A., Videira S., Rodríguez-Echeverría S., Bandeira A.M.L., Santos M.J.A., Freitas H. Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2009. V. 63. P. 626–629.

https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.03.010

Mohammadipanah F., Montero-Calasanz M.D.C., Schumann P., Spröer C., Rohde M., Klenk H.P. Promicromonospora kermanensis sp. nov., an actinobacterium isolated from soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 262–267.

https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001613

Nikou M.M., Ramezan M., Harirchi S., Makzoom S., Amoozegar M. A., Abolhassan S., Fazeli S., Schumann P., Ventosa A. Salinifilum gen. nov., with description of Salinifilum proteinilyticum sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Meighan wetland, Iran, and reclassification of Saccharopolyspora aidingensis as Salinifilum aidingensis comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 4221–4227.

https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002286

Oetari A., Susetyo-Salim T., Sjamsuridza W., Suherman, E.A., Monica M., Wongso R., Fitri R., Nurlaili D.G., Ayu D.C., Teja T.P. Occurrence of fungi on deteriorated old dluwang manuscripts from Indonesia // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2016. P. 114. P. 94–103.

https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.025

Otlewska A., Adamiak J., Gutarowska B. Application of molecular techniques for the assessment of microorganism diversity on cultural heritage objects // Acta Biochim. Pol. 2014. P. 61. P. 217–225.

Pangallo D., Kraková L., Chovanová K., Šimonovičová A., De Leo F., Urzì C. Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. P. 2015—2027. https://doi.org/10.1007/s11274-012-1004-7

*Piñar G., Sterflinger K., Ettenauer J.* A combined approach to assess the microbial contamination of the Archimedes palimpsest // Microb. Ecol. 2015. V. 69. P. 118–134. https://doi.org/10.1007/s00248-014-0481-7

*Piñar G., Sterflinger K., Pinzari F.* Unmasking the measles-like parchment discoloration: molecular and microanalytical approach // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. P. 427–443.

https://doi.org/10.1111/1462-2920.12471

Pinheiro A.C., Macedo M.F., Jurado V., Saiz-jimenez C., Viegas C., Brandão J., Rosado L. Mould and yeast identification in archival settings: preliminary results on the use of traditional methods and molecular biology options in Portuguese archives // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2011. V. 65. P. 619–627.

https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.02.008

*Pinheiro A.C., Sequeira S.O., Macedo M.F.* Fungi in archives, libraries, and museums: a review on paper conservation and human health // Crit. Rev. Microbiol. 2019. V. 45. P. 686–700.

https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1690420

*Principi P., Villa F., Sorlini C.* Molecular studies of microbial community structure on stained pages of Leonardo da Vinci's Atlantic Codex // Microb. Ecol. 2011. V. 61. P. 214—222. https://doi.org/10.1007/s00248-010-9741-3

Sakthivel M., Karthikeyan N., Jayaveny R., Palani P. Optimization of culture conditions for the production of extracellular cellulase from *Corynebacterium lipophiloflavum* // J. Ecobiotechnol. 2010. V. 2. P. 6–13.

Sato Y., Aoki M., Kigawa R. Microbial deterioration of tsunami-affected paper-based objects: a case study // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2014. V. 88. P. 142—149. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.007

Savković Ž., Stupar M., Unković N., Ivanović Ž., Blagojević J., Vukojević J., Ljaljević Grbić M. In vitro biodegradation potential of airborne Aspergilli and Penicillia // Sci. Nat. 2019. V. 106.

https://doi.org/10.1007/s00114-019-1603-3

Schabereiter-Gurtner C., Pinar G., Lubitz W., Rolleke S. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects // J. Microbiol. Methods. 2001. V. 45. P. 77–87.

Sequeira S.O., De Carvalho H.P., Mesquita N., Portugal A., Macedo M.F. Fungal stains on paper: is what you see what you get? // Conservar Patrimonio. 2019. V. 32. P. 18–27.

Skóra J., Gutarowska B., Pielech-Przybylska K., Stępień Ł., Pietrzak K., Piotrowska M., Pietrowski P. Assessment of microbiological contamination in the work environments of museums, archives and libraries // Aerobiologia. 2015. V. 31. P. 389–401.

https://doi.org/10.1007/s10453-015-9372-8

Sterflinger K., Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills? // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. P. 9637—9646. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1

Sterflinger K., Pinzari F. The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 559–566.

https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02584.x

Strlič M., Kolar J., Kočar D., Drnovesek T., Šelih V.S., Susič R., Pihlar B. What is the pH of alkaline paper? // e-Preserv. Sci. 2004. № 1. P. 35–47.

Suihko M., Stackebrandt E. Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibers // J. Appl. Microbiol. 2003. V. 94. P. 25–34.

Tarsitani G., Moroni C., Cappitelli F., Pasquariello G., Maggi O. Microbiological analysis of surfaces of Leonardo da Vinci's Atlantic Codex: biodeterioration risk // Int. J. Microbiol. 2014.

https://doi.org/10.1155/2014/214364

Tedersoo L., Sánchez-Ramírez S., Kõljalg U., Bahram M., Döring M., Schigel D., May T., Reyberg M., Abarenkov K. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses // Fungal Divers. 2018. V. 90. P. 135–159.

https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0

Zghair A. Enzymatic efficacy of some types of Aspergillus fungi isolated from some manuscripts and its effect on some of the physical and chemical properties of the manuscripts // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. Institute of Physics Publishing, 2019. V. 571. № 1. P. 012043.

Zhang F., Li L., Sun M., Hu C., Zhang Z., Liu Z., Shao H., Xi G., Pan J. Fungal community analyses of a pirogue from the Tang Dynasty in the National Maritime Museum of China // Appl. Sci. 2019. V. 9(19).

https://doi.org/10.3390/app9194129

Zhgun A., Avdanina D., Shumikhin K., Simonenko N., Ly-ubavskaya E., Volkov I., Ivanov V. Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // PLoS One. 2020. V. 15. e0230591.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230591

# MICROBIAL COMMUNITY OF AN 11TH CENTURY MANUSCRIPT BY BOTH CULTURE-DEPENDENT AND INDEPENDENT APPROACHES

N. Raeisnia<sup>1</sup>, E. Arefian<sup>1</sup>, \*, and M. A. Amoozegar<sup>1</sup>, \*\*

<sup>1</sup>Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
\*e-mail: arefian@ut.ac.ir
\*\*e-mail: amoozegar@ut.ac.ir

Received December 14, 2021; revised January 22, 2022; accepted January 22, 2022

Abstract—In this study, the microbial community (Bacteria, Archaea, and Fungi) of a historical manuscript was investigated by microscopic observation (field emission scanning electron microscopy), culture-dependent methods, and sequencing of amplicons on the Illumina MiSeq platform. Microbial isolates were also assayed for production of hydrolytic enzymes (cellulase, amylase, and protease). Observation of gold-coated paper samples in high-vacuum mode revealed bacterial cells, conidia, and fungal mycelium among the fibers. Eleven bacterial strains, including species of *Bacillus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, and four fungal strains, including species of Aspergillus and Alternaria, were isolated by culture-dependent methods and identified by 16S rRNA and ITS sequencing, by comparison with the EzBioCloud and MycoBank databases, respectively. Illumina MiSeq sequencing revealed the presence of 20 bacterial genera, including *Pseudomonas*, *Bacillus*, Citrococcus, Promicromonospora, Carnobacterium, Arthrobacter, Salinibacterium, and Streptomyces. According to the number of reads. Pseudomonas (58%) was the most abundant genus and P. stutzeri (55.2%) was the most abundant bacterial species. Sequencing results of fungal amplicons indicated 62 genera, including *Penicilli*um, Aspergillus, Alternaria, Mucor, and Chaetomium. Penicillium (58.89%) and Aspergillus (33.02%) were the most abundant genera. P. polonicum (55.45%) and A. ruber (22.55%) were the most abundant species of the fungal community. The results of searching for archaea in the microbial community of the manuscript by culture-dependent and high-throughput amplicon sequencing were negative. The enzymatic activity of microbial isolates indicated a potential risk of biodeterioration. It seems that using a combination of culture-dependent and high-throughput sequencing methods has a significant advantage over using them individually.

**Keywords:** biodeterioration, culturable microorganism, next-generation sequencing, Illumina MiSeq, enzymatic activity, paper material

# \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_ СТАТЬИ

# СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОБРАСТАНИЙ ТРОСТНИКА ЮЖНОГО *PHRAGMITES AUSTRALIS* (CAV.) В РЫБИНСКОМ ВОДОХРАНИЛИЩЕ

© 2022 г. Р. А. Федоров<sup>а, \*</sup>, И. В. Рыбакова<sup>а</sup>, Н. Л. Белькова<sup>b</sup>, Н. А. Лаптева<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, 152742 Россия <sup>b</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

\*e-mail: fedor-off@yandex.ru Поступила в редакцию 20.09.2021 г. После доработки 23.01.2022 г. Принята к публикации 28.01.2022 г.

Представлены многолетние данные по численности и биомассе бактериальных обрастаний одного из массовых видов высших водных растений Рыбинского водохранилища — тростника южного *Phragmites australis* (Cav.). Определена суточная продукция бактериального и фитоэпифитона, а также скорость бактериальной деструкции органических веществ. Учтено количество микроорганизмов разных физиолого-трофических групп, рассчитана их доля в общей численности бактериоэпифитона. Молекулярно-генетическими методами определено таксономическое разнообразие эпифитона. Показано, что деструкторами клетчатки являются бактерии рода *Cellvibrio* (класс *Gammaproteobacteria*).

**Ключевые слова:** бактериоэпифитон, *Phragmites australis*, Рыбинское водохранилище, физиологотрофическое разнообразие, продукция, деструкция, молекулярно-генетические методы

**DOI:** 10.31857/S0026365622300103

Рыбинское водохранилище - крупное равнинное эвтрофное водохранилище озерного типа (Верхняя Волга). С конца XX в. наблюдается интенсивное зарастание водохранилища с заметным господством воздушно-водных растений (94.0%) над погруженными (2.7%) и имеющими плавающие листья (2.5%). Мониторинг выявил непрерывное увеличение площадей, занятых тростником, двукисточником и манником, и нарастание их доли среди сообществ воздушно-водных растений (Ляшенко, 1999). Тростник южный Phragmites australis (Cav.) — высокопродуктивный космополит, на долю которого приходится 21.7% (40.4 км<sup>2</sup>) суммарной площади зарослей всех доминирующих видов растений водохранилища и 30.9% площади зарослей гелофитов (Папченков, 2013).

В зарослях высших водных растений формируется свой микроклимат: температура воды на 2—3°С больше, чем в пелагиали, выше рН, содержание растворенного кислорода, биогенных элементов, взвешенного и растворенного органического вещества (ОВ) в воде (Рыбакова, Васильева, 2003; Yang et al., 2018). Исследователями отмечено, что в мелководном озере удельная скорость роста прикрепленных бактерий в 2—4 раза выше, чем в сообществах бактериопланктона, и продукция бактерий на макрофитах превышает продук-

цию бактериопланктона на 1 м<sup>2</sup> площади озера (Theil-Nielsen et al., 1999). Большинство эпифитных бактерий являются потенциальными деструкторами органического вещества (ОВ) и, по окончании вегетации макрофитов, вместе с грибами участвуют в разложении отмирающих частей растений (Zhao et al., 2021). Но по сравнению с грибами, бактерии, имеющие высокие скорости роста, могут более активно разлагать клетчатку (Тимакова, 1984; Schneider et al., 2012).

Разнообразие метаболических особенностей эпифитных микроорганизмов и их высокая активность отмечались рядом исследователей. Есть данные, что погруженные макрофиты работают как ниша для азотистых бактерий (Coci et al., 2010), в обрастаниях регистрировали микроорганизмы с амилолитическими и протеолитическими свойствами (Якушин, 1978). В эпифитоне высших водных растений регистрируют процессы азотфиксации, нитрификации и денитрификации, окисления железа, восстановления сульфата и метаногенеза (Одинцов, Лаптева, 1984; Basberg et al., 1998; Islam, Singhal, 2004; Srivastava et al., 2017). Эпифитон с его разнообразным сложным составом может адаптироваться к изменчивости внешней среды, влиять на нее и поддерживать высокую метаболическую активность за счет саморегулирования структуры сообщества (Yan et al., 2011; Wu et al., 2014; Shangguan et al., 2015), играя при этом важную роль в преобразовании и деминерализации питательных веществ (Rogers et al., 1982).

Эпифитные бактерии макрофитов и их влияние на метаболические процессы до сих пор остаются малоизученным вопросом для экосистемы Рыбинского водохранилища.

Цель работы — изучение структуры, функционирования и разнообразия бактериоэпифитона тростника южного *Phragmites australis*, как одного из массовых видов высших водных растений Рыбинского водохранилища.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб эпифитона тростника и первичная пробоподготовка. Растения тростника южного *Phragmites australis* для исследования отбирали в прибрежной зоне Волжского плеса Рыбинского водохранилища (координаты N 58.067, Е 38.264) в летне-осенний период 2000—2003 гг. и 2005—2007 гг. Работы по обработке материала проводили в лабораторных условиях. Для определения количественных показателей и функциональных характеристик эпифитона обрастания тростника смывали безбактериальной природной водой (профильтрованная через фильтр с диаметром пор 0.17 мкм и стерилизованная автоклавированием). Учитывали площадь и вес растений.

Для изучения таксономического разнообразия микроорганизмов стерильным скальпелем соскабливали обрастания с тростника, готовили суспензию биологического материала в трис-солевом буфере (10 мМ *трис*-HCl, рН 7.5; 0.1 М NaCl; 2 мМ ЭДТА). Каждую пробу делили на две пробирки, одну использовали сразу для выделения тотальной ДНК, а во вторую добавляли 2 мкл моноазида этидиумбромида (ЕМА, 50 мкг/мл). Пробирку с ЕМА обрабатывали по протоколу (Nocker et al., 2006), позволяющему провести селекцию живых и жизнеспособных клеток. Затем проводили выделение тотальной ДНК методом ферментативного лизиса. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Микроскопия. Численность и размерно-морфологические группы эпифитных бактерий определяли методом эпифлуоресцентной микроскопии на черных ядерных фильтрах с диаметром пор 0.17 мкм (ОИЯИ, Дубна, Россия). Препараты просматривали на микроскопе Люмам-И1 при увеличении ×1000, с использованием флуорохрома ДАФИ (4,6-диамидино-2-фенилиндол) (Porter, Feig, 1980). Измеряя бактерии, учитывали их по трем морфологическим группам: кокки и эллипсоиды размером до 1 мкм, крупные палочки и нити. Рассчитывали содержание углерода в сырой биомассе (Norland, 1993).

Морфологическое разнообразие форм бактериальных клеток эпифитона непосредственно из обрастаний, а также из накопительных культур бактерий, разрушающих клетчатку, изучали под электронным микроскопом марки JEM-100C ("Jeol", Япония) при увеличении ×6600–16000. Подготовку препаратов проводили по способу обрастания или осаждения бактерий на электронно-микроскопических сеточках (Кузнецов, 1974). Образцы для исследований брали из пробирок с интенсивным разрушением фильтровальной бумаги и окрашиванием ее в оранжевый или желтый цвет.

Первичную ( $P_{\rm f}$ ) и бактериальную ( $P_{\rm h}$ ) продукцию эпифитона определяли в 2006 г. и весной 2007 г. модифицированным радиоуглеродным методом по ассимиляции углекислоты в темноте и на свету с использованием NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (ПО "Изотоп") (Кузнецов, Дубинина, 1989). В склянки со стерильной природной водой (50 мл) вносили 4 мл исходного смыва с растений. Для определения темновой ассимиляции бактерий и первичной продукции водорослей эпифитона вносили 0.5 мл раствора гидрокарбоната с активностью 1 мл 0.54 ×  $\times 10^5$  имп./мин. Пробы инкубировали в лотках в течение суток в условиях, приближенных к условиям водоема. После фиксации формалином бактериальные пробы фильтровали через фильтры с диаметром пор 0.2 мкм, альгологические – с диаметром пор 0.5 мкм. Радиоактивность фильтров определяли на сцинтилляционном счетчике Mark-II. Контролем служили пробы, зафиксированные сразу после внесения радионуклида. Первичную и бактериальную продукцию рассчитывали по формуле Стимана Нильсена (Steemann Nielsen, 1952):

$$C = rC_{\kappa}/Rt,$$

где C — величина темновой ассимиляции бактерий или первичная продукция водорослей эпифитов, мкг С/л в сутки; r — радиоактивность организмов в пробе на всю склянку, имп./мин;  $C_{\rm k}$  — содержание свободной углекислоты и карбонатов, мкг С/л; R — общее количество изотопа, добавленного в пробу, имп./мин; t — время инкубации проб, сутки. Расчет бактериальной продукции производили, принимая величину темновой ассимиляции углекислоты равной 6% от продукции бактериальной биомассы.

Время удвоения численности бактерий рассчитывали комбинированным методом по формуле:  $D = t \lg 2/\lg(b_o + P_b) - \lg b_o$ , где D — время удвоения бактерий, ч; t — длительность опыта по определению прироста биомассы бактерий по гетеротрофной ассимиляции  $CO_2$ , ч;  $b_o$  — исходная биомасса бактерий в 1 л воды, мкг  $C/\pi$ ;  $P_b$  — продукция бактериальной биомассы, мкг  $C/\pi$  за время t. Для оценки удельной скорости роста ( $\mu$ ) использова-

ли формулу  $D = \lg 2/\mu$ , где D — время удвоения численности бактерий, ч. Удельную продукцию эпифитных бактерий определяли как произведение их удельной скорости роста и биомассы (Романенко, Кузнецов, 1974).

Деструкцию органического вещества (ОВ) оценивали кислородным методом (Романенко, Кузнецов, 1974). Для оценки потенциальной способности бактериоэпифитона разрушать клетчатку использовали метод, предложенный Тимаковой и Романенко (Тимакова, Романенко, 1984).

Численность бактерий различных физиолого-трофических групп в эпифитоне определяли методом предельных разведений и посевом на элективные питательные среды (Романенко, Кузнецов, 1974). В период наивысшего развития растений, в стадии начального и массового их разложения учитывали численность сапрофитной, углеводородокисляющей микрофлоры и бактерий, разлагающих клетчатку. Из числа сапрофитов дополнительно определяли численность и активность бактерий, выделяющих каталазу. После инкубации сапрофитов, выросших на рыбопептонном агаре (РПА), в чашке с крайним разведением, на колонии наносили 10% раствор  $H_2O_2$  и учитывали колонии, в которых идет разложение перекиси водорода. Для определения активности каталазоактивной микрофлоры в эпифитоне тростника использовали модифицированный метод Баха и Опарина (Большой практикум..., 1962). Для этого к 20 мл суспензии обрастаний добавляли 25 мл 0.2% Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и помещали в холодильник на 1.5 ч при температуре 7°C, затем отбирали 5 мл материала, фиксировали 5 мл 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и титровали 0.1 N раствором  $KMnO_4$ .

Для установления взаимосвязей между параметрами использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена для уровня значимости 0.05.

Молекулярно-генетические методы. Выделение геномной ДНК проводили методом ферментативного лизиса (Белькова, 2009). Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК вели на консервативных бактериальных праймерах, как было предложено ранее (Rybakova et al., 2009). Для лигирования ампликонов использовали набор GeneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit ("Fermentas"). Компетентные клетки Escherichia coli (штамм XL-1) для трансформации получали, используя методику трансформации CaCl<sub>2</sub>-зависимых клеток (Sambrook et al., 1989). Секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer). Анализ полученных последовательностей проводили путем ИХ сравнения c последовательностями, зарегистрированными в международной базе данных с помощью пакета программ FASTA (http://www.ebi.ac.uk/fasta33). Наличие химерных структур определяли анализом последовательностей с имеющейся базой данных с помощью

пакета программ CHECK CHIMERA (http://rdp8.cme.msu.edu/html/analyses.html). Нуклеотидные последовательности зарегистрированы под следующими номерами: AM901043—AM901047, FM177212—FM177222, FM177234—FM177237, LT797787—LT797796.

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Численность и биомасса бактерий. За период наблюдений 2000—2006 гг. в эпифитоне тростника отмечали тенденцию роста численности и биомассы гетеротрофных бактерий (табл. 1). В составе бактериоперифитона снижалась доля кокков и мелких эллипсоидов и, напротив, возрастала доля крупных палочек. В результате средний объем бактериальной клетки в 2005—2006 гг. по сравнению с таковым в 2000—2003 гг. увеличился в 1.6 раза (табл. 1), а биомасса гетеротрофных бактерий в обрастаниях тростника оказалась выше в 3 раза. Данные процессы отмечены и в эпифитоне других массовых видов макрофитов Рыбинского водохранилища (Рыбакова, 2016).

Сезонную динамику развития бактериальных обрастаний наблюдали в 2006 г. на вегетирующих растениях тростника до ухода воды из прибрежной зоны водоема и обнажения растений. Далее исследования продолжили в 2007 г. с момента затопления прибрежья с перезимовавшими отмершими частями тростника (рис. 1). Общая численность бактерий в перифитоне вегетирующих растений в этот период колебалась от  $734 \times 10^6$  кл./г в мае до  $3366 \times 10^6$  кл./г в октябре (в расчете на  $1 \text{ cm}^2$  на рис. 1) (средняя  $1930 \pm 793 \times 10^6$  кл./г или  $162.5 \pm 37.9 \times 10^6$  кл./см<sup>2</sup>). Биомасса изменялась в пределах 86.1-297.8 мкг/г в среднем составив  $199.4 \pm 70.5$  мкг/г или  $18.9 \pm 5.2$  мкг/см<sup>2</sup>. Отмечали весенне-летний подъем численности бактерий, а также осенний - в период массового отмирания растений.

На прошлогоднем тростнике численность бактерий менялась незначительно, составив в мае—июне в среднем из двух определений  $951 \times 10^6$  кл./г, что в 1.5 раза меньше, чем на вегетирующем. Общая биомасса бактерий в этот период на мертвом тростнике также варьировала незначительно, в пределах 120.3-126.1 мкг/г, в то время как на вегетирующих растениях к летним месяцам достигала 297.8 мкг/г.

Результаты дифференцированного учета численности бактерий перифитона по морфологическим группам за шестилетний период показали преобладание кокков и мелких эллипсоидов размером до 1 мкм. Их численность существенно варьировала  $101-5776 \times 10^6$  кл./г (средняя  $1358 \times 10^6$  кл./г), биомасса менялась от 2.9 до 243.6 мкг/г (средняя 63.4 мкг/г). Доля кокков и мелких эллипсоидов в общей численности бактерий эпифитов составляла

 $18.4 \pm 13.3$ 

14.0-49.5

 $32.1 \pm 15.1$ 

12.0-26.1

 $20.3 \pm 5.0$ 

 $15.1 \pm 7.7$ 

| обрастаний тростника южного |                                  |                                      |   |                                      |                                 |
|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------|
| Период                      | $N \times 10^6$                  |                                      | V, mkm <sup>3</sup>                     | В                                    |                                 |
|                             | кл./г                            | кл./cм <sup>2</sup>                  | V, MKM                                  | мкг/г                                | мкг/см <sup>2</sup>             |
| 07—10.2000 г.               | $\frac{127 - 903}{427 \pm 319}$  | $\frac{12.3 - 87.7}{41.5 \pm 31.0}$  | $\frac{0.033 - 0.150}{0.090 \pm 0.047}$ | $\frac{4.2 - 89.8}{36.3 \pm 29.4}$   | $\frac{0.4 - 8.7}{3.5 \pm 2.9}$ |
| 08-09.2001 г.               | $\frac{569 - 1515}{847 \pm 388}$ | $\frac{55.2 - 147.1}{82.0 \pm 37.8}$ | $\frac{0.063 - 0.136}{0.091 \pm 0.034}$ | $\frac{39.1 - 206.4}{84.0 \pm 69.5}$ | $\frac{3.8-20.0}{8.2 \pm 6.8}$  |
| 07—09.2002 г.               | $\frac{664-1018}{793\pm195}$     | $\frac{64.5 - 98.8}{77.0 \pm 18.9}$  | $\frac{0.085 - 0.114}{0.099 \pm 0.015}$ | $\frac{56.4 - 116.4}{80.4 \pm 31.7}$ | $\frac{5.5-11.3}{7.8 \pm 3.1}$  |
| 07—09 2003 г                | 854-5966                         | 82.9-579.2                           | 0.047-0.070                             | 60.0-329.5                           | 5.8-32.0                        |

 $0.058 \pm 0.010$ 

0.106 - 0.277

 $0.163 \pm 0.067$ 

0.066 - 0.141

 $0.107 \pm 0.026$ 

 $0.101 \pm 0.033$ 

**Таблица 1.** Многолетние изменения численности (N), среднего объема клеток (V) и биомассы (B) бактериальных обрастаний тростника южного

Примечание. Над чертой: пределы значений, под чертой: среднее  $\pm$  стандартное отклонение за период определений.

 $340.5 \pm 261.7$ 

169.0-619.6

 $338.5 \pm 173.3$ 

131.3-231.6

 $170.6 \pm 35.0$ 

 $175.0 \pm 93.0$ 

 $76.6\pm15.4\%$ , в суммарной биомассе —  $44.3\pm17.1\%$ . Численность крупных палочек за этот же период варьировала от 4.6 до  $1738\times10^6$  кл./г (средняя  $350.1\times10^6$  кл./г), их биомасса от 0.9 до 425.3 мкг/г (в среднем 89.1 мкг/г). Количество бактериальных нитей изменялось в пределах  $1.7-49.1\times10^6$  кл./г (среднее  $14.9\times10^6$  кл./г), биомасса от 0.5 до 34.1 мкг/г (средняя 11.9 мкг/г). Крупные бактериальные клетки при меньшей численности (доля палочек составляла  $21.9\pm15.7\%$  общей численности бактерий, нитей —  $1.6\pm1.0\%$ ) образовывали

 $3508 \pm 2696$ 

663-6057

 $2799 \pm 1951$ 

1221-3366

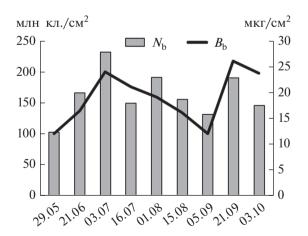
 $2131 \pm 738$ 

 $1751 \pm 1048$ 

07-10.2005 г.

07-10.2006 г.

Средняя



**Рис. 1.** Сезонная динамика развития бактериальных обрастаний тростника. Слева по оси — численность  $(N_{\rm b})$ , млн кл./см<sup>2</sup>; справа — биомасса  $(B_{\rm b})$ , мкг/см<sup>2</sup>; внизу — дата отбора проб: число и месяц.

значительную часть общей биомассы бактериоэпифитона —  $45.4 \pm 19.6\%$  и  $10.4 \pm 4.7\%$  соответственно.

 $189.1 \pm 137.1$ 

140.7-643.6

 $357.0 \pm 225.3$ 

111.5-297.8

 $219.6 \pm 62.3$ 

 $161.1 \pm 92.6$ 

Определения в мае—июне показали, что доля кокков и мелких эллипсоидов в общей численности бактерий эпифитона при одновременном определении в весенний период составила 78.0% — на вегетирующих растениях и 64.9% — на прошлогодних, а в общей биомассе бактерий не превышала 30.6 и 19.6% соответственно. Крупные палочки и бактериальные нити суммарно в общей численности бактерий составили 22.1% на вегетирующих растениях и 30.8% на прошлогодних. Однако эти морфологические группы бактерий вносили наибольший вклад в биомассу на тех и на других растениях: 69.5% на живых и 80.5% на отмерших.

Физиологотрофические группы бактерий в эпифитоне тростника. В летне-осенний период 2000-2002 гг. в обрастаниях тростника нами были учтены количества сапрофитных микроорганизмов, растущих на РПА. Эта группа бактерий наиболее быстро реагирует на поступление легкорастворимых органических веществ. Численность их значительно варьировала  $(2.8-44.9\times10^6\ \mathrm{кл./r}$ , средняя  $20.3\times10^6\ \mathrm{кл./r}$ ). Летом доля сапрофитной микрофлоры в общей численности бактерий составляла 4.7%, к осени она возрастала до 5.5%. Количество сапрофитных бактерий, растущих на РПА/10, как правило, было на порядок больше.

Об окислительно-восстановительных процессах в обрастаниях тростника судили по каталаз-

ной активности бактериальных обрастаний, которая изменялась в пределах  $0.91-4.46~\rm Mr~H_2O_2/\Gamma~\rm Y$  (средняя  $2.47~\rm Mr~H_2O_2/\Gamma~\rm Y$ ). В среднем ферментативная активность сапрофитной микрофлоры, вырабатывающей фермент каталазу, летом составила  $1.08~\rm Mr~H_2O_2/\Gamma~\rm Y$ , осенью  $3.85~\rm Mr~H_2O_2/\Gamma~\rm Y$ , что свидетельствует о возрастании окислительных процессов в период старения и разложения растений. При этом численность каталазоактивной микрофлоры находилась в пределах  $1.4-9.6~\rm X~10^6~\rm Kr./r$  (средняя  $4.8~\rm X~10^6~\rm Kr./r$ ) и максимум отмечали в конце сентября. В общей численности сапрофитной микрофлоры доля бактерий, вырабатывающих каталазу, составила 15.6-50.0% (средняя 28.5%).

В обрастаниях тростника наблюдали возрастание численности углеводородокисляющих микроорганизмов: в 2001 г. — в среднем  $410 \times 10^3$  кл./г, в 2002 г. —  $895 \times 10^3$  кл./г) и в 2006 г. —  $4372 \times 10^3$  кл./г). Максимальные величины наблюдали в июле—августе, а также в сентябре при высоких положительных температурах. В результате средняя за три года исследований численность углеводородокисляющих бактерий в обрастаниях тростника составила  $1892 \times 10^3$  кл./г, что в общей численности бактерий соответствует 0.13%.

Численность культивируемых микроорганизмов, разрушающих клетчатку, менялась в пределах  $0.3 \times 10^3 - 2.9 \times 10^6$  кл./г (средняя  $4.5 \times 10^5$  кл./г). Наблюдения показали, что количество этих микроорганизмов в эпифитоне вегетирующего тростника в мае-июне было невысоким - в пределах  $11-13 \times 10^3$  кл./г, в то время как на прошлогодних растениях в этот же период – на порядок больше  $(95-142 \times 10^3 \, \text{кл./г})$ . К середине лета численность бактерий, разрушающих клетчатку, на вегетирующих растениях уже достигала максимальных значений ( $2887 \times 10^3$  кл./г), затем к осени снижалась (в октябре —  $18 \times 10^3$  кл./г). Доля этих микроорганизмов в общей численности бактерий эпифитона тростника изменялась от 0.001% весной и поздней осенью, до 0.11% в период их максимального развития (июнь-июль). Наиболее активную деструкцию клетчатки бактериоэпифитоном регистрировали в августе (6.83 мкг  $O_2$ /млн кл. сут, осенью она снижалась до 2.32 мкг  $O_2$ /млн кл. сут, в среднем составив 4.27 мкг  $O_2$ /млн кл. сут).

Микроорганизмы, разрушающие клетчатку, и выращенные на элективной среде, имели следующие морфотипы: эллипсоиды размером от 1 до 2 мкм с включениями разной электронной плотности, вибриоидные клетки более 2 мкм с одним жгутиком, крупные палочки более 3 мкм, нитевидные клетки со скользящим типом движения, а также бактериальные палочки с заостренным концом, по-видимому из рода *Cytophaga*, обладающие высокой способностью к лизису волокон клетчатки. Часто в накопительных культурах

присутствовали бактерии рода *Caulobacter*, в том числе и делящиеся клетки.

Таксономическое разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с макрофитами. В эпифитоне тростника определены представители пяти фил эубактерий: Proteobacteria, Cvanobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes и Lentisphaerae (табл. 2). Всего охарактеризовано 23 операционные таксономические единицы (ОТЕ). Самую большую долю общего числа проанализированных последовательностей (84.6%) составили Proteobacteria, среди которых преобладали представители класса Gammaproteobacteria (60.0%). Остальные таксоны представлены единичными последовательностями. Кроме того, были получены последовательности 18S рДНК эукариотических организмов: две последовательности показали 99.9% гомологию с ДНК Ochromonas danica (M32704: Eukarvota: Ochromonadales: Ochromonadaceae: Ochromonas), a одна (94.5%) с Acricotopus lucens (AJ586561; Eukaryota; Arthropoda; Chironomoidea; Chironomidae: Acricotopus).

В эпифитонном микробном сообществе доминировали органогетеротрофные бактерии *Enterobacter* и *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*). Преимущественное большинство генотипов было представлено небольшим числом последовательностей. В целом, отмечено значительное разнообразие микробного сообщества.

В накопительных культурах целлюлозоразрушающих микроорганизмов (табл. 2) генетическое разнообразие было невелико и представлено доминирующими с высоким процентом гомологии генотипами целлюлозоразрушающих бактерий рода Cellvibrio (Gammaproteobacteria) и Exiguobacterium (Firmicutes).

Продукционно-деструкционные процессы в обрастаниях тростника. Бактериальная продукция эпифитона ( $P_b$ ) менялась в пределах 15—117 мкг С/г сут или 1.51—9.44 мкг С/см² сут (средняя 41.2 мкг С/г сут или 3.79 мкг С/см² сут) (рис. 2). Между биомассой бактериоперифитона и его продукцией наблюдали положительную умеренную корреляцию (R = 0.67).

В мае—июне на вегетирующих растениях тростника  $P_b$  в 1.3 раза превышала таковую на прошлогодних растениях. На молодых растениях тростника  $P_b$  достигала максимальных значений в начале июля. Удельная продукция эпифитных бактерий в июле также достигала высоких величин:  $0.77-1.52 \, {\rm суr}^{-1}$  (в среднем  $1.15 \, {\rm суr}^{-1}$ ), что соответствует времени удвоения биомассы бактерий  $10.9-21.6 \, {\rm q}$  (в среднем  $16.3 \, {\rm q}$ ). Высокая продуктивность эпифитных бактерий в этот период не была связана с высокой температурой воды (коэффициент корреляции между этими параметрами составил 0.19). В августе величины  $P_b$  снизились (рис. 2). Удельная продукция эпифит-

Таблица 2. Идентификация микроорганизмов в эпифитоне и накопительных культурах из обрастаний тростника

| Таблица      | Габлица 2. Идентификация микроорганизмов в эпифитоне и накопительных культурах из обрастаний тростника |   |   |  |  |  |  |
|--------------|--|---|---|--|--|--|--|
| Номер<br>ОТЕ | Число<br>ОТЕ   | Ближайший гомолог, %  | Таксономическое положение   |  |  |  |  |
|              | Разнообразие микроорганизмов в эпифитоне тростника   |   |   |  |  |  |  |
| 1            | 1  | JQ692104 Rhodobacter megalophilus R6W-5-1, 99.4   | Proteobacteria, Alphaproteobacteria,<br>Rhodobacterales, Rhodobacteraceae, Rhodobacter  |  |  |  |  |
| 2            | 1  | KC527607 Arsenic-oxidizing bacterium C02, 99.6<br>FJ455532 <i>Dongia mobilis</i> LM22, 98.2                                   | Proteobacteria, Alphaproteobacteria,<br>Rhodospirillales, Rhodospirillaceae, Dongia   |  |  |  |  |
| 3            | 1  | KT720387 Roseomonas sp. LB1-9, 97.8   | Proteobacteria, Alphaproteobacteria,<br>Rhodospirillales, Acetobacteraceae, Roseomonas  |  |  |  |  |
| 4            | 1  | KT343635 <i>Candidatus</i> Finniella lucida strain<br>FinLu02, 88.1<br>KU341206 Uncultured bacterium clone VLSb89, 98.3       | Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rickettsiales,<br>Candidatus Paracaedibacteraceae, Candidatus<br>Finniella                         |  |  |  |  |
| 5            | 2  | AF532187 Monochloroacetic-acid-degrading<br>bacterium MCAA1, 99.2<br>LC027550 <i>Xanthobacter autotrophicus</i> ZJRR-16, 98.5 | Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales,<br>Xanthobacteraceae, Xanthobacter  |  |  |  |  |
| 6            | 1  | KF804094 Pseudoxanthobacter sp. S50, 99.2   | Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales,<br>Xanthobacteraceae, Pseudoxanthobacter  |  |  |  |  |
| 7            | 1  | CP002056 <i>Methylotenera versatilis</i> 301, complete genome, 97.4 AY424823 Uncultured clone, 98.5                           | Proteobacteria, Betaproteobacteria, Methylophilales,<br>Methylophilaceae, Methylotenera   |  |  |  |  |
| 8            | 1  | KU900867 Methylophilus sp. VMB9, 99.2   | Proteobacteria, Betaproteobacteria, Methylophilales,<br>Methylophilaceae, Methylophilus   |  |  |  |  |
| 9            | 1  | EF626687 Aquabacterium fontiphilum CS-6, 98.4<br>DQ327689 Uncultured clone, 98.9  | Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales, unclassified Burkholderiales, Burkholderiales Genera incertae sedis, Aquabacterium |  |  |  |  |
| 10           | 1  | JQ246448 Comamonas sp. WYH22-42, 98.8   | Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales,<br>Comamonadaceae, Comamonas   |  |  |  |  |
| 11           | 7  | KR066643 Enterobacter sp. 126, 98.1–99.6  | Proteobacteria, Gammaproteobacteria,<br>Enterobacterales, Enterobacteriaceae, Enterobacter  |  |  |  |  |
| 12           | 8  | EF028122 Pseudomonas sp., 98.9–100  | Proteobacteria, Gammaproteobacteria,<br>Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas  |  |  |  |  |
| 13           | 2  | AJ414655 <i>Methylobacter</i> sp., 95.9<br>DQ984191 Uncultured clone, 96.4  | Proteobacteria, Gammaproteobacteria,<br>Methylococcales, Methylococcaceae, Methylobacter  |  |  |  |  |
| 14           | 1  | DQ295890 <i>Crenothrix</i> sp., 96.3<br>GU205747 Uncultured bacterium ZSB-H4-5, 98.0  | Proteobacteria, Gammaproteobacteria,<br>Methylococcales, Crenotrichaceae, Crenothrix  |  |  |  |  |
| 15           | 1  | HG794333 Serratia sp. HC85, 99.8  | Proteobacteria, Gammaproteobacteria,<br>Enterobacterales, Yersiniaceae, Serratia  |  |  |  |  |
| 16           | 1  | GQ923773 <i>Legionella</i> sp. 24644, 96.0<br>KU713260 Uncultured bacterium clone<br>DWTP1.2A.C03, 98.8                       | Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Legionellales,<br>Legionellaceae, Legionella   |  |  |  |  |
| 17           | 1  | HQ540311 Sandaracinus amylolyticus NOSO 4, 95.1<br>KU655394 Uncultured clone, 100   | Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Myxococcales,<br>Sorangiineae, Sandaracinaceae, Sandaracinus                                       |  |  |  |  |
| 18           | 1  | AB246770 Myxobacterium sp., 96.1<br>JX222095 Uncultured clone, 98.9   | Proteobacteria, Deltaproteobacteria, Myxococcales   |  |  |  |  |
| 19           | 1  | KX417306 <i>Terrimonas</i> sp., 98.2<br>JX576052 Uncultured <i>Bacteroidetes bacterium</i> clone<br>b19-12, 98.8              | Bacteroidetes, Chitinophagia, Chitinophagales,<br>Chitinophagaceae, Terrimonas  |  |  |  |  |

Таблица 2. Окончание

| Номер<br>ОТЕ   | Число<br>ОТЕ | Ближайший гомолог, %   | Таксономическое положение  |  |  |
|--|--------------|--|--|--|--|
| 20   | 1            | FJ263934 <i>Chitinophagaceae</i> bacterium HU1-GB11, 97.2<br>KC189667 Uncultured clone, 99.4 | Bacteroidetes, Chitinophagia, Chitinophagales,<br>Chitinophagaceae, unclassified Chitinophagaceae                  |  |  |
| 21   | 1            | CP016094 <i>Opitutaceae</i> bacterium IG16b, complete genome, 99.4                           | Verrucomicrobia, Opitutae, Opitutales, Opitutaceae,<br>Opitutus  |  |  |
| 22   | 2            | KJ939031 <i>Leptolyngbya</i> sp., 96.4–99.0  | Cyanobacteria, Synechococcales, Leptolyngbyaceae,<br>Leptolyngbya  |  |  |
| 23   | 1            | FJ394915 <i>Victivallaceae</i> bacterium NML 080035, 97.8 KT797615 Uncultured clone, 99.0    | Lentisphaerae, Lentisphaeria, Victivallales,<br>Victivallaceae, Victivallis  |  |  |
| Разнообразие целлюлозоразрушающих бактерий в накопительных культурах |              |  |  |  |  |
| 24   | 1            | HE795994 <i>Lacibacterium aquatile</i> , type strain LTC-2T, 98.7                            | Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales,<br>Rhodospirillaceae  |  |  |
| 25   | 1            | FN293046 <i>Azospirillum</i> sp. Z012, 98.9  | Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales,<br>Rhodospirillaceae, Azospirillum                          |  |  |
| 26   | 1            | KM187490 Agrobacterium sp. HP5I, 99.7  | Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales,<br>Rhizobiaceae, Rhizobium/Agrobacterium group,<br>Agrobacterium |  |  |
| 27   | 24           | Cellvibrio sp., 98.6–100   | Proteobacteria, Gammaproteobacteria,<br>Cellvibrionales, Cellvibrionaceae, Cellvibrio                              |  |  |
| 28   | 1            | EU111740 Pseudomonas sp. CT29, 99.7  | Proteobacteria, Gammaproteobacteria,<br>Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas                             |  |  |
| 29   | 1            | AB680783 Runella sp. NBRC 15147, 100   | Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales,<br>Cytophagaceae, Runella   |  |  |
| 30   | 8            | KT750857 Exiguobacterium sp. EM048, 99.7–99.9  | Firmicutes, Bacilli, Bacillales, Bacillales Family XII. Incertae Sedis, Exiguobacterium                            |  |  |

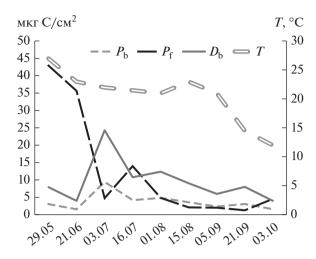
ных бактерий уменьшилась до  $0.87-1.03 \text{ сут}^{-1}$  (в среднем  $0.95 \, \text{сут}^{-1}$ ), что, примерно, соответствует времени удвоения биомассы бактерий 16.1—19.1 ч (в среднем 17.6 ч). В начале сентября, при высокой температуре воды, удельная продукция была относительно высокой  $0.77 \, {\rm cyr}^{-1}$ , что соответствует времени удвоения биомассы бактерий 21.6 ч. Относительно высокая бактериальная продукция в начале осени, по-видимому, в значительной степени связана с началом разложения тканей макрофитов. Так, до конца сентября оставалась высокой численность целлюлозоразрушающих ( $200 \times 10^3$  кл./г) и углеводородокисляющих ( $2000 \times 10^3 \text{ кл./г}$ ) бактерий. Таким образом, бактериальное сообщество перифитона еще в период вегетации использовало ткани растения как питательный субстрат, что, в определенной степени, способствовало более интенсивному росту бактериоэпифитона в этот период. В октябре, продукция бактерий снизилась до минимальных величин (рис. 2), величина удельной продукции уменьшилась до  $0.26 \, \text{сут}^{-1}$ , а

время удвоения биомассы бактерий возросло до 64 ч.

Скорость образования первичной продукции ( $P_{\rm f}$ ) в эпифитоне изменялась в пределах 12.0—365.0 мкг С/г сут или 1.28—42.92 мкг С/см² сут (средняя 118 мкг С/г сут или 12.57 мкг С/см² сут), с максимальными величинами в конце июня.

К осени первичная продукция в обрастаниях тростника снижалась до минимума (рис. 2). На вегетирующих растениях высокую скорость первичной продукции регистрировали весной и в начале лета. Весной активно заселялся водорослями и мертвый растительный субстрат. При одновременном определении на прошлогодних растениях тростника скорость первичной продукции альгоэпифитона была в 1.7 раза выше, чем на вегетирующих.

Высокие величины отношения бактериальной продукции к первичной продукции фитоэпифитона (в пяти опытах из семи бактериальная продукция превышала величину первичной продукции) свиде-



**Рис. 2.** Динамика суточной продукции бактерий  $(P_b)$ , бактериальной деструкции  $(D_b)$  и первичной продукции  $(P_f)$  в обрастаниях тростника южного в течение вегетационного сезона. Слева — мкг  $C/\text{см}^2$  (единицы, одинаковые для всех измерений, кроме температуры), справа — температура T,  $^{\circ}$ C; внизу — дата отбора проб: число, месяц.

тельствовали, что в функционировании сообщества эпифитных бактерий сообщество автотрофных организмов перифитона являлось лишь дополнительным источником органического углерода.

В мае-июне, в начальной стадии формирования обрастаний макрофитов, величины продукции эпифитных бактерий ( $P_{\rm b}$ ) были невысокими (рис. 2). Удельная продукция бактерий изменялась в пределах  $0.39-0.99 \text{ сут}^{-1}$  (в среднем  $0.69 \text{ сут}^{-1}$ ), а время удвоения биомассы бактерий — 16.8—42.6 ч (в среднем 29.7 ч). В это время первичная продукция эпифитона была выше, чем в последующие летние месяцы. Отношение бактериальной продукции к первичной продукции не превышало 0.07. В этот период фитоэпифитон мог полностью обеспечивать энергетические потребности эпифитных бактерий и быть для них источником органического углерода. На рисунке четко выражен пик роста бактериальной продукции и возрастание деструкции вслед за пиком первичной продукции альгоэпифитона.

Деструкция ОВ в эпифитоне тростника шла с интенсивностью 34.0-301.0 мкг С/г сут (средняя 105.5 мкг С/г сут). Максимальные величины скорости деструкции ОВ отметили в июле, минимальные — в октябре. В начале сезона (май—июнь) деструкции ОВ на молодых вегетирующих растениях протекала в 1.3 раза активнее, чем на прошлогодних растениях. Скорость деструкции ОВ в обрастаниях тростника была тесно связана с продукцией эпифитных бактерий (R=1.0) и не зависела (R=0.19) от температуры окружающей среды (рис. 2). Высокие значения отношения

первичной продукции эпифитона к деструкции органического вещества весной и в начале лета (в среднем за май—июнь 8.50) свидетельствуют, что бактериоэпифитон может обеспечить энергетические потребности сообщества за счет обрастаний водорослей. В летние месяцы и до момента ухода воды из прибрежья в октябре это соотношение составляет в среднем за четыре месяца 0.54, и можно предположить, что развитие бактериальных обрастаний в этот период происходит, в основном, за счет органического вещества макрофитов.

Одновременные с изучением эпифитона замеры продукционно-деструкционных процессов в бактериопланктоне зарослей тростника показали, что скорость бактериальной продукции, первичной продукции фитопланктона и бактериальная деструкция в среднем протекали со скоростью 52.6, 561 и 449 мкг С/л сут соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Практически во всех водохранилищах Волги высокопродуктивный тростник южный является одним из доминантных водных растений, а в Рыбинском водохранилище наблюдается тенденция нарастания продуктивности растительного сообщества связанная с развитием именно гелофитов (Папченков, 2020). Ежегодно в прибрежной зоне образуются тысячи тонн растительного материала, подвергающихся затем бактериальной деструкции. Гетеротрофные бактерии численно и биохимически доминируют во всех местообитаниях, являясь основными факторами минерализации органического вещества, (Azam, Malfatti, 2007; Stocker, 2012), что тесно связано с процессами самоочищения водоемов (Олейник, 1991; Lalke et al., 1996; Kosten et al., 2009). Эпифитные бактерии по окончании вегетации участвуют в разложении отмершего растительного материала (Rogers, 1982).

Обнаруженные высокая численность и биомасса эпифитных бактериальных сообществ, свидетельствует об их высоком потенциале участия в утилизации растительных остатков. Для тростника обыкновенного данные процессы начинаются с начала вегетации (рис. 1, 2), и замедляются с понижением температуры до неблагоприятной для бактериального сообщества, возобновляясь весной на перезимовавшем растительном материале. Литературных данных о подледной деградации тростника нами не найдено. Показатели обилия бактерий эпифитов тростника в разных водоемах неодинаковы. Так, численность и биомасса бактерий в обрастаниях тростника в эвтрофном Иваньковском водохранилище (Верхняя Волга), соответственно, была в 1.5 и 2.0 раза выше, чем в Рыбинском водохранилище (Рыбакова, Копылов, 2017).

Наблюдение за сезонной динамикой развития бактериальных обрастаний тростника показало, что колебания численности и биомассы скорее были связаны с сезонными изменениями в развитии растений и возрастом биопленок (рис. 1). Два выявленных пика наблюдали в весенне-летний период и осенью — в период массового отмирания растений, первый при температуре воды 22.0°C, второй при 14.5°C.

Сравнение эпифитона на прошлогоднем (мертвом) и молодом вегетирующем тростнике показало, что на вегетирующих растениях нарастание шло быстрее, и биомасса эпифитона была более чем в 2 раза выше, что, вероятно, связано с развитием альгоэпифитона и использованием его органического вещества, в то время как прошлогодний тростник был обеднен необходимыми компонентами (Корелякова, 1970).

Несмотря на значительный интерес исследователей к роли эпифитных бактерий в разложении растений, количественная информация о развитии эпифитных бактерий на живых растениях немногочисленна. По литературным данным численность гетеротрофных бактерий в эпифитоне для плавающих и погруженных макрофитов на *Ceratophylum* и *Potamogeton* от  $0.4\ \rm дo\ 2\times 10^8\ kn./cm^2$  (Theil-Nielsen, Sondergaard, 1999), на листьях разного возраста *Ranunculus penicillatus* от  $1\times 10^5\ \rm дo\ 3\times 10^7\ kn./cm^2$  (Hossell, Baker, 1979), бактериальная колонизация на *Ceratophyllum demersum* в пределах от 4 до  $18\times 10^6\ \rm kn./cm^2$  (Hempel et al., 2008). Полученные нами для тростника данные находятся в этих диапазонах.

В Рыбинском водохранилище при площади зарослей 40.4 км<sup>2</sup> фитомасса тростника составила 149.4 тыс. тонн, т.е. на 1 м<sup>2</sup> зарослей приходилось 3.7 кг сырой растительной массы (Папченков, 2013). Исходя из того, что примерно половина растения находится под водой и обрастает эпифитоном, а на 1 г растения приходится в среднем 161.1 мкг биомассы бактерий, доля биомассы бактериэпифитона в фитомассе погруженной части тростника с  $1 \text{ м}^2$  составила 0.008%, что на порядок меньше, чем в озере Нарочь, развивающемся по макрофитному типу -0.11% (Инкина, 1989). Эти расчеты позволяют соотнести долю бактерий эпифитов, потенциальных деструкторов органического вещества образованного высшими водными растениями, с биомассой этих растений.

Большое видовое и функциональное разнообразие эпифитона, метаболическая активность в окислительно-восстановительных зонах обрастаний (Larned, 2010; Wu et al., 2014), способствуют его адаптации к среде с высоким содержанием питательных веществ, позволяя регулировать структуру сообщества (Shangguan et al., 2015). Самой многочисленной группой культивируемых бактерий, объединенных общими пищевыми

предпочтениями, являются микроорганизмы, растущие на рыбо-пептонном агаре. Эта группа бактерий наиболее быстро реагирует на поступление легкорастворимых органических веществ. Доля их в общей численности бактерий эпифитов тростника достигает нескольких процентов и повышается в период массового отмирания растений при высвобождении лабильных питательных веществ в водную среду уже на начальных стадиях разложения первичных продуцентов (Zhao et al., 2017). По нашим данным около 30% микроорганизмов в обрастаниях тростника, использующих легко усваиваемые органические вещества, способны вырабатывать фермент каталазу; и доля их от всех сапрофитов возрастает к осени более чем вдвое, свидетельствуя об усилении окислительных процессов в период старения и разложения растений.

Изменения численности углеводородокисляющих микроорганизмов могут являться показателем антропогенных загрязнений, а также свидетельствовать о внутриводоемном поступлении углеводородов, связанном с выделениями и разрушением высших водных растений (Рыбакова, Васильева, 2003). Так как в районе нашего исследования антропогенная нагрузка считается невысокой, наблюдаемое ежегодное возрастание количеств этих микроорганизмов в обрастаниях тростника в конце лета—осенью, скорее связано с сезонными изменениями в эпифитоне и отмиранием растений.

Основной составляющей высшей водной растительности является клетчатка, содержание ее в разных группах растений неодинаково и может колебаться в пределах от 16.7 до 42.0% от суммы органических веществ. В полупогруженных в воду растениях, таких как тростник, относящихся к жесткой водной растительности, этих веществ примерно в 1.5 раза больше, чем у погруженной и плавающей, мягкой водной растительности, и к осени количество клетчатки увеличивается до максимальных величин (Корелякова, 1970). Изучение процессов утилизации в водных системах этого трудноразлагаемого вещества является сложным вопросом из-за отсутствия единых стандартов и методов. Мы показали, что активно разрушающие клетчатку микроорганизмы развивались не в период отмирания растений, как можно было бы ожидать, а на растущих растениях, имея высокую численность в середине лета. Осенью их численность снижалась. В весенний и раннелетний периоды разлагающих клетчатку бактерий регистрировали больше на мертвом тростнике, чем на вегетирующих молодых растениях. Вероятно, это связано с зимней мацерацией тростника и, как следствие, лучшей доступностью клетчатки, что позволяет при весеннем затоплении зарослей интенсивно развиваться микроорганизмам этой физиолого-трофической группы. Изучение культивируемых разрушителей клетчатки с помощью электронного микроскопа позволило нам выявить основные морфотипы бактерий. Среди них бактерии из рода *Cytophaga*, собственно разрушители клетчатки и, возможно, как сопутствующие этому процессу, бактерии рода *Caulobacter*, что косвенно подтверждается их активным состоянием в накопительной культуре *Cytophaga*, о чем свидетельствуют обнаруженные делящиеся клетки. Молекулярно-генетическими методами показано присутствие бактерий рода *Cellvibrio* (*Gammaproteobacteria*), разрушающих клетчатку, и *Exiguobacterium* (*Firmicutes*), развивающихся на глюкозе, сахарозе и других сахарах, образующихся в процессе ее деградации (табл. 2).

Полученные нами результаты по генетическому разнообразию обрастаний тростника согласуются с литературными данными (Yamamoto, 2005), где для воздушных и погруженных стеблей тростника определены преимущественно изоляты, принадлежащие к классам Gammaproteobacteria и Betaproteobacteria.

Примечательно, что природное водное микробное сообщество в зарослях тростника Рыбинского водохранилища представлено двумя основными филогенетическими линиями: протеобактериями и цианобактериями. Подавляющее большинство последовательностей составляют класс Гаммапротеобактерий – это представители широко распространенного рода *Pseudomonas*. Родство всех проанализированных последовательностей с представителями рода *Pseudomonas* составило от 98.8 до 99.7%. Кроме представителей псевдомонад, были получены последовательности, имеющие гомологию с представителями родов Pantoea и Enterobacter. При этом идентифицированные энтеробактерии выделены как эндофитные или ризосферные бактерии. Цианобактерии представлены родами Synechoccocus, Anabaena и Aphanizomenon с высоким процентом их гомологии с культивируемыми представителями (98.9-99.8%) (Лаптева и соавт., 2015).

Молекулярно-генетическими методами также было установлено, что альфапротеобактерии, бетапротеобактерии, гаммапротеобактерии и сфингобактерии могут эффективно разлагать органическое вещество (Shangguan et al., 2015). Другая группа бактерий, включая виды Achromobacter, Alcaligenes, Bacillus, Hydrogenophaga u Pseudomonas имеет гетеротрофные возможности нитрификации и аэробной денитрификации (Feng et al., 2015). При этом некоторые авторы сообщают, что видоспецифичность хозяина сильно влияет на структуру и функциональные особенности эпифитонного сообщества бактерий (Zhang et al., 2018). Деструкция частей живых растений и их остатков после отмирания представляет собой сложный процесс, который зависит от многих составляющих, в том числе от химических свойств макрофитов (Sariyildiz, 2003). В нашей работе изменения в структуре различных физиолого-трофических групп мы наблюдали в связи с температурными изменениями и процессами роста и старения обрастаний, что отмечается и другими исследователями (Cai et al., 2013; Zhao et al., 2021).

Продукционно-деструкционные процессы в эпифитоне макрофитов меняются в течение сезона. Максимально высокую бактериальную продукцию в обрастаниях тростника мы наблюдали вслед за пиком образования первичной продукции эпифитными водорослями (рис. 2). Подъем не был связан с температурой воды в зарослях. Вероятно, это связано с видовой трансформацией фитоценоза обрастаний (Девяткин, 1983). В своей работе автор отмечает, что в процессе старения обрастаний возрастает его гетеротрофная составляющая.

В осенние месяцы на фоне уменьшения температуры и вторичная и первичная продукция в эпифитоне постепенно снижались, но скорость этих процессов регистрировали на уровне некоторых замеров в летние месяцы. Относительно высокая бактериальная продукция в этот период, вероятно, поддерживалась начинающимся разложением макрофитов. До значительного понижения температуры в обрастаниях тростника оставалась высокой численность целлюлозоразрушающих и углеводородокисляющих бактерий. При этом скорость деструкции органических веществ в обрастаниях тростника была тесно связана с продукцией эпифитных бактерий и не зависела от температуры окружающей среды.

Полученные нами величины продукции эпифитных бактерий тростника оказались в большинстве случаев выше зарегистрированных для эпифитона четырех видов макрофитов реки Шпрее (0.127—1.272 мкг С/см² сут) в условиях близких температур воды (Fischer, Pusch, 2001) и выше суточной продукции в обрастаниях тростника Рыбинского водохранилища, определенной по включению <sup>3</sup>Н-тимидина (0.293 мкг С/см²), которая, в свою очередь, превышала продукцию в обрастаниях других высших водных растений (Копылов и соавт., 2014).

Используя данные по фитомассе тростника южного прибрежной зоны водохранилища (Папченков, 2013) и приняв, что в среднем подводная часть растений составляет 1 м, мы рассчитали продукцию бактериальных обрастаний на 1 м<sup>2</sup> (1 м<sup>3</sup>), которая составила 152.4 мг С в сутки. В столбе воды зарослей суточная продукция бактериопланктона показала лишь 52.6 мг С/м<sup>3</sup>. При этом бактериальная продукция обрастаний тростника сравнима с таковой для микрофлоры донных отложений и даже превышает ее (Буторин, 1984).

Высокая первичная продукция макрофитов и эпифитных водорослей в прибрежной зоне в соче-

тании с постоянной потерей лабильного ОВ из-за разлагающихся макрофитов поддерживают более высокую продукцию бактериальных обрастаний и бактериопланктона в зарослях макрофитов по сравнению с открытыми участками водоема (Wetzel et al., 1998), влияя на циклы питательных веществ (Liu et al., 2016; Yang et al., 2018).

Таким образом, наше исследование показывает специфичность ассоциированного с тростником эпифитонного сообщества, большее влияние растения-хозяина на структуру и активность бактериальных биопленок, чем сезонное изменение условий среды.

Приведенные данные убеждают, что сообщество эпифитных бактерий разнообразно по своей трофической направленности и представляет собой комплекс потенциальных деструкторов высокомолекулярных соединений, содержащихся в тканях макрофитов или образующихся в процессе их разрушения. Это позволяет ему играть основную роль в утилизации органического вещества в прибрежной зоне водохранилища, так как численность и функциональная активность бактериального сообщества обрастаний сравнимы и часто превышают таковые для бактериопланктона и бентоса.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к. б. н. С.А. Курбатовой за помощь в редактировании содержания статьи, д. б. н. А.И. Копылову за материальную и консультационную поддержку при проведении исследований, к. б. н. С.Э. Болотову за помощь в работе с графикой.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 121051100102-2, 121051100109-1 и поддержана грантом РФФИ № 09-04-00977, Программой фундаментальных исследований ОБН РАН "Биологические ресурсы России".

# СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В исследованиях не использованы животные в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белькова Н.Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие / Под ред. Андреевой А.М. Ярославль: Изд-во ООО "Принтхаус", 2009. С. 53—63.

Большой практикум помикробиологии: учебное пособие для государственных университетов СССР // Аристовская Т.В., Владимирская М.Е., Голлербах М.М. [и др.] / Под общ. ред. Селиберга Г.Л. . М.: Высшая школа, 1962. 491 с.

*Буторин А.Н.* Активность микрофлоры в поверхностном слое донных отложений озер Северо-Двинской системы. Л.: "Наука", 1984. Инф. бюлл. № 64. С. 3—5.

Девяткин В.Г. Состав и продуктивность фитопланктона в прибрежной зоне Рыбинского водохранилища // Пресноводные гидробионты и их биология. Л.: 1983. С. 52—70.

*Инкина Г.А.* Микрофлора в обрастаниях высших водных растений // Гидробиол. журн. 1989. Т. 25. № 4. С. 54-57.

Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Рыбакова И.В., Заботкина Е.А. Микробное сообщество эпифитона водохранилища: роль вирусов в смертности гетеротрофных бактерий и пикоцианобактерий // Успехи современной биологии. 2014. Т. 134. № 2. С. 111-120.

*Корелякова И.Л.* Химический состав высшей водной растительности Киевского водохранилища // Гидробиол. журн. 1970. Т. 6. № 5. С. 20-28.

*Кузнецов С.И.* Метод изготовления препаратов для получения электронно-микроскопических снимков бактерий из воды и озерного ила // Флора, фауна и микроорганизмы Волги. Рыбинск: Ин-т биол. внутр. вод АН СССР, 1974. С. 303—309.

*Кузнецов С.И., Дубинина Г.А.* Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.

Лаптева Н.А., Рыбакова И.В., Суханова Е.В., Белькова Н.Л. Структура и функциональная активность бактериопланктона в воде среди зарослей макрофитов в прибрежье Рыбинского водохранилища // Гидробиол. журн. 2015. Т. 51. № 5. С. 94—104.

Lapteva N.A., Rybakova I.V., Sukhanova Ye.V., Bel'kova N.L. Structure and functional activity of bacterio-plankton in water within macrophytes thickets in the coastal zone of the Rybinsk reservoir // Gidrobiologicheskiy Zhurnal. 2015. V. 51. P. 94—104.

*Ляшенко Г.Ф.* Динамика высшей водной растительности Рыбинского водохранилища // Ботанический журн. 1999. № 12. С. 106-111.

*Одинцов В.С., Лаптева Н.А.* Азотфиксирующая активность эпифитов на некоторых макрофитах Японского моря // Биология моря. 1984. № 1. С. 60-62.

*Олейник Г.Н.* Бактериальная деструкция органического вещества в водоемах и водотоках // Водные ресурсы. 1991. № 2. С. 89-97.

*Папченков В.Г.* Степень зарастания Рыбинского водохранилища и продуктивность его растительного покрова // Биология внутренних вод. 2013. № 1. С. 24—31.

Papchenkov V.G. The degree of overgrowth of the Rybinsk Reservoir and productivity of its vegetation cover // Inland Water Biol. 2013. № 1. P. 18–25.

*Папченков В.Г., Папченкова Г.А.* Динамика и зарастание водохранилищ Волги // Водные ресурсы. 2020. Т. 47. № 4. С. 402-410.

Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. Лабораторное руководство. Л.: Наука, 1974. 194 с.

Рыбакова И.В., Васильева М.И. Микробиологическая характеристика мелководий Волжского плеса Рыбинского водохранилища // Тезисы межд. конф. "Экологические проблемы бассейнов крупных рек-3". Тольятти, 15—19 сентября, 2003 г. С. 244.

Рыбакова И.В., Белькова Н.Л., Лаптева Н.А., Суханова Е.В. Адаптация молекулярно-генетических методов для изучения таксономического разнообразия микробных сообществ, ассоциированных с макрофитами // Биология внутренних вод. 2009. № 1. С. 102—110.

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

Рыбакова И.В. Бактериальные обрастания массовых видов высших водных растений Рыбинского водохранилища // Труды ИБВВ РАН. 2016. Вып. 74(77). С. 50—58.

Рыбакова И.В., Копылов А.И. Гетеротрофные бактерии в эпифитоне высших водных растений Иваньковского водохранилища // Биология внутренних вод. 2017. № 2. С. 117—120. Rybakova I.V., Kopylov A.I. Heterotrophic bacteria in epiphiton of higher aquatic plants in the Ivankovo Reservoir // Inland Water Biol. 2017. V. 10. P. 239—242. Тимакова Т.М. Разложение клетчатки в Иваньковском и Угличском водохранилищах. М.: Наука, 1984. С. 124—139. Тимакова Т.М., Романенко В.И. Целлюлозные бактерии и потенциальная способность разложения целлюлозы в озерах Карелии // Микробиология. 1984. Т. 53. С. 142—148.

Якушин В.М. Развитие бактерий среди зарослей и в перифитоне тростника в Северо-Крымском канале // Гидробиологический журн. 1978. Т. 14. С. 36—40.

Azam F., Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. P. 782—791.

Asaeda T., Sultana M., Manatunge J., Fujino T. The effect of epiphytic algae on the growth and production of *Potamogeton perfoliatus* L. in two light conditions // Environ. Exp. Bot. 2004. V. 52. P. 225–238.

Basberg L., Banks D., Sæther O. Redox processes in groundwater impacted by landfill leachate // Aquat. Geochem. 1998. V. 4. P. 253–272.

*Bronmark C.* Interactions between epiphytes, macrophytes and freshwater snails: a review // J. Mollusc. Stud. 1989. V. 55. P. 299–311.

Corstanje R., Reddy K.R., Portier K.M. Typha latifolia and Cladium jamaicense litter decay in response to exogenous nutrient enrichment // Aquat. Bot. 2006. V. 84. I. 1. P. 70–78.

Cai X., Gao G., Tang X., Dong B., Dai J., Chen D., Song Y. The response of epiphytic microbes to habitat and growth status of *Potamogeton malaianus* Miq. in Lake Taihu // J. Basic Microbiol. 2013. V. 53. P. 828–837.

Coci M., Nicol G.W., Pilloni G.N., Schmid M., Kamst-van Agterveld M.P., Bodelier P.L., Laanbroek H.J. Quantitative assessment of ammonia-oxidizing bacterial communities in the epiphyton of submerged macrophytes in shallow lakes // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 1813—1821.

Feng C., Huang L., Yu H., Yi X., Wei C. Simultaneous phenol removal, nitrification and denitrification using microbial fuel cell technology // Water Res. 2015. V. 76. P. 160–170.

*Fischer H., Pusch M.* Comparison of bacterial production in sediments, epiphyton and the pelagic zone of lowland river // Freshwat. Biol. 2001. V. 46. P. 1335–1348.

Hempel M., Blume M., Blindow I., Gross E.M. Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater // Microbiol. 2008. V. 8. Art. 58.

Hossell J.C., Baker J.H. Epiphytic bacteria on the freshwater plant *Ranunculus penicillatus* enumeration, distribution and identification // Arch. Hydrobiol. 1979. V. 86. P. 322–337.

*Islam J., Singhal N.* A laboratory study of landfill-leachate transport in soils // Water Res. 2004. V. 38. P. 2035–2042.

Kosten S., Lacerot G., Jeppesen E., Marques D.D.M., Nes E.H.V., Mazzeo N., Scheffer M. Effects of submerged vegetation on water clarity across climates // Ecosystems. 2009. V. 12. P. 1117–1129.

*Lalke E., Donderski W., Blotevogel K.* Role of epiphytic bacteria in the utilization of organic matter // Oceanol. Stud. Mar. Biol. [Pol. Acad. Sci.]. 1996. V. 25. P. 19–30.

*Larned S.T.* A prospectus for periphyton: recent and future ecological research // J. North. Am. Benthol. Soc. 2010. V. 29. P. 182–206.

*Nocker A., Camper A.K.* Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 1997–2004.

Liu J., Liu W., Wang F., Kerr P., Wu Y. Redox zones stratification and the microbial community characteristics in a periphyton bioreactor // Bioresour. Technol. 2016. V. 204. P. 114–121.

Norland S. The relationship between biomass and volume of bacteria // Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology / Eds. Kemp P., Sherr B., Sherr E., Cole J. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. P. 303–308.

*Porter R.G., Feig Y.S.* The use of DAPI for identification and counting of aquatic microflora // Limnol. Oceanogr. 1980. V. 25. P. 943–948.

*Qin B.Q., Song Y.Z., Gao G.* The role of periphytes in the shift between macrophyte and phytoplankton dominated systems in a shallow, eutrophic lake (Lake Taihu, China) // Sci. China Ser. C. 2006. V. 49. P. 597–602.

Rogers K.H., Breen C.M. Decomposition of Potamogeton crispus L.: the effect of drying on the pattern of mass and nutrient loss // Aquat. Bot. 1982. V. 12. P. 1–12.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. N.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. V. 2. 345 p.

Schneider T., Keiblinger K.M., Schmid E., Sterflinger-Gleixner K., Ellersdorfer G., Roschitzki B., Richter A., Eberl L., Zechmeister-Boltenstern S., Riedel K. Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions // ISME J. 2012. V. 6. P. 1749–1762.

Shangguan H., Liu J., Zhu Y., Tong Z., Wu Y. Start-up of a spiral periphyton bioreactor (SPR) for removal of COD and the characteristics of the associated microbial community // Bioresour. Technol. 2015. V. 193. P. 456–462.

Srivastava J.K., Chandra H., Kalra S.J.S., Mishra P., Khan H., Yadav P. Plant—microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality: a review // Appl. Water Sci. 2017. V. 7. P. 1079—1090.

Steemann Nielsen E. The use of radioactive carbon (<sup>14</sup>C) for measurement organic production in the sea // J. Conseil. Perman. Intern. Explorat. Mer. 1952. V. 18. P. 117–140.

Stocker R. Marine microbes see a sea of gradients // Science. 2012. V. 338. P. 628–633.

*Theil-Nielsen J., Sondergaard M.* Production of epiphytic bacteria and bacterioplankton in three shallow lakes // Oikos. 1999. V. 86. P. 283–292.

Wetzel R.G., Sondergaard M. Role of submerged macrophytes for the microbial community and dynamics of dissolved organic carbon in aquatic ecosystem // The Structuring Role of Aquatic Macrophytes in Lakes / Eds. Jeppesen E., Søndergaard M., Søndergaard M., Christoffersen K. Springer, New York, NY, 1998. P. 133–148.

Wu Y., Xia L., Yu Z., Shabbir S., Kerr P.G. In situ bioremediation of surface waters by periphytons // Bioresour. Technol. 2014. V. 151. P. 367–372.

Yamamoto M., Murai H., Takeda A., Okunishi S., Morisaki H. Bacterial flora in the biofilm formed on the submerged surface of the reed *Phragmites australis* // Microb. Environ. 2005. V. 20. P. 14–24.

*Yang Y., Chen W., Yi Z., Pei G.* The integrative effect of periphyton biofilm and tape grass (*Vallisneria natans*) on internal loading of shallow eutrophic lakes // Environ. Sci. Pollut. Res. 2018. V. 25. P. 1773–1783.

Zhang L., Zhang S., Lv X., Qiu Z., Zhang Z., Yan L. Dissolved organic matter release in overlying water and bacterial community shifts in biofilm during the decomposition of *Myriophyllum verticillatum* // Sci. Total Environ. 2018. V. 633. P. 929–937.

Zhao B., Xing P., Wu Q.L. Microbes participated in macrophyte leaf litters decomposition in freshwater habitat // FEMS Microbiol. Ecol. 2017. V. 93. fix108.

Zhao B., Xing P., Wu Q.L. Interactions between bacteria and fungi in macrophyte leaf litter decomposition // Environ. Microbiol. 2021. V. 23. P. 1130–114.

# Structural and Functional Characterization of Bacterial Biofilms Formed on *Phragmites australis* (Cav.) in the Rybinsk Reservoir

R. A. Fedorov<sup>1, \*</sup>, I. V. Rybakova<sup>1</sup>, N. L. Belkova<sup>2</sup>, and N. A. Lapteva<sup>1, †</sup>

<sup>1</sup>Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, 152742 Russia <sup>2</sup>Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia \*e-mail: fedor-off@yandex.ru

Received September 20, 2021; revised January 23, 2022; accepted January 28, 2022

**Abstract**—The article presents long-term data of abundance and biomass of bacterial biofilms forming on *Phragmites australis* (Cav.), one of widespread species of the Rybinsk Reservoir higher aquatic plants. Daily production of bacteria and phytoepiphyton is reported, as well as the rate of bacterial degradation of organic matter. The numbers of microorganisms belonging to various physiological groups were determined, and their relative abundance in the total bacterioepiphyton was determined. Epiphyton taxonomic diversity was determined using molecular genetic techniques. Bacteria of the genus *Cellvibrio* (class *Gammaproteobacteria*) were found to be responsible for cellulose degradation.

**Keywords:** bacterioepiphyton, *Phragmites australis*, Rybinsk Reservoir, physiological and trophic diversity, production, degradation, molecular genetic techniques