

СОДЕРЖАНИЕ

Том 90, номер 2, 2021

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- О возможности аэробной продукции метана пелагическими микробными сообществами моря Лаптевых
О. С. Самылина, И. И. Русанов, И. Ю. Тарновецкий, Е. В. Якушев, А. А. Гринько, Е. Е. Захарова, А. Ю. Меркель, Т. А. Канапацкий, И. П. Семилетов, Н. В. Пименов 131
- Выделение целлюлозолитических штаммов *Thermoanaerobacterium* из термофильных метаногенных сообществ
Л. И. Попова, Х. Баль, М. А. Егорова, М. Р. Леонтьева, А. И. Нетрусов, Е. А. Цавкелова 145
- Выделение и идентификация алкалолотерантных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища
А. В. Шилова, А. Ю. Максимов, Ю. Г. Максимова 155
- Трансформация микробных комплексов в компонентах почвенных конструкций разного генезиса (почва, торф, песок) при процессах замораживания—оттаивания
А. М. Глушакова, Л. В. Лысак, А. В. Качалкин, А. Е. Иванова, А. Б. Умарова, И. А. Абрамян, З. С. Ежелев, И. А. Максимова 166
- Антибиотикорезистентные микроорганизмы и детерминанты множественной лекарственной устойчивости у бактерий рода *Pseudomonas* в очистных сооружениях г. Пущино
И. А. Кошелева, Т. Ю. Измалкова, О. И. Сазонова, Т. В. Сиунова, А. Б. Гафаров, С. Л. Соколов, А. М. Боронин 179
- Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum*
З. Р. Вершинина, О. В. Чубукова, Ю. М. Никоноров, Л. Р. Хакимова, А. М. Лавина, Л. Р. Каримова, Ан. Х. Баймиев, Ал. Х. Баймиев 191
- Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 как потенциальные агенты биоконтроля и стимуляторы роста растений
Д. Л. Иткина, А. Д. Сулейманова, М. Р. Шарипова 204
- Пробиотический штамм *Lactobacillus fermentum* 39: биохимические свойства, особенности генома, антивирусная активность
И. В. Соловьева, Н. А. Новикова, А. Г. Точилина, И. В. Белова, А. Ю. Кашиников, Т. А. Шашина, В. А. Жирнов, С. Б. Молодцова 215
- Микоцитинотипирование видов *Cyberlindnera*
В. И. Голубев 223
- Возрастные изменения дрожжевой составляющей микробиома *Drosophila melanogaster*
А. С. Дмитриева, И. А. Максимова, А. В. Качалкин, А. В. Марков 226

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Сравнительное исследование путей метаногенеза в осадках термокарстовых и полигенетических ямальных озер
А. Ю. Каллистова, В. В. Кадников, А. С. Саввичев, И. И. Русанов, Ю. А. Дворников, М. О. Лейбман, А. В. Хомутов, Н. В. Равин, Н. В. Пименов 236
- Desulfovibrio* из микробиоты детей с расстройством аутистического спектра связывают железо в малорастворимые кристаллические сульфиды
О. П. Иккерт, М. В. Иванов, А. Ухова, В. С. Зюсман, Л. Б. Глухова, М. Р. Авакян, О. В. Карначук 243

КРИТИКА

- Рецензия на учебное пособие “Биоразнообразие и систематика микроорганизмов”, авт. И.Б. Ившина, А.В. Криворучко, М.С. Куюкина
С. Ю. Щеголев 247

- Авторский указатель 2020 г. 250

Contents

Vol. 90, No. 2, 2021

Experimental Articles

On the Possibility of Aerobic Methane Production by Pelagic Microbial Communities of the Laptev Sea

O. S. Samylina, I. I. Rusanov, I. Yu. Tarnovetskii, E. V. Yakushev, A. A. Grinko, E. E. Zakharova, A. Yu. Merkel, T. A. Kanapatskiy, I. P. Semiletov, and N. V. Pimenov 131

Isolation of Cellulose-Degrading *Thermoanaerobacterium* Strains from Thermophilic Methanogenic Microbial Communities

L. I. Popova, H. Bahl, M. A. Egorova, M. R. Leont'eva, A. I. Netrusov, and E. A. Tsavkelova 145

Isolation and Identification of Alkalitolerant Bacteria with Hydrolytic Activity from Soda Storage

A. V. Shilova, A. Yu. Maksimov, and Yu. G. Maksimova 155

Transformation of Microbial Complexes in Components of Soil Structures of Different Origin (Soil, Peat, Sand) during Freezing-Thawing Processes

A. M. Glushakova, L. V. Lysak, A. V. Kachalkin, A. E. Ivanova, A. B. Umarova, I. A. Abramyan, Z. S. Ezhelev, and I. A. Maksimova 166

Antibiotic-Resistant Microorganisms and Multiple Drug Resistance Determinants in *Pseudomonas* Bacteria from Pushchino Water Treatment Facilities

I. A. Kosheleva, T. Yu. Izmailkova, O. I. Sazonova, T. V. Siunova, A. B. Gafarov, S. L. Sokolov, and A. M. Boronin 179

Effect of the *rosR* Gene Overexpression on Biofilm Formation by *Rhizobium leguminosarum*

Z. R. Vershinina, O. V. Chubukova, Yu. M. Nikonorov, L. R. Khakimova, A. M. Lavina, L. R. Karimova, An. Kh. Baimiev, and Al. Kh. Baimiev 191

Pantoea brenneri AS3 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 as Potential Biocontrol and Plant Growth-Promoting Agents

D. L. Itkina, A. D. Suleimanova, and M. R. Sharipova 204

The Probiotic Strain *Lactobacillus fermentum* 39: Biochemical Properties, Genomic Features, and Antiviral Activity

I. V. Soloveva, N. A. Novikova, A. G. Tochilina, I. V. Belova, A. Yu. Kashnikov, T. A. Sashina, V. A. Zhirnov, and S. B. Molodtsova 215

Mycocinotyping of *Cyberlindnera* Species

W. I. Golubev 223

Age-Related Changes in the Yeast Component of the *Drosophila melanogaster* Microbiome

A. S. Dmitrieva, I. A. Maksimova, A. V. Kachalkin, and A. V. Markov 226

Short Communications

Comparative Study of Methanogenic Pathways in the Sediments of Thermokarst and Polygenetic Yamal Lakes

A. Yu. Kallistova, V. V. Kadnikov, A. S. Savvichev, I. I. Rusanov, Yu. A. Dvornikov, M. O. Leibman, A. V. Khomutov, N. V. Ravin, and N. V. Pimenov 236

A *Desulfovibrio* Isolate from the Microbiome of Children with Autistic Spectrum Disorders Immobilizes Iron in Poorly Soluble Crystalline Sulfides

O. P. Ikkert, M. V. Ivanov, A. Ukhova, V. S. Zuysman, L. B. Glukhova, M. R. Avakyan, and O. V. Karnachuk 243

Criticism

On the Book "Biodiversity and Systematics of Microorganisms" by I.B. Ivshina, A.V. Krivoruchko, and M.S. Kuyukin

S. Yu. Shchegolev 247

Author Index, 2020

250

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

О ВОЗМОЖНОСТИ АЭРОБНОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТАНА
ПЕЛАГИЧЕСКИМИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ
МОРЯ ЛАПТЕВЫХ¹

© 2021 г. О. С. Самылина^{a, *}, И. И. Русанов^a, И. Ю. Тарновецкий^a,
Е. В. Якушев^{b, c}, А. А. Гринько^d, Е. Е. Захарова^a, А. Ю. Меркель^a,
Т. А. Канапакский^a, И. П. Семилетов^{e, f}, Н. В. Пименов^a

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

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

^cNorwegian Institute for Water Research (NIVA), Осло, 0349 Норвегия

^dНациональный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, 634050 Россия

^eТихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева
Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690041 Россия

^fВысшая школа экономики, Москва, 111033 Россия

*e-mail: olga.samyлина@gmail.com

Поступила в редакцию 21.10.2020 г.

После доработки 17.11.2020 г.

Принята к публикации 18.11.2020 г.

Проведены исследования таксономического разнообразия и метаболической активности микробных сообществ водной толщи моря Лаптевых над полем метановых газовыделений и вне зоны разгрузки метановых сипов. Содержание растворенного метана в водной толще на обеих станциях имело сопоставимые значения вплоть до глубины расположения пикноклина (25 м). На этой глубине были зафиксированы локальные максимумы содержания метана с наибольшим значением (116 нМ CH₄) на станции, удаленной от метанового сипа. Данные секвенирования гена 16S рРНК и измерения активности гидрогенотрофного метаногенеза свидетельствуют об отсутствии в зоне пикноклина и в других исследованных горизонтах водной толщи метаногенеза, обусловленного метаногенными археями. Филогенетическое разнообразие микроорганизмов, выявленное на основании секвенирования гена 16S рРНК, а также радиоизотопное измерение первичной продукции (ПП), активности темновой ассимиляции углекислоты (ТАУ) и скорости окисления метана (МО) указывают на функционирование в пелагиали моря Лаптевых микробного сообщества, способного в олиготрофных условиях арктического бассейна трансформировать широкий спектр органических соединений. Обсуждаются гидрохимические предпосылки и возможные микробные агенты аэробной продукции метана через деметилирование метилфосфоната и разложение диметилсульфониопропионата при использовании растворенного органического вещества, синтезируемого в ходе процессов ПП, ТАУ и МО.

Ключевые слова: море Лаптевых, пелагиаль, метановый сип, “метановый парадокс”, аэробная продукция метана

DOI: 10.31857/S0026365621020129

Важной составляющей биогеохимического круговорота углерода в океане является цикл метана. В морские водоемы метан может поступать как из глубоководных гидротермальных источников, грязевых вулканов и холодных метановых сипов, так и синтезироваться *in situ* в осадках и водной толще.

Хорошо известны и детально исследованы метаногенные археи, которые считаются основными продуцентами метана на нашей планете. Они являются строгими анаэробами и образуют метан, используя в качестве субстрата в основном низкомолекулярные соединения: углекислоту, ацетат, метанол и метиламины. Недавно также была показана возможность образования метана из метокси-групп циклических органических соединений (см. обзор Kurth et al., 2020 и ссылки в нем). Развитие метаногенных архей в морях приурочено главным об-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621020129 для авторизованных пользователей.

разом к анаэробным осадкам, а в водной толще — к анаэробным микрониям, образующимся в крупных частицах органической взвеси, кишечном тракте и пеллетах зоопланктона (Bianchi et al., 1992; Ditchfield et al., 2012). Вместе с тем поверхностные кислородсодержащие воды различных регионов Мирового океана часто бывают пересыщены метаном по отношению к атмосфере — явление, которое принято называть “морским метановым парадоксом” (Karl et al., 2008; Bižić et al., 2020). Долгое время объяснение этого феномена сводилось к выявлению в водной толще анаэробных микроний с развитием метаногенных архей. Однако в настоящее время “метановый парадокс” объясняют метаболической активностью аэробных пелагических микроорганизмов, и чаще всего — разрушением метилфосфоната (MPn) гетеротрофными бактериями в условиях фосфатного голодания (Karl et al., 2008; Sosa et al., 2019), при котором параллельно с высвобождением фосфата происходит восстановление метильной группы до метана. Помимо этого, в последние годы накапливаются данные и о других механизмах аэробной продукции метана, специфика и распространение которых в водах Мирового океана остаются практически неизученными. Так, при доступности фосфора, но в условиях лимитирования по азоту выделение метана может быть связано с аэробным разложением диметилсульфониопропионата (ДМСП) до диметилсульфида (ДМС) или метилмеркаптана (метантиол, MeSH) (Damm et al., 2010) и последующим анаэробным разложением этих продуктов метилотрофными метаногенами (Kurth et al., 2020). Более того, согласно последним исследованиям продуцентами метана в аэробных условиях могут быть разнообразные представители фитопланктона: цианобактерии, кокколитофорида и другие гаптофиты, диатомовые водоросли (см. обзор Bižić et al., 2020 и ссылки в нем). Причем речь в данном случае идет не об изученных ранее метаболических путях (деметилирование MPn или выделение нитрогеназой и гидрогеназами водорода, который служит субстратом для гидрогенотрофного метаногенеза), но о каком-то неизвестном механизме конверсии углекислоты в метан, связанном с основным метаболизмом оксифототрофов.

Шельфовые моря восточной Арктики, в том числе море Лаптевых, известны как мощные источники эмиссии метана в атмосферу (Shakhova et al., 2010; Berchet et al., 2016). В акватории моря Лаптевых было выявлено более 700 районов разгрузки пузырькового метана, интенсивность которой изменяется на 5 порядков (до $176 \text{ г CH}_4/(\text{м}^2 \text{ сут})$) и определяется состоянием подводной мерзлоты и стабильностью гидратов (Shakhova et al., 2015). В придонных слоях воды в зонах разгрузки метановых сипов концентрации растворенного метана достигают 300–650 нМ, а в некоторых случаях 5000 нМ (Shakhova et al., 2010;

Savichev et al., 2018). Согласно данным многолетних исследований, транспорт метана из осадков в атмосферу происходит преимущественно посредством пузырькового переноса, в процессе которого происходит частичное растворение и насыщение метаном водной толщи (Shakhova et al., 2010, 2015). Поэтому повышенные концентрации метана в атмосфере и водной толще арктических морей, включая море Лаптевых, обычно связывают с активностью многочисленных метановых сипов. Вместе с тем, филогенетическое разнообразие и метаболический потенциал пелагических микробных сообществ шельфовой зоны моря Лаптевых остаются неизученными.

С целью выявления потенциальных агентов микробной продукции метана в аэробных условиях водной толщи моря Лаптевых в данной работе было проведено сравнительное изучение гидрохимических параметров, а также определение таксономического разнообразия и функциональной активности пелагических микробных сообществ на станциях, расположенных как в поле метановых сипов, так и на удалении от них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Место исследования и отбор проб воды. Пробы воды и донных осадков были отобраны в ходе 73 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” в октябре 2018 г. в море Лаптевых. Для исследования были выбраны две сходные по глубине станции: АМК73-6045 (76.7744 N, 125.7620 E), расположенная в зоне разгрузки метанового сипа, и АМК73-6053 (76.7387 N, 128.4512 E), удаленная от зоны пузырьковой разгрузки метана (рис. 1). Отбор проб воды на различных горизонтах осуществляли из 10 л батометров зондирующего комплекса Rosette непосредственно после подъема на палубу. Горизонты для отбора воды определяли на основании данных по температуре и солености. Основные параметры указанных станций приведены в табл. 1.

Определение гидрохимических параметров в воде. Пробы воды для определения гидрохимических параметров отбирали через силиконовые прозрачные шланги, позволявшие при необходимости контролировать отсутствие пузырька воздуха при заполнении склянок. Сразу после отбора проводили фиксацию проб на растворенный кислород и аммонийный азот. Пробы для определения фосфатов и нитратов отбирали в пластиковую посуду объемом 0.5 л без консервации и анализировали в судовой лаборатории.

Растворенный кислород определяли модифицированным методом Винклера с использованием 20–30 мл калиброванных склянок с диаметром пробки 10 мм и объемом промывки при заполнении склянки не менее 300% (Methods..., 1999).

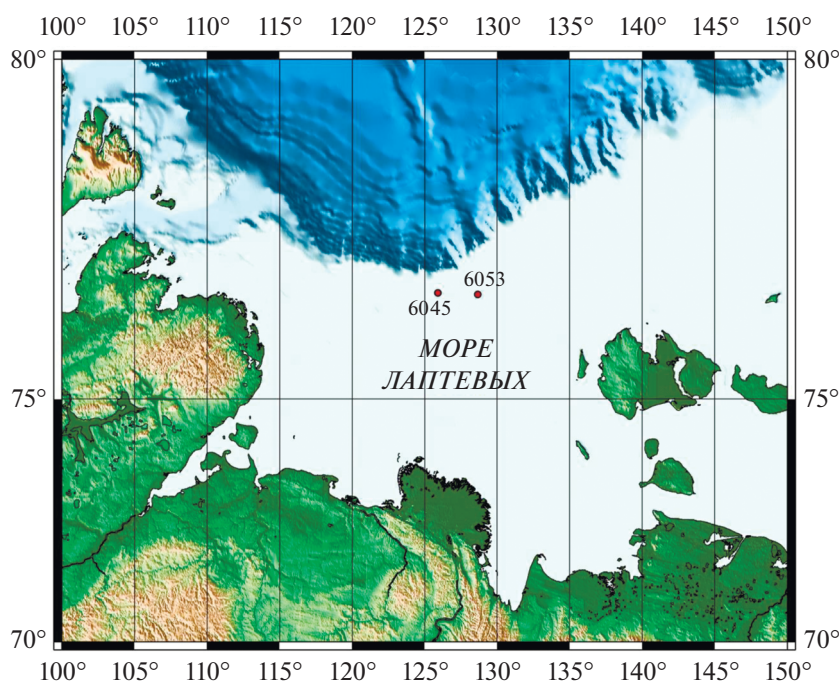


Рис. 1. Расположение станций АМК73-6045 (метановый сип) и АМК73-6053 (вне зоны активных газовыделений), исследованных в ходе 73 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” в октябре 2018 г. в море Лаптевых.

Фосфаты определяли по методу Морфи–Райли, нитриты — по методу с “единым” цветным реактивом, нитраты — согласно усовершенствованному методу Морриса и Райли, аммонийный азот — по методу Сэджи–Солорзано с образованием фенол-гипохлоритного комплекса (Methods..., 1999).

Квазиконсервативный индикатор N^* рассчитывали по формуле: $N^* = (N - 16P + 2.90 \text{ мкмоль/кг}) \times 0.87$ (Gruber, Sarmiento, 1997), где N — концентрация нитратов, P — концентрация фосфатов. N^* примерно равен нулю, если выдерживается пропорция Редфилда ($N : P = 16 : 1$), а положительные и отрицательные значения N^* отражают отклонения от нее.

Пробы на определение концентрации метана отбирали, без турбулентности, в стеклянные флаконы с фиксатором (КОН) и стандартной газовой фазой (“head-space”), герметично закрывали резиновой пробкой. Содержание метана в пробах определяли по методике фазово-равновесной дегазации на газовом хроматографе Kristall-2000-М (Хроматэк, Йошкар-Ола, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Ошибка метода составляет 6%.

Радиоизотопные эксперименты. Для измерения интенсивности процессов фотосинтеза, микробной ассимиляции углекислоты и автотрофного метаногенеза использовали радиоуглеродный ме-

тод с добавлением $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, а для микробного окисления метана — с $^{14}\text{CH}_4$.

Воду для измерения активности первичной продукции (ПП) и темновой ассимиляции углекислоты (ТАУ) наливали из батометров в склянки объемом 310 мл с помощью силиконовой трубки, без турбулентности, с двойной промывкой и с изливом половины объема склянки. Все склянки при отборе были затемнены. На каждом горизонте отбора для определения ПП использовали две прозрачные склянки, а для ТАУ две темные, покрытые алюминиевой фольгой. Темные склянки являлись контролем для светлых склянок. Для контроля ТАУ наполняли 1 темный флакон и добавляли в него 1 мл 0.05 н HCl. После отбора, в затемненном помещении во все склянки добавляли по 100 мкл стерильного раствора $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (специфическая активность $2.04 \text{ ГБк ммоль}^{-1}$, 5 мкКи/пробу). Затем снимали общие затемняющие чехлы и для каждой склянки использовали индивидуальный чехол, калиброванный по степени пропускания фотосинтетически активной радиации, соответствующей освещенности на горизонте отбора пробы. Склянки инкубировали в проточном аквариуме на палубе судна от 4 до 6 ч. По завершении экспозиции содержимое флаконов фиксировали 1 мл 0.05 н HCl. Дальнейшую обработку проб для измерения активности ПП и ТАУ проводили по методике, подробно описанной ранее (Savvichev et al., 2020).

Таблица 1. Характеристика станций отбора образцов АМК73-6045 и АМК73-6053, исследованных в ходе 73 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” в октябре 2018 г.

Глубина, м	Горизонт, м	$T, ^\circ\text{C}$	$S, \text{‰}$	O_2 , мкМ	CH_4 , нМ	PO_4 , мкМ	NO_3 , мкМ	NO_2 , мкМ	NH_4 , мкМ	N^* , мкМ
АМК73-6045 (над метановым сипом)										
72.7	0	0.70	30.64	359.11	29.0	0.30	1.13	0.00	0.61	−0.67
	4	—	—	—	31.7	—	—	—	—	—
	10	0.71	30.61	349.81	33.0	0.69	0.47	0.04	0.31	−6.67
	16	—	—	—	47.3	—	—	—	—	—
	25	0.66	30.65	349.26	61.6	0.41	2.18	0.09	0.32	−1.29
	32	−1.43	34.03	348.67	40.6	0.52	2.74	0.00	0.31	−2.33
	48	−1.47	34.03	346.62	40.2	0.46	0.31	0.00	0.29	−3.61
	65	−1.48	34.03	317.81	867.9	0.74	7.70	0.04	0.27	−1.08
	70	−1.48	34.03	328.32	841.1	0.48	8.69	0.00	0.30	3.40
АМК73-6053 (вне зоны активных газовойделений)										
67.1	0	0.42	30.05	354.00	29.9	0.33	2.03	0.04	0.06	−0.30
	8	0.69	30.40	352.01	32.1	0.33	2.70	0.09	0.09	0.28
	15	—	—	—	50.4	—	—	—	—	—
	20	0.25	32.46	344.95	44.6	0.41	4.16	0.09	0.04	0.44
	25	−1.13	33.92	344.24	116.5	0.43	4.99	0.04	0.05	0.88
	45	−1.60	34.20	308.88	25.9	0.58	8.83	0.04	0.12	2.13
	65	−1.60	34.20	323.33	25.9	0.59	7.14	0.09	0.07	0.52

Примечание. N^* — квазиконсервативный индикатор, отражающий изменения в пропорции Редфилда (Gruber, Sarmiento, 1997).

Интенсивность гидрогенотрофного метаногенеза измеряли в склянках, отобранных и зафиксированных КОН, аналогично определению скорости ТАУ. После завершения инкубации с меченым бикарбонатом пробы обрабатывали по методике, подробно описанной ранее (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006).

Для определения интенсивности микробного окисления метана (МО) радиоуглеродным методом ($^{14}\text{CH}_4$) воду из батометра наливали с помощью силиконового шланга в 30 мл пенициллиновые флаконы с промывкой и изливом и закрывали резиновой пробкой, контролируя отсутствие пузырька воздуха. После введения $^{14}\text{CH}_4$ (1 мкКи на образец, специфическая активность $1.16 \text{ ГБк ммоль}^{-1}$), растворенного в дегазированной дистиллированной воде, пробы инкубировали 2 сут в холодильнике, в условиях, близких к *in situ*. Для каждой пробы использовали 2 повторности и контроль (пробу, предварительно фиксированную 1 н КОН). После инкубации пробы фиксировали и транспортировали в лабораторию для дальнейшего определения продуктов микробного окисления: углекислоты (CO_2), включения в биомассу микроорганизмов (БМ) и в растворенный органический углерод (РОУ).

Обработку проб и расчеты интенсивности метаноокисления проводили по ранее описанной методике (Русанов и соавт., 1998).

Определение состава микробного сообщества методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. Для определения филогенетического состава микробных сообществ биомассу из образцов воды объемом 1 л концентрировали на фильтрах Microsart CN-Filter (“Sartorius Stedim Biotech”, Германия) с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтры с биомассой хранили в замороженном виде до выделения ДНК в лаборатории.

ДНК выделяли из биомассы с мембранных фильтров с использованием коммерческого набора PowerSoil DNA Isolation Kit (“Qiagen”, Нидерланды). Библиотеки 16S рРНК получали с помощью двух последовательных ПЦР. Обе реакции были проведены с помощью готовой смеси qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) на амплификаторе StepOnePlus Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США). В ходе первой реакции амплифицировали V4 участок 16S рРНК с использованием праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCG-CGGTAA-3') (Huggerth et al., 2014) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3') (Меркель и соавт., 2019) с конечной концентрацией 0.25 мкМ.

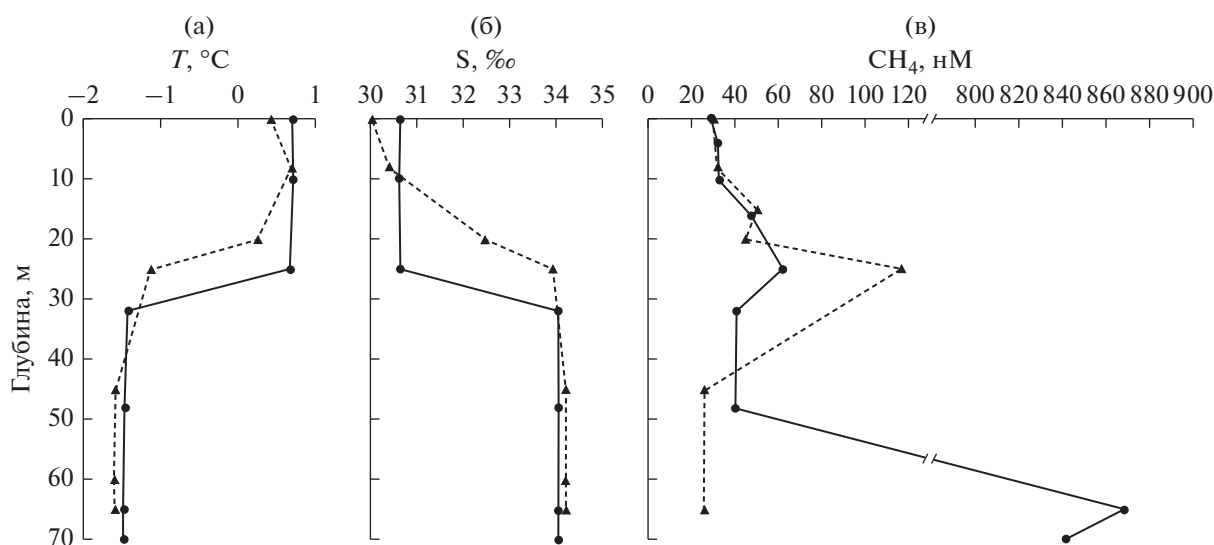


Рис. 2. Распределение температуры (а), солёности (б) и метана (в) на станциях АМК73-6045 (сплошная линия) и АМК73-6053 (пунктирная линия).

Программа первой реакции была следующей: предварительная денатурация при 95°C 3 мин; 32 цикла (денатурация — 95°C 25 с, отжиг праймеров — 56°C 20 с, элонгация — 72°C 30 с); финальная элонгация — 72°C 20 мин. Полученные ампликоны были использованы в качестве матрицы для второй реакции с уникальными индексными праймерами Illumina (TruSeq). Конечная концентрация индексных праймеров составляла 0.5 мкМ. Программа второй ПЦР была следующей: предварительная денатурация при 95°C 3 мин; 14 циклов (денатурация — 95°C 20 с, отжиг праймеров — 59°C 20 с, элонгация — 72°C 30 с); финальная элонгация — 72°C 20 мин. Полученные библиотеки очищали при помощи набора Cleanup Standard (“Евроген”, Россия), смешивали эквимолярно, загружали на 2%-ный агарозный гель и вырезали необходимый продукт на трансиллюминаторе The Safe Imager Blue-Light (“Invitrogen”, Израиль) с длиной волны 470 нм. ДНК из геля очищали при помощи набора Cleanup Standard (“Евроген”, Россия). Конечную концентрацию пула библиотек измеряли на флуориметре Qubit 2.0 с использованием высокочувствительных реактивов HS Assay Kit (“Life Technologies”, США). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 циклов) согласно инструкции производителя. Первичную обработку данных и удаление химерных последовательностей производили, как было описано ранее (Fadrosh et al., 2014). Формирование ОТЕ таблицы и анализ альфа разнообразия проводили по методике, описанной ранее (Пименов и соавт., 2018). Массивы последовательностей были депонированы в архив GenBank под номером биопроекта PRJNA684336.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химическая характеристика станций.

Распределение гидрофизических и некоторых гидрохимических параметров в водной толще на станции АМК73-6045, расположенной над метановым сипом, и на удаленной от сипа станции АМК73-6053 показано на рис. 2 и в табл. 1. Пикноклин на станции над метановым сипом (АМК73-6045) располагался на глубине 23–32 м, на удаленной станции (АМК73-6053) зона пикноклина располагалась несколько выше — на глубине 20–25 м. Слои выше и ниже пикноклина были хорошо аэрированы на обеих станциях, содержание кислорода было 340–360 мкМ над пикноклином и 320–340 мкМ под пикноклином (табл. 1). Содержание биогенных элементов (Р, N) изменялось по вертикали незначительно. Однако расчет квазиконсервативного индикатора N*, отражающего изменения в пропорции Редфилда, выявил лимитирование по азоту практически по всей глубине водной толщи над метановым сипом (АМК73-6045), в то время как на удаленной станции (АМК73-6053) этот индикатор был больше нуля на всех горизонтах, за исключением верхнего (табл. 1).

Содержание метана на различных горизонтах обеих станций, как правило, находилось в пределах 25.9–50.4 нМ. Однако на глубине 25 м, которая соответствует пикноклину, были зафиксированы локальные максимумы: 61.6 и 116.5 нМ на станциях АМК73-6045 (сип) и АМК73-6053 (удаленная станция) соответственно. Содержание метана в придонных горизонтах станции АМК73-6045 (сип) достигало 867.9 нМ, в то время как на удаленной станции не превышало средних значений до самого дна (рис. 2).

Таблица 2. Интегральные величины процессов первичной продукции (ПП), темновой ассимиляции углекислоты (ТАУ) и окисления метана (МО) пелагическими микробными сообществами, измеренные на станциях АМК73-6045 (над метановым сипом) и АМК73-6053 (вне зоны активных газовойделений) в ходе 73 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” в октябре 2018 г.

Процессы		АМК73-6045		АМК73-6053
ПП, мг С/(м ² день)	Суммарная ПП	228.6		237.3
	Включение С-НСО ₃ в БМ	64.5 (28.2%)		135.9 (57.3%)
	Включение С-НСО ₃ в РОУ	164.1 (71.8%)		101.4 (42.7%)
ТАУ, мг С/(м ² сут)	Суммарная ТАУ	230.4		208.5
	Включение С-НСО ₃ в БМ	67.9 (29.5%)		64.3 (30.8%)
	Включение С-НСО ₃ в РОУ	162.5 (70.5%)		144.2 (69.2%)
МО, мкг С-СН ₄ /(м ² сут)	Суммарное МО	0–32 м* 771.9	0–70 м** 4271.7	693.4
	Включение С-СН ₄ в СО ₂	164.8 (21%)	252.3 (5.9%)	293.0 (42.2%)
	Включение С-СН ₄ в БМ	29.9 (4%)	945.2 (22.1%)	54.7 (7.9%)
	Включение С-СН ₄ в РОУ	577.2 (75%)	3074.2 (72.0%)	345.8 (49.9%)

Примечание. Значения в скобках обозначают долю (в %) от суммарной интенсивности процесса. * 0–32 м — интегральная величина МО при расчете от поверхности до нижней части пикноклина. ** 0–70 м — интегральная величина МО при расчете от поверхности до дна.

Первичная продукция (ПП) фитопланктона. Интенсивности ПП, выявленные на исследованных станциях, были низкими (рис. 3а, 3б). На станции АМК73-6045 (сип) суммарные значения ПП изменялись от 2.2 до 18.2 мкг С/(л день), на удаленной станции АМК73-6053 диапазон значений был ниже — от 5.2 до 9.9 мкг С/(л день). При этом интегральные величины ПП на обеих станциях были практически идентичны (табл. 2). На разных горизонтах станции АМК73-6045 (сип) доля включения углерода бикарбоната (С-НСО₃) в БМ варьировала от 11 до 76%, а доля С-НСО₃, перешедшего в РОУ, — от 24 до 89% от суммарных величин ПП (рис. 3а). На удаленной станции АМК73-6053 наблюдалось более высокое включение углерода в БМ — от 40 до 75% и несколько меньшее включение в РОУ — от 25 до 60% (рис. 3б). В среднем доля включения углерода бикарбоната в РОУ в процессе ПП составила 71.8% на станции АМК73-6045 и 42.7% на станции АМК73-6053 (табл. 2).

Темновая ассимиляция углекислоты (ТАУ). Измеренные величины ТАУ на обеих станциях оказались достаточно высокими для Арктических морей в позднеосенний период. На станции АМК73-6045 (сип) суммарная интенсивность ТАУ по горизонтам изменялась от 2.5 до 4.9 мкг С/(л сут), при среднем значении 3.4 мкг С/(л сут). Величины большие, чем средние, детектированы на поверхности, в верхней части пикноклина (25 м) и в двух придонных (65 и 70 м) горизонтах (рис. 3в). Доля включения углерода бикарбоната в БМ микроорганиз-

мов на разных горизонтах изменялась от 21 до 43%, а большая часть С-НСО₃ переходила в РОУ (57–79% от суммарной величины ТАУ).

На удаленной станции АМК73-6053 профиль распределения интенсивности ТАУ по горизонтам существенно отличался от такового над сипом (рис. 3г): на горизонтах от поверхности до верхней части пикноклина интенсивность ТАУ была выше средней величины, а от нижней части пикноклина до дна детектированы низкие значения. Однако диапазон величин ТАУ (от 2 до 5.4 мкг С/(л сут) и среднее значение ТАУ (3.8 мкг С/(л сут) на удаленной станции АМК73-6053 были сходны с таковыми на станции АМК73-6045 над метановым сипом. Доля включения углерода бикарбоната в БМ на различных горизонтах составила от 17 до 55%, в РОУ — от 45 до 83%.

В среднем доли включения углерода бикарбоната в БМ и РОУ в процессе ТАУ были сходны на обеих станциях и составили около 30% в БМ и 70% в РОУ (табл. 2).

Метаногенез и окисление метана в водной толще. Интенсивность гидрогенотрофного метаногенеза (МГ), измеренная радиоизотопным методом с использованием $\text{NaN}^{14}\text{CO}_3$, в исследованных образцах была крайне низкой и составила, по расчетам, менее 3 нл СН₄/(л сут), что ниже границы чувствительности метода, которая при концентрациях метана до 2 мкл/л позволяет достоверно измерять скорости МГ более 5 нл СН₄/(л сут). Полученные данные указывают на отсутствие или незначительность вклада гидрогенотрофного МГ

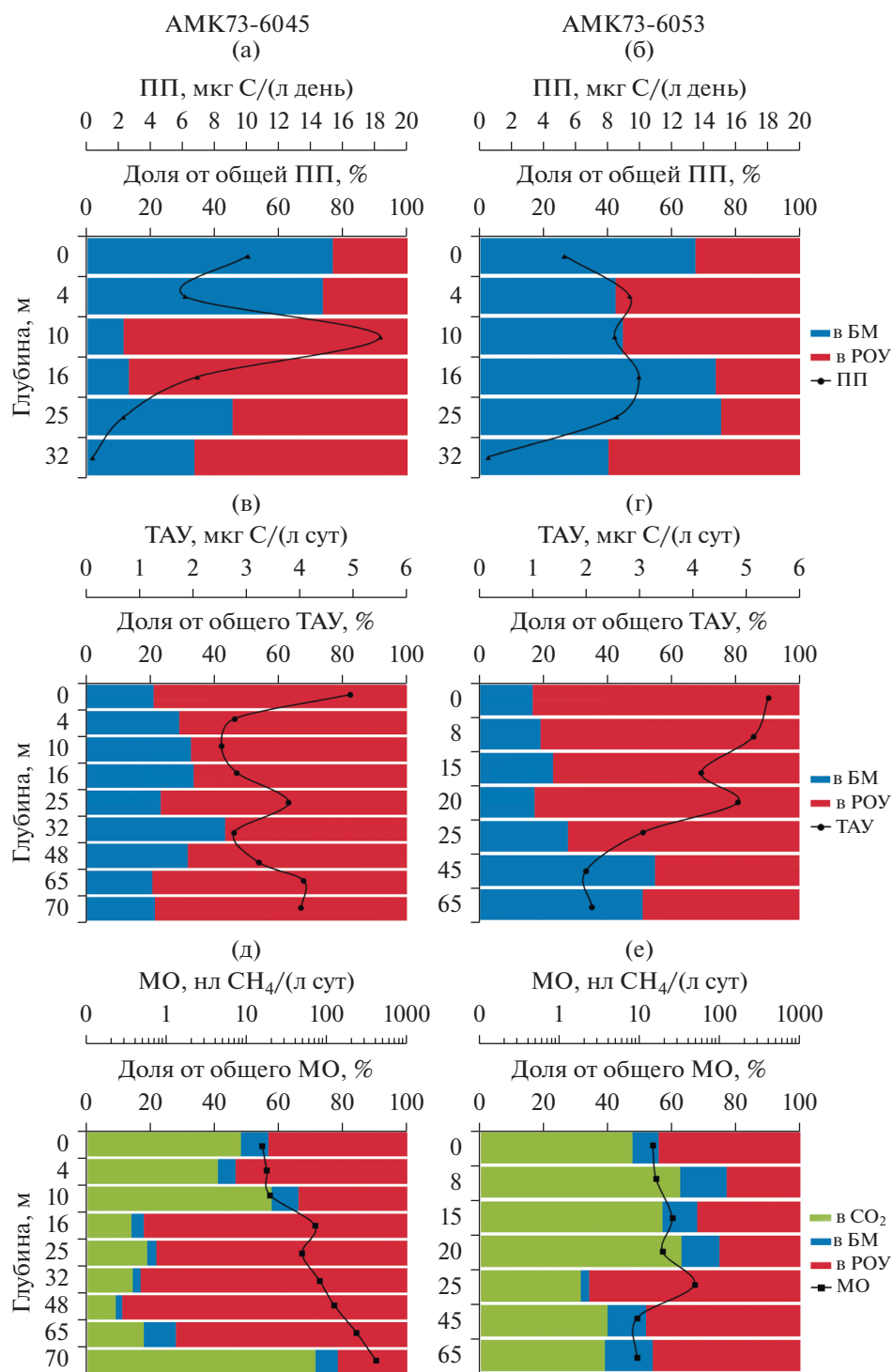


Рис. 3. Микробные процессы, измеренные на станциях АМК73-6045 (метановый сип) и АМК73-6053 (вне зоны активных газовыделений) в 73 рейсе НИС “Академик Мстислав Келдыш”: (а, б) первичная продукция (ПП), (в, г) темновая ассимиляция углекислоты (ТАУ), (д, е) окисление метана (МО). Цветные столбцы отражают долевое соотношение продуктов ПП, ТАУ и МО при микробной трансформации углерода бикарбоната (а–г) или углерода метана (д, е): *синие* – включение в биомассу (БМ), *красные* – продукция растворенного органического углерода (РОУ), *зеленые* – продукция CO₂. Графики отражают распределение по горизонтам дискретных величин процессов: (▲) ПП – суммарная (БМ + РОУ) интенсивность первичной продукции; (●) ТАУ – суммарная (БМ + РОУ) интенсивность темновой ассимиляции углекислоты; (■) МО – суммарная (CO₂ + БМ + РОУ) интенсивность окисления метана.

Таблица 3. Результаты секвенирования тотальной ДНК и оценка покрытия разнообразия филоотипов пелагических микробных сообществ с горизонта пикноклина (25 м) и горизонта выше пикноклина (16 м) на станциях АМК73-6045 (над метановым сипом) и АМК73-6053 (вне зоны активных газовойделений)

Образец (станция_глубина)	Число прочтений	Число ОТЕ	Археи, %	Chao1	Насыщение, %
АМК73-6045_16	640	163	0.9	194.4	83.8
АМК73-6045_25	780	159	1.9	191.3	83.1
АМК73-6053_25	833	175	1.8	211.4	82.8

в повышение подповерхностных концентраций метана в исследованных образцах водной толщи.

Процесс микробного окисления метана (МО) протекал по всей глубине водной толщи на обеих станциях, а углерод метана трансформировался в CO_2 , БМ и РОУ (рис. 3д, 3е). Интенсивность МО на обеих станциях была невысокой (за исключением придонных горизонтов на станции над сипом), что характерно для водной толщи открытой части Арктических морей (Rogener et al., 2020). На удаленной станции (АМК73-6053) диапазон суммарных величин окисления метана изменялся от 9 до 47 нл CH_4 /(л сут), со средним значением 20 нл CH_4 /(л сут) (рис. 3е). Значения выше средних выявлены над (15 м) и под (25 м) пикноклином. Минимальные скорости МО выявлены в придонных (45 и 65 м) горизонтах. Оба максимума и минимумы, промежуточный и придонный, полностью соответствовали профилю распределения метана (рис. 2). Доли включения углерода метана в CO_2 , БМ и РОУ в процессе МО на удаленной станции составили 42.2, 7.9 и 49.9% соответственно (табл. 2).

Иная картина выявлена на станции АМК73-6045 над метановым сипом (рис. 3д). По концентрации растворенного метана всю водную толщу над этой станцией можно условно разделить на две зоны: от поверхности до нижней части пикноклина (0–32 м) и от нижней части пикноклина до дна (рис. 2). Концентрации метана от поверхности до нижней части пикноклина имели даже несколько меньшие величины, чем на удаленной станции. А диапазон общей интенсивности МО изменялся более существенно и равномерно: от 16 на поверхности до 81 нл CH_4 /(л сут) под пикноклином со средним значением 42 нл CH_4 /(л сут) (рис. 3д). Также как и на удаленной станции, в пикноклине обнаружено небольшое уменьшение интенсивности МО, а непосредственно над зоной пикноклина — промежуточный максимум. Интегральная величина МО, рассчитанная для этой зоны, была сопоставима с интегральной величиной МО на фоновой станции (табл. 2). Однако ниже пикноклина и до дна на станции над сипом выявлено ожидаемое резкое увеличение концентрации метана (рис. 2) и значительное (в разы) усиление активности микробного МО. Диапазон величин окисления метана увеличился от 81 (на 32 м) до

120 (на 48 м) и почти до 370 нл CH_4 /(л сут) в придонном горизонте (рис. 3д), а интегральная величина МО в итоге многократно превысила такую для удаленной станции (табл. 2).

Распределение углерода метана, включенного в CO_2 , БМ и РОУ в процессе МО также было различным при расчете от поверхности до нижней части пикноклина или при расчете на всю глубину от поверхности до дна (табл. 2), что свидетельствует о различном функционировании метано-кисляющих микробных сообществ в придонных и приповерхностных горизонтах станции, расположенной над метановым сипом (АМК73-6045).

Молекулярный анализ состава микробных сообществ. Поскольку на глубине расположения пикноклина на изученных станциях был выявлен пик концентрации метана, то для анализа филогенетического разнообразия микроорганизмов были выбраны три образца, два из которых отобраны с горизонта пикноклина обеих станций (АМК73-6045_25 и АМК73-6053_25), а третий — с горизонта выше пикноклина на станции над сипом (АМК73-6045_16). В результате секвенирования после первичной обработки данных получено от 640 до 833 последовательностей 16S рРНК со средней длиной 254 п.н. Полученные прочтения объединены в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне сходства 97%. Покрытие разнообразия филоотипов, рассчитанное с помощью метода Chao1, варьирует от 82.8 до 83.8% (табл. 3), кривые насыщения не выходят на плато, но близки к этому состоянию (доп. материалы, рис. S1). Такое покрытие не позволяет делать выводы о количественной представленности микробных групп прокариот, однако его достаточно для описания доминирующих таксонов.

Состав трех сообществ на уровне крупных таксонов оказался сходным. Отмечено преобладание последовательностей представителей домена *Bacteria* (более 97% от общего числа прочтений) над доменом *Archaea* (рис. 3, табл. S1). Последовательности архей принадлежали представителям двух филумов: *Thaumarchaeota* (“*Candidatus Nitrosopumilus*”; 0.3–1.3%) и *Euryarchaeota* (Marine Group II; 0.3–0.6%). Преобладающая часть последовательностей представителей домена *Bacteria* принадлежала филуму *Proteobacteria* (75.6–81.5%),

который включал классы *Alphaproteobacteria* (16.5–33.5%), *Gammaproteobacteria* (42.0–59.3%) и *Deltaproteobacteria* (0–2.8%). Помимо протеобактерий выявлены представители филумов *Bacteroidetes* (9.9–11.5%), *Actinobacteria* (0.5–1.8%) и *Verrucomicrobia* (0.6–2.2%). Другие филумы домена *Bacteria* суммарно составляли не более 0.9% от общего числа прочтений. Наиболее многочисленными (более 10% от общего числа прочтений) в исследованных образцах были представители следующих филогенетических групп: клада SAR11 (класс *Alphaproteobacteria*; 7.2–15.2%), кластеры SUP05 (семейство *Thioglobaceae*; 7.5–17.4%) и OM60(NOR5) (9.6–10.5%), род *Methyloprofundus* (0.1–11.6%) и неидентифицированные представители семейства *Nitrincolaceae* (8.9–13.2%). Значимыми компонентами сообществ были также представители рода *Planktomarina* (2.7–6.4%) и клад SAR92 (4.5–6.6%), NS5 (2.1–4.3%). Цианобактерии в образцах не выявлены, но обнаружены последовательности хлоропластов (1.3–4.2%).

Среди представителей клады SAR11 преобладали последовательности подклады Ia (6.1–13.4% от общего числа прочтений), типичные для высокоширотных областей (Brown et al., 2012). Последовательности гаммапротеобактерий, отнесенные к кластеру SUP05, оказались близки к подкластеру Arctic96BD-19, включающему аэробных сероокисляющих литогетеротрофных представителей “*Ca. Thioglobus*” sp. NP1 и “*Ca. Thioglobus singularis*” PS1. Последовательности OTE из наших образцов, отнесенные к кластеру OM60(NOR5), оказались близки к гетеротрофному виду *Marimicrobium arenosum* CAU 1038. Последовательности неидентифицированных представителей семейства *Nitrincolaceae* оказались близки к клонам некультивируемых морских гаммапротеобактерий Arctic96B-16 и Ant4D3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее для центральной части Северного Ледовитого океана было установлено, что в зоне влияния атлантических вод подповерхностная концентрация метана близка к значениям, равновесным с атмосферой (3.5–4 нМ), в то время как в зоне влияния тихоокеанских вод она достигала 5–7 нМ, что во втором случае связывалось с аэробной биологической продукцией метана пелагическими сообществами (Damm et al., 2010). Содержание метана в верхних горизонтах водной толщи на исследованных нами станциях над метановым сипом (АМК73-6045) и на удалении от него (АМК73-6053) имело сопоставимые значения и находилось в пределах 25.9–50.4 нМ (табл. 1), что говорит о значительном пересыщении поверхностных вод исследуемого региона метаном. Принимая значения, измеренные Damm et al. (2010) в качестве фоновых (то есть однозначно не обусловленных де-

ятельностью метановых сипов), можно заключить, что обе исследованные нами станции были подвержены влиянию метановых сипов. Так, повышенная концентрация метана во всей водной толще на станции АМК73-6045 напрямую обусловлена разгрузкой пузырьков метана из донных отложений, а на станции АМК73-6053, удаленной от сипа, — адвективным переносом вод, обогащенных метаном. Такой перенос от мощного источника пузырькового метана может проследиваться в слое, ассоциированном с пикноклином, на расстояния в сотни километров (Shakhova et al., 2015). На исследованных станциях на глубине расположения пикноклина были, действительно, зафиксированы локальные максимумы содержания метана с наибольшим значением 116 нМ на станции АМК73-6053 (рис. 2). И именно здесь (образец АМК73-6053_25) было выявлено максимальное число последовательностей гена *16S rRNA*, относящихся к роду метанотрофных бактерий *Methyloprofundus* (11.6%). В двух образцах со станции над сипом (АМК73-6045_16 и АМК73-6045_25) их относительное обилие составило менее 1%, что коррелирует с более низкими концентрациями растворенного метана (47.3 и 61.6 нМ соответственно). Интенсивность МО на обеих станциях была также невысокой, то есть вклад метанотрофных бактерий в трофическую сеть в пелагиали существенно ниже, чем в сообществах донных осадков (Пименов и соавт., 2000; Savvichev et al., 2018).

Несмотря на явное влияние мощных метановых сипов на концентрацию растворенного метана в водной толще исследуемого региона, вопрос о возможности и интенсивности биологической продукции метана *in situ* остается открытым. Во всех исследованных горизонтах водной толщи радиоуглеродным методом нам не удалось достоверно измерить интенсивность процесса гидрогенотрофного МГ. В нашем исследовании не был учтен метилотрофный путь МГ, который по некоторым данным может быть значимым источником метана в аэробной водной толще Северного Ледовитого океана (Damm et al., 2010). Однако тот факт, что в составе микробных сообществ трех изученных нами образцов (АМК73-6045_16, АМК73-6045_25 и АМК73-6053_25) не были обнаружены последовательности гена *16S rRNA*, относящиеся к метаногенным археям, свидетельствует в пользу иного механизма потенциальной продукции метана.

В олиготрофных условиях арктических морей структуру и функционирование микробных сообществ пелагиали определяют такие физико-химические факторы, как свет, доступность биогенов и органического вещества. Согласно нашим данным, в среднем от 43 до 75% (а на некоторых горизонтах исследованных станций до 90%) углерода углекислоты и углерода метана трансформи-

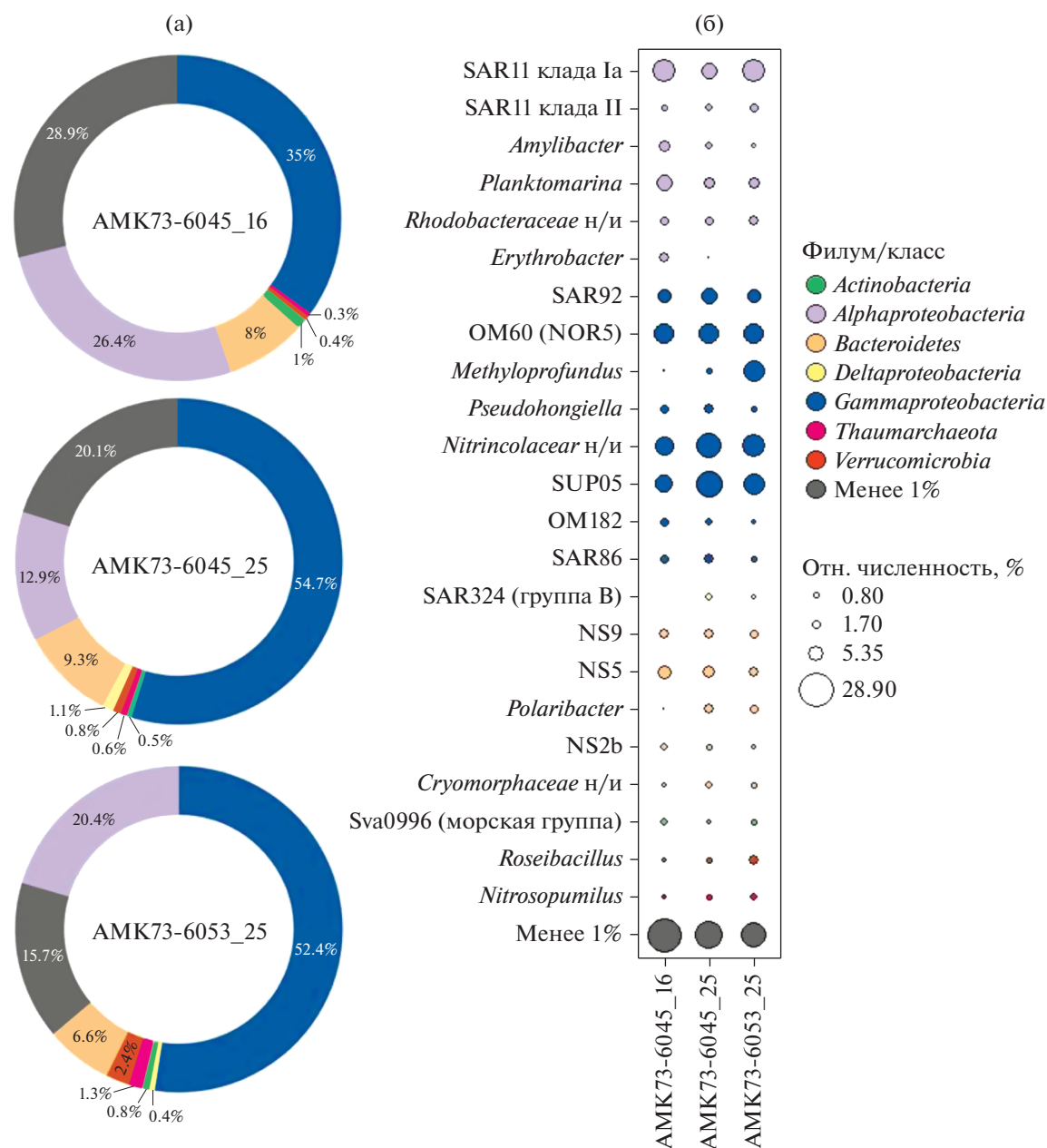


Рис. 4. Разнообразие и относительное обилие филумов (а) и филогенетических групп родового уровня (б) прокариот в образцах воды на станциях АМК73-6045 (метановый сип) и АМК73-6053 (вне зоны активных газовыделений). Приведены только те филогенетические группы, относительное обилие которых составило более 1% от общего количества прочтений хотя бы в одном из образцов. Суммарное обилие филогенетических групп, каждая из которых составила менее 1% изображено серым цветом. Образцы АМК73-6045_25 и АМК73-6053_25 были отобраны с горизонта пикноклина, образец АМК73-6045_16 — с горизонта выше пикноклина. н/и - не идентифицированные представители группы.

руется в РОУ в ходе ПП, ТАУ и МО (табл. 2, рис. 3), что создает основу для метаболической активности разнообразных групп пелагических гетеротрофных микроорганизмов. Возможность использовать энергию солнечного света наряду с энергией, получаемой при разложении РОВ, дает физиологические преимущества фотогетеротрофным и протеородо-син-содержащим хемогетеротрофным бакте-

риям (Boeuf et al., 2014). К таким организмам относятся представители аэробных анаэробных бактерий пор. *Rhodobacterales* (*Amylibacter*, *Planktomarina*, другие *Rhodobacteraceae*) и протеородо-син-содержащие представители клад SAR11 (*Pelagibacterales*), SAR86, SAR92, в значительном количестве выявленные в исследованных образцах (рис. 4, табл. S1).

Способность аэробного сообщества пелагиали продуцировать метан определяется составом РОВ и доступностью биогенов. В качестве предшественников метана в аэробной морской воде в настоящее время рассматривают метилфосфоновую кислоту (метилфосфонат, MPn) и диметилсульфониопропионат (ДМСП) (Karl et al., 2008; Damm et al., 2010). Наличие этих веществ в наших образцах не было напрямую показано, однако выявлены микроорганизмы, для которых известна способность к синтезу и разложению этих веществ, а также установлены гидрохимические предпосылки для обоих путей продукции метана.

Гены синтеза метилфосфоната известны у широко распространенных морских аммоний-окисляющий архей *Nitrosopumilus maritimus* (*Thaumarchaeota*), а также у представителей клады SAR11 (*Pelagibacteriales*) (Metcalf et al., 2011; Born et al., 2017). В трех исследованных нами образцах выявлены последовательности, близкие к *Nitrosopumilus* с небольшим относительным обилием (0.3–1.3% от общего числа прочтений). Последовательности, относящиеся к представителям клады SAR11, были, напротив, многочисленны (7.2–15.2%). Последние способны не только синтезировать метилфосфонат, но и в условиях фосфатного голодания использовать его в качестве источника фосфора с побочным выделением метана в эквимольных количествах (Carini et al., 2014).

Деметилирование метилфосфоната осуществляется посредством фермента СР-лиазы. Гены, кодирующие этот фермент, найдены не только у представителей SAR11, но и у разнообразных других бактерий и широко распространены в тех областях Мирового океана, для которых характерно лимитирование по фосфору (Karl et al., 2008; Sosa et al., 2019). Содержание фосфатов на обеих исследованных станциях не было низким по абсолютным концентрациям, однако положительные значения N^* на удаленной от сипа станции АМК73-6053 свидетельствуют о дисбалансе в соотношении Редфилда в сторону переизбытка азота относительно фосфора, и можно предположить условия фосфатного голодания на этой станции (табл. 1). В море Лаптевых такое нарушение баланса биогенных элементов может быть связано с характерными особенностями деградации эрозийного органического вещества, поступающего с речным стоком (Semiletov et al., 2011). Таким образом, совместная метаболическая активность *Nitrosopumilus* и SAR11 по синтезу и деметилированию метилфосфоната может теоретически привести к процессу аэробной продукции метана в исследуемом регионе.

Данное предположение, безусловно, необходимо проверять экспериментально, поскольку работы, в которых было описано выделение метана из метилфосфоната через СР-лиазный путь, были

сделаны в основном в низкоширотных областях Мирового океана (Karl et al., 2008; Sosa et al., 2019), в то время как в центральной части Северного Ледовитого океана была выявлена обратная картина: образование метана происходило в зоне влияния тихоокеанских вод, богатых фосфатами, но не в зоне влияния обедненных фосфатами атлантических вод. То есть выделение метана происходило в условиях доступности фосфатов и лимитирования по азоту. Предшественником метана в этом случае служил ДМСП (Damm et al., 2010). В исследованных нами образцах лимитирование по азоту ($N^* \ll 0$) зафиксировано на станции АМК73-6045 над метановым сипом (табл. 1), и здесь можно предположить путь аэробной продукции метана из ДМСП.

Известно, что моря полярных и субполярных широт характеризуются повышенным содержанием ДМСП, как растворенного, так и в составе биомассы микроорганизмов. ДМСП синтезируется разнообразным морским фито- и бактериопланктоном и выполняет ряд функций, включая осмо- и криопротекторную, антиоксидантную, сигнальную, регуляторную, а также функцию запасаения углерода, серы и/или энергии (см. обзор Zhang et al., 2019 и ссылки в нем). В исследованных нами образцах способностью утилизировать ДМСП обладают представители клад SAR11, SAR86 и рода *Planktomarina* (Sun et al., 2016; Voget et al., 2015). Клетки SAR11 не способны к ассимиляции сульфатов и поэтому облигатно нуждаются в органических соединениях серы, таких как ДМСП, метионин и цистеин (Tripp et al., 2008). Для северной Атлантики показано, что на клетки SAR11 в поверхностных водах приходится 50% активности по ассимиляции аминокислот и 30% активности по ассимиляции ДМСП (Malmstrom et al., 2004). Таким образом, клада SAR11 может являться функционально наиболее значимой в силу массовой представленности в сообществе (7.2–15.2% от общего числа прочтений) и предполагаемой высокой активности.

ДМСП катаболизируется двумя конкурирующими путями: деметилированием с образованием метилмеркаптана (метантиола, MeSH) и расщеплением с образованием диметилсульфида (ДМС) (Zhang et al., 2019). Основываясь на данных о том, что в анаэробных условиях метилмеркаптан и ДМС могут служить субстратами для метилотрофного метаногенеза (Tallant, Krycki, 1997), Damm et al. (2015) выдвинули гипотезу о принципиальной возможности морских микроорганизмов продуцировать метан в аэробной окружающей среде. Согласно их модели, рассчитанной для условной клетки *Roseobacter*, высокая дыхательная активность и низкая проницаемость клеточных мембран может способствовать поддержанию анаэробных внутриклеточных условий, благоприятных для образования метана даже в

насыщенных кислородом водах. Подобный механизм, направленный на защиту нитрогеназы от ингибирования кислородом, известен для азотфиксирующих микроорганизмов, в частности, цианобактерий (Peschek et al., 1991). Однако выделение метана по пути метилотрофного метаногенеза требует наличия специфических ферментных систем (Kurth et al., 2020), которые неизвестны у неметаногенных прокариот. Но интересным является факт, выявленный в модельных экспериментах Damm et al. (2010): в тех образцах природной арктической воды, к которым добавляли ДМСП, и где происходило выделение метана, было выявлено увеличение количества копий *nifH*-генов. Можно предположить, что выделение метана при разложении ДМСП в условиях азотного голодания и азотфиксация являются процессами, связанными друг с другом.

Таким образом, в результате нашего исследования выявлены гидрохимические предпосылки и возможные микробные агенты для аэробной продукции метана через деметилирование метилфосфоната и при разложении ДМСП. То есть метан предположительно может продуцироваться *in situ* в аэробных условиях водной толщи моря Лаптевых за счет РОВ, которое, согласно нашим данным, синтезируется в значительном количестве в ходе процессов ПП, ТАУ и МО. Однако на основании полученных результатов мы не можем оценить вклад процесса аэробного образования метана в формирование общего пула метана в водной толще изученного района моря Лаптевых.

Оценка метан-продуцирующей активности аэробных пелагических микробных сообществ не может быть осуществлена радиоуглеродным методом, традиционно используемым для определения интенсивности архейного метаногенеза, поскольку пути продукции метана пелагическими микроорганизмами разнообразны и часто не связаны с потреблением таких “классических” субстратов, как углекислота, ацетат, метанол и метиламины. Таким образом, требуются дальнейшие исследования и экспериментальное подтверждение различных механизмов аэробного образования метана широким спектром гетеротрофных микроорганизмов, образующих устойчивые сообщества в водной толще морских водоемов разных климатических зон. Моря Восточной Арктики крайне привлекательны для развития этого направления исследований, поскольку разделены на две биогеохимические провинции: западную “гетеротрофную” и восточную “автотрофную” (Semiletov et al., 2005, 2016), что позволяет в рамках одной экспедиции проводить исследования в районах, которые характеризуются дефицитом азота и/или фосфора.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность всему научному коллективу 73 рейса и команде НИС “Академик Мстислав Келдыш” за предоставленные возможности и всестороннюю помощь при сборе образцов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-14-10201 и Министерства науки и высшего образования РФ, госзадание ФИЦ Биотехнологии РАН. Экспедиция на НИС “Академик Мстислав Келдыш” была организована в рамках гранта Правительства Российской Федерации (№ 14.Z50.31.0012/03/19.2014). Определение содержания азотных соединений выполнено А.А. Гринько из средств гранта Президента РФ для молодых ученых-кандидатов наук МК-535.2020.5. Определение других гидрохимических параметров проводилось Е.В. Якушевым при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (тема 0149-2019-0003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тошчаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655–654.
- 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.
- Пименов Н.В., Саввичев А.С., Русанов И.И., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробиологические процессы цикла углерода и серы на холодных метановых сипах северной Атлантики // Микробиология. 2000. Т. 69. С. 831–843.
- Pimenov N.V., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbiological processes of the carbon and sulfur cycles at cold methane seeps of the North Atlantic // Microbiology (Moscow). 2000. V. 69. P. 709–721.
- Пименов Н.В., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Малахова Т.В., Самылина О.С., Канапатский Т.А., Тихонова Е.Н., Власова М.А. Структура микробных матов в прибрежных районах Мраморной бухты // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 561–572.
- Pimenov N.V., Merkel A.Y., Samylin O.S., Kanapatskii T.A., Tikhonova E.N., Vlasova M.A., Tarnovetskii I.Y., Malakhova T.V. Structure of microbial mats in the Mramornaya Bay

- (Crimea) coastal areas // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V. 87. P. 681–691.
- Русанов И.И., Саввичев А.С., Юсупов С.К., Пименов Н.В., Иванов М.В. Образование экзометаболитов в процессе микробного окисления метана в морских экосистемах // *Микробиология*. 1998. Т. 67. С. 710–717.
- Rusanov I.I., Savvichev A.S., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V. Production of exometabolites in the microbial oxidation of methane in marine ecosystems // *Microbiology (Moscow)*. 1998. V. 67. P. 590–596.
- Berchet A., Bousquet P., Pison I., Locatelli R., Chevallier F., Paris J.-D., Dlugokencky E.J., Laurila T., Hatakka J., Viisanen Y., Worthy D.E.J., Nisbet E., Fisher R., France J., Lowry D., Ivakhov V., Hermansen O. Atmospheric constraints on the methane emissions from the East Siberian Shelf // *Atmos. Chem. Phys.* 2016. V. 16. P. 4147–4157.
- Bianchi M., Marty D., Teyssie J.L., Fowler S.W. Strictly aerobic and anaerobic bacteria associated with sinking particulate matter and zooplankton fecal pellets // *Marine Ecol. Progr. Ser.* 1992. V. 88. P. 55–60.
- Bižić M., Grossart H.-P., Ionescu D. Methane Paradox // *eLS* / Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2020a. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0028892>
- Boeuf D., Humily F., Jeanthon C. Diversity of Arctic pelagic bacteria with an emphasis on photoheterotrophs: a review // *Biogeosciences*. 2014. V. 11. P. 3309–3322.
- Born D.A., Ulrich E.C., Ju K.-S., Peck S.C., van der Donk W.A., Drennan C.L. Structural basis for methylphosphonate biosynthesis // *Science*. 2017. V. 358. P. 1336–1339.
- Brown M.V., Lauro F.M., DeMaere M.Z., Muir L., Wilkins D., Thomas T., Riddle M.J., Fuhrman J.A., Andrews-Pfannkoch C., Hoffman J.M., McQuaid J.B., Allen A., Rintoul S.R., Cavicchioli R. Global biogeography of SAR11 marine bacteria // *Mol. Syst. Biol.* 2012. V. 8. P. 595.
- Carini P., White A.E., Campbell E.O., Giovannoni S.J. Methane production by phosphate-starved SAR11 chemoheterotrophic marine bacteria // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4346.
- Damm E., Helmke E., Thoms S., Schauer U., Nöthig E., Bakker K., Kiene R.P. Methane production in aerobic oligotrophic surface water in the central Arctic Ocean // *Biogeosci.* 2010. V. 7. P. 1099–1108.
- Damm E., Thoms S., Beszczynska-Möller A., Nöthig E., Kattner G. Methane excess production in oxygen-rich polar water and a model of cellular conditions for this paradox // *Polar Sci.* 2015. V. 9. P. 327–334.
- Ditchfield A., Wilson S., Hart M., Purdy K.J., Green D.H., Hatton A.D. Identification of putative methylotrophic and hydrogenotrophic methanogens within sedimenting material and copepod faecal pellets // *Aquat. Microbial Ecol.* 2012. V. 67. P. 151–160.
- Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. V. 2. P. 6.
- Gruber N., Sarmiento J.L. Global patterns of nitrogen fixation and denitrification // *Global Biogeochem. Cycles*. 1997. V. 11. P. 235–266.
- 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.
- Karl D.M., Beversdorf L., Björkman K.M., Church M.J., Martinez A., DeLong E.F. Aerobic production of methane in the sea // *Nat. Geosci.* 2008. V. 1. P. 473–478.
- Kurth J.M., Op den Camp H.J.M., Welte C.U. Several ways one goal – methanogenesis from unconventional substrates // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. P. 6839–6854.
- Metcalf W.W., Griffin B.M., Cicchillo R.M., Gao J., Janga S.C., Cooke H.A., Circello B.T., Evans B.S., Martens-Habbena W., Stahl D.A., van der Donk W.A. Synthesis of methylphosphonic acid by marine microbes: a source for methane in the aerobic ocean // *Science*. 2012. V. 337. P. 1104–1107.
- Methods of Seawater Analysis / Eds. Grashoff K., Kremling K., Ehrhard M. Weinheim-NewYork-Chichester-Brisbane-Singapore-Toronto: Wiley-VCH, 1999. 632 p.
- Malmstrom R.R., Kiene R.P., Cottrell M.T., Kirchman D.L. Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic Ocean // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 4129–4135.
- Peschek G.A., Villgrater K., Wastyn M. “Respiratory protection” of the nitrogenase in dinitrogen-fixing cyanobacteria // *Plant Soil*. 1991. V. 137. P. 17–24.
- Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *In situ* activity studies in thermal environments // *Methods in Microbiology*, 35. Extremophiles / Eds. Rainey F.A. and Oren A. Amsterdam: Acad. Press, Elsevier, 2006. P. 29–53.
- Rogener M.K., Sipler R.E., Hunter K.S., Bronk D.A., Joye S.B. Pelagic methane oxidation in the northern Chukchi Sea // *Limnol. Oceanogr.* 2020. V. 65. P. 96–110.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Kravchishina M.D., Galkin S.V., Novigatskii A.N., Sigalevich P.A., Merkel A.Yu., Ravin N.V., Pimenov N.V., Flint M.V. Methane as an organic matter source and the trophic basis of a Laptev Sea cold seep microbial community // *Geomicrobiol. J.* 2018. V. 35. P. 411–423.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Beletsky A.V., Krasnova E.D., Voronov D.A., Kallistova A.Yu., Veslopolova E.F., Zakharova E.E., Kokryatskaya N.M., Losyuk G.N., Demidenko N.A., Belyaev N.A., Sigalevich P.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Microbial processes and microbial communities in the water column of the polar meromictic lake Bol'shie Khruslomeny at the White Sea coast // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 1945.
- Semiletov I., Dudarev O., Luchin V., Shin K.-H., Tanaka N. The East-Siberian Sea as a transition zone between Pacific-derived waters and Arctic shelf waters // *Geophys. Res. Lett.* 2005. V. 32. Art. L10614/2005GL022490.
- Semiletov I., Pipko I., Gustafsson Ö., Anderson L.G., Sergienko V., Pugach S., Dudarev O., Charkin A., Gukov A., Bröder L., Andersson A., Spivak E., Shakhova N. Acidification of East Siberian Arctic Shelf waters through addition of freshwater and terrestrial carbon // *Nature Geosci.* 2016. V. 9. P. 361–365.
- Semiletov I.P., Pipko I.I., Shakhova N.E., Dudarev O.V., Pugach S.P., Charkin A.N., McRoy C.P., Kosmach D., Gustafsson Ö. Carbon transport by the Lena River from its headwaters to the Arctic Ocean, with emphasis on fluvial input of terrestrial particulate organic carbon vs. carbon transport by coastal erosion // *Biogeosci.* 2011. V. 8. P. 2407–2426.

- Shakhova N., Semiletov I., Leifer I., Salyuk A., Rekan P., Kosmach D. Geochemical and geophysical evidence of methane release over the East Siberian Arctic Shelf // J. Geophys. Res. 2010. V. 115. C08007.
- Shakhova N., Semiletov I., Sergienko V., Lobkovsky L., Yusupov V., Salyuk A., Salomatin A., Chernykh D., Kosmach D., Pantelev G., Nicolsky D., Samarkin V., Joye S., Charkin A., Dudarev O., Meluzov A., Gustafsson Ö. The East Siberian Arctic Shelf: towards further assessment of permafrost-related methane fluxes and role of sea ice // Phil. Trans. R. Soc. A. 2015. V. 373. Article 20140451.
- Sosa O.A., Repeta D.J., DeLong E.F., Ashkezari M.D., Karl D.M. Phosphate-limited ocean regions select for bacterial populations enriched in the carbon–phosphorus lyase pathway for phosphonate degradation // Environ. Microbiol. 2019. V. 21. P. 2402–2414.
- Sun J., Todd J.D., Thrash J.C., Qian Y., Qian M.C., Temperton B., Guo J., Fowler T.K., Aldrich J.T., Nicora C.D., Lipton M.S., Smith R.D., De Leenheer P., Payne S.H., Johnston A.W.B., Davie-Martin C.L., Halsey K.H., Giovannoni S.J. The abundant marine bacterium *Pelagibacter* simultaneously catabolizes dimethylsulfoniopropionate to the gases dimethyl sulfide and methanethiol // Nature Microbiol. 2016. V. 1. P. 16065.
- Tallant T.C., Krycki J.A. Methylthiol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethylsulfide and methylmercaptopropionate // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 6902–6911.
- Tripp H.J., Kitner J.B., Schwalbach M.S., Dacey J.W.H., Wilhelm L.J., Giovannoni S.J. SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth // Nature. 2008. V. 452. P. 741–744.
- Voget S., Wemheuer B., Brinkhoff T., Vollmers J., Dietrich S., Giebel H.-A., Beardsley C., Sardemann C., Bakenhus I., Billerbeck S., Daniel R., Simon M. Adaptation of an abundant Roseobacter RCA organism to pelagic systems revealed by genomic and transcriptomic analyses // ISME J. 2015. V. 9. P. 371–384.
- Zhang X.H., Liu J., Liu J., Yang G., Xue C., Curson A.R.J., Todd J.D. Biogenic production of DMSP and its degradation to DMS – their roles in the global sulfur cycle // Sci. China Life Sci. 2019. V. 62. P. 1296–1319. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9524-y>

On the Possibility of Aerobic Methane Production by Pelagic Microbial Communities of the Laptev Sea

O. S. Samylina^{1,*}, I. I. Rusanov¹, I. Yu. Tarnovetskii¹, E. V. Yakushev^{2,3}, A. A. Grinko⁴, E. E. Zakharova¹, A. Yu. Merkel¹, T. A. Kanapatskiy¹, I. P. Semiletov^{5,6}, and N. V. Pimenov¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

²Shirshov Institute of Oceanology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

³Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Oslo, 0349 Norway

⁴National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634050 Russia

⁵Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

⁶Higher School of Economics, Moscow, 111033 Russia

*e-mail: olga.samylina@gmail.com

Received October 21, 2020; revised November 17, 2020; accepted November 17, 2020

Abstract—The taxonomic diversity and metabolic activity of microbial communities in the Laptev Sea water column above and outside the methane seep field was studied. The concentrations of dissolved methane in the water column at both stations were comparable until the depth of the pycnocline (25 m). At this depth, local methane maxima were recorded, with the highest concentration (116 nM CH₄) found at the station outside the methane seep field. Results of the 16S rRNA gene sequencing and measurements of the rates of hydrogenotrophic methanogenesis indicated the absence of methanogenesis caused by the methanogenic archaea in the pycnocline and in other horizons of the water column. The 16S rRNA-based analysis of microbial phylogenetic diversity, as well as radiotracer analysis of the rates of primary production (PP), dark CO₂ assimilation (DCA), and methane oxidation (MO), indicated the functioning of a diverse community of pelagic microorganisms capable of transforming a wide range of organic compounds under oligotrophic conditions of the Arctic basin. Hydrochemical prerequisites and possible microbial agents of aerobic methane production via demethylation of methylphosphonate and decomposition of dimethylsulfoniopropionate using dissolved organic matter synthesized in the PP, DCA, and MO processes are discussed.

Keywords: Laptev Sea, pelagic zone, methane seep, methane paradox, aerobic methane production

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ВЫДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ ШТАММОВ
THERMOANAEROBACTERIUM ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ
МЕТАНОГЕННЫХ СООБЩЕСТВ

© 2021 г. Л. И. Попова^{a,b}, Х. Баль^b, М. А. Егорова^a, М. Р. Леонтьева^a,
А. И. Нетрусов^a, Е. А. Цавкелова^{a,*}

^aКафедра микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^bДепартамент микробиологии математического и естественно-научного
факультета Университета, г. Росток, Германия

*e-mail: tsavkelova@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 22.10.2020 г.

Принята к публикации 26.10.2020 г.

Из двух лабораторных термофильных анаэробных целлюлозолитических метаногенных сообществ, культивируемых на различных типах бумажных субстратов, путем высева на агаризованные среды CM3 и GS2 при 55°C были получены отдельные колонии, и выделены чистые культуры, принадлежащие к роду *Thermoanaerobacterium*. Для трех изолятов показана их целлюлозолитическая активность при росте на плотных и жидких средах с МКЦ и фильтровальной бумагой в качестве субстратов. При исследовании филогенетического родства этих изолятов с референсными штаммами *T. thermosaccharolyticum* DSM 571, M0795, TG57 два изолята (I2 и I3) кластеризовались с ними, тогда как изолят I1 не попал в достоверно выделенный кластер с представителями этого вида и формировал отдельную ветвь. Отличительной особенностью изолята I2 является образование им нерастворимого желтого аффинного вещества (YAS), характерного для таких анаэробных целлюлозолитиков, как *Clostridium thermocellum*, и служащего связывающим агентом между целлюлазой и субстратом. Результаты, полученные нами, свидетельствуют о том, что целлюлозолитические штаммы рода *Thermoanaerobacterium* входят в доминирующие популяции целлюлозолитиков при биоконверсии бумажных субстратов в биогаз в термофильных условиях. Несмотря на то, что у типового штамма *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 нет целлюлозолитической способности, наши результаты согласуются с недавними данными исследователей о способности ряда штаммов *T. thermosaccharolyticum* к деструкции целлюлозы.

Ключевые слова: анаэробное микробное сообщество, биоразложение целлюлозы, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*

DOI: 10.31857/S0026365621020105

Современная биоэнергетика использует различные типы биотоплива, среди которых наибольшее распространение имеет получение биогаза в результате микробиологической переработки отходов сельского хозяйства и животноводства, а также органических бытовых, муниципальных и промышленных стоков. Особый интерес вызывают целлюлозосодержащие субстраты, представленные биомассой растений (Sun, Cheng, 2002; Цавкелова, Нетрусов, 2012). Отличительной чертой деструкторов целлюлозы является высокая экспрессия ими пула гидролитических ферментов, в которых основную роль играют целлюлазы, осуществляющие гидролиз β-1,4-гликозидных связей в молекулах целлюлозы и относящиеся к семейству гликозилгидролаз (К.Ф. 3.2.1). Среди аэробных бактерий наиболее активными целлюлозолитиками

являются *Cellulomonas* и *Thermobifida* (Lynd et al., 2002). Целлюлазная система аэробных бактерий, в основном, представлена эндоглюканазами и меньшим количеством экзоглюканаз (Рабинович, Мельник, 2000). Факультативные и строгие анаэробные целлюлозолитики обнаружены среди комменсалов травоядных жвачных животных — это *Ruminococcus*, *Fibrobacter* и *Butyrivibrio*, группы экстремофилов — *Caldicellulosiruptor*, *Thermotoga*, *Anaerocellum* и *Halocella* (Koeck et al., 2014), а также выделенных из различных микробных консорциумов представителей родов *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus* и *Herbivibrio* (Lynd et al., 2002). В отличие от аэробных бактерий, которые синтезируют и выделяют наружу целлюлазы в достаточно высоких концентрациях, строгие анаэробы предпочитают другую стратегию, выражающуюся

шующая в наличии на их клеточной поверхности мультиферментного комплекса — целлюлосомы, позволяющей обеспечивать высокую эффективность разложения целлюлозы даже при низких концентрациях ферментов (Рабинович, Мельник, 2000; Цавкелова, Нетрусов, 2012). На примере целлюлозоразлагающих кластридий *C. thermocellum* показано, что структурная организация целлюлосом, объединяющих 15–25 различных ферментов с целлюлазной и другими гидролитическими активностями, а также интегрирующие их структурные белки скаффолдины, позволяют достигнуть синергизма в активности ферментов за счет оптимизации одновременного их воздействия на субстрат, а также отсутствия конкуренции за ограниченное количество сайтов связывания с субстратом (Lynd et al., 2002). Эффективность биоразложения целлюлозы определяется адгезией анаэробных микроорганизмов на субстрате.

Среди представителей порядка *Clostridiales* наиболее характерными деструкторами целлюлозы являются виды родов *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, а также *Thermoanaerobacter*, *Caloramator* и *Caldicellulosiruptor* (Vishnivetskaya et al., 2015), а *Thermotoga* являются экстремофилами с оптимумом роста выше 70°C и, в отличие от других анаэробов, не содержат целлюлосом и синтезируют несвязанные с клетками целлюлазы (VanFossen et al., 2008). В последнее время все больше внимания уделяют поиску новых продуцентов термостабильных целлюлаз (Великодворская и соавт., 2013; Koesck et al., 2014). Так, у термофильной целлюлозолитической бактерии *Herbinix hemicellulosilytica* температурный оптимум роста составляет 55°C (Koesck et al., 2015), а *Fervidobacterium riparium*, являющийся анаэробным грамотрицательным термофилом, способен расти на целлюлозе, ксилане и целлобиозе при 65°C (Podosokorskaya et al., 2011).

Ранее нами были выделены целлюлозолитические термофильные микробные сообщества (МС), осуществляющие биоконверсию в биогаз ряда целлюлозосодержащих субстратов при 55°C (Цавкелова и соавт., 2012; Tsavkelova et al., 2018). Состав бактерий и архей наиболее активных консорциумов был изучен с помощью молекулярно-биологических методов: ДГГЭ (денатурирующего градиентного гель-электрофореза) и высокопроизводительного секвенирования (ВПС) на базе платформы MiSeq-Illumina. Результаты этих исследований показали значительное различие в составе микробных сообществ при их культивировании на некоторых типах бумаг. Наиболее разнообразными по составу были те сообщества, которые культивировали на офисной бумаге, картоне, а также на смеси легкоразлагаемых и трудноразлагаемых типов бумаг, тогда как отдельно на газетной и журнальной бумагах состав сообщества резко сокращался, в основном за счет синтрофной группы микроорга-

низмов, что также отрицательно влияло на эффективность биоконверсии субстрата в биогаз (Tsavkelova et al., 2018). Среди бактерий, входящих в состав наиболее эффективных целлюлозоразлагающих консорциумов, доминирующим филумом были *Firmicutes* (*Acetivibrio*, *Herbinix*, *Thermoanaerobacterium*, *Tepidanaerobacter*), а среди метаногенных архей — *Methanothermobacter* и *Methanosarcina* (Tsavkelova et al., 2018). Подавляющее большинство целлюлозолитических бактерий принадлежало к классу *Clostridia* и двум порядкам: *Clostridiales* и *Thermoanaerobacteriales*.

Целью настоящей работы было выделение в чистую культуру, идентификация и изучение целлюлозолитических свойств представителей порядка *Thermoanaerobacteriales*, составляющих доминирующие популяции в термофильном метаногенном сообществе, как малоизученных в этом отношении микроорганизмов, большинство из которых до недавнего времени считались неспособными к биодegradации целлюлозы (Lynd et al., 2002; Pei et al., 2012).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования стали анаэробные целлюлозолитические термоанаэробактерии, выделенные из метаногенных термофильных сообществ $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ (Tsavkelova et al., 2018), которые культивировали на среде следующего состава (г/л): K_2HPO_4 — 1.0; KH_2PO_4 — 1.0; NH_4Cl — 2.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.5; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0.1; $NaCl$ — 0.1; $CaCO_3$ — 1.0; $NaHCO_3$ — 5.0; дрожжевой экстракт — 2.0; пептон — 1.0; раствор микроэлементов — 1 мл; резазурин — 0.5 мг/л; вода дистиллированная — 1000 мл; pH 7.0–7.5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): $ZnCl_2$ — 70.0; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 100.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ — 190.0; H_3BO_3 — 6.0; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 36.0; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ — 2.0; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ — 24.0; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ — 15.0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1.0 г/л. Сульфат железа предварительно растворяли в 10 мл 25% HCl; вода дистиллированная — 990 мл, pH среды 7.0. Условия культивирования микроорганизмов при 55°C описаны подробно ранее (Цавкелова и соавт., 2012). В качестве субстрата использовали фильтровальную бумагу Whatman® № 1 в количестве 15 г/л, предварительно разрезанную на фрагменты 0.5 см².

Выделение чистой культуры целлюлозолитических бактерий проводили высевом на плотные питательные среды с целью получения отдельных колоний. Для этого отбирали аликвоту (100 мкл) из исходных целлюлозолитических микробных анаэробных сообществ (ЦМАС) $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$, а также из последовательных их десятикратных разведений (до 10^{-10}), засеивали в толщу агаризованных сред CM3 (Atlas, 1946; среда № 520 из коллекции DSMZ) и GS2 (Johnson et al., 1981), содержащих в

качестве источника углерода 5 г/л микрокристаллической целлюлозы (МКЦ, “Macherey-Nagel”, Германия) или целлобиозу в концентрации 10 г/л. Посевной материал вносили в расплавленную агаризованную среду, охлажденную до температуры ниже 50°C, перемешивали и разливали в чашки Петри. Для получения отдельных колоний также использовали способ посева на двухслойные агаризованные среды в соответствии с ранее описанной методикой (Lv, Yu, 2012), где в качестве нижнего слоя использовали минеральную среду с 2%-ым “голодным агаром” без источника углерода, а верхний слой содержал 0.8% СМЗ-агара с МКЦ или целлюлозой, гидролизованной с помощью фосфорной кислоты для получения аморфной целлюлозы (Zhang et al., 2006). Аликвоту посевного материала (100 мкл) вносили в расплавленный и охлажденный верхний слой, перемешивали и заливали в чашки Петри с уже застывшим нижним слоем.

Культивирование засеянных чашек Петри проводили в анаэробном боксе в течение 2–3 сут при 55°C. После появления единичных колоний их пересеивали в жидкие среды (СМЗ и GS2) с фильтровальной бумагой в качестве субстрата. Из пробирок, в которых наблюдали деградацию субстрата, проводили дополнительные рассевы на плотные среды, а полученные колонии культивировали в жидкой среде в течение не менее трех пассажей для того, чтобы убедиться, что культуры не теряют способность к разложению целлюлозы (Koeck et al., 2015). Целлюлазную активность оценивали визуально по полной деструкции субстрата (фильтровальная бумага), а также по содержанию редуцирующих сахаров в культуральной жидкости после разложения фильтровальной бумаги с помощью ДНСК (3,5-динитросалициловой кислоты), в соответствии с методикой, описанной ранее (Прокудина и соавт., 2016). Результаты реакции оценивали колориметрически при 540 нм на спектрофотометре (Hitachi 200-20, Япония) качественно: “–” – отсутствие окрашивания, “±” – слабое окрашивание, “+” – интенсивное окрашивание.

Филогенетический анализ микроорганизмов. Выделение ДНК проводили с использованием фенол-хлороформного метода или с использованием набора Blood/Genomic DNA Purification Mini Spin Column Kit (“Genaxxon”, ФРГ). Для амплификации участка гена 16S рРНК использовали систему универсальных праймеров EUB1 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и EUB2 (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), занимающих, соответственно, позиции 27–45 и 1542–1561 в геноме *E. coli* с помощью набора реактивов DreamTaq Green PCR Master Mix (“Thermo Scientific”, ФРГ). Рабочая смесь (60 мкМ) для ПЦР составляла 25 мкл DreamTaq Green PCR Master Mix, с содержащимися в буферном растворе смесью

нуклеотидов, $MgCl_2$ и полимеразой DreamTaq DNA Polymerase, а также 50 мкл (10 мкМ) каждого праймера и 1 мкл ДНК (100 нг); до требуемого объема доводили стерильной деионизированной Milli-Q водой. Использовали следующую последовательность циклов нагревания–охлаждения: денатурирующую стадию проводили при 94°C 5 мин, далее в каждом цикле денатурацию проводили при 94°C 20 с, отжиг – при 48°C в течение 30 с и элонгацию – при 72°C в течение 2 мин. В последующих циклах денатурацию проводили при 94°C 20 с, отжиг – при 45°C в течение 30 с и элонгацию – при 72°C в течение 1 мин. ПЦР-продукты амплификации (1 мкл) просматривали на агарозном 0.8% геле, в качестве маркера использовали DNA-Marker 1 kb (MassRuler “Thermo Fisher”, ФРГ).

Полученные продукты амплификации (1500 п.н.) очищали согласно протоколу с помощью набора NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (“Macherey-Nagel”, ФРГ) и секвенировали в компании “LGC Genomics GmbH” (ФРГ). Полученные последовательности генов 16S рРНК обрабатывали в программе UGENE. Анализ и сравнение данных проводили с последовательностями, имеющимися в базе данных BLAST [NCBI (Национальный центр биотехнологии, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)]. Сравнение контигов и гомологичных участков последовательностей полных геномов проводили в программе UGENE с помощью метода выравнивая по алгоритму Muscle. Для построения филогенетического дерева использовали программу MegaX и алгоритм Neighbour-Joining. Оценку достоверности топологии дендрограммы осуществляли с помощью “bootstrap” анализа 1000 альтернативных деревьев в той же программе. Множественное выравнивание частичных последовательностей нуклеотидов по 16S rRNA, построенное с помощью программы UGENE, проводили на основании трех биологических повторностей (выделение ДНК проводили каждый раз из заново полученной биомассы) для каждого изолята.

Микроскопия. Изучение морфологии клеток выделенных культур проводили на фиксированных окрашенных основным фуксином препаратах с использованием светового микроскопа Olympus BX41TF (ФРГ). Для сканирующей электронной микроскопии образцы ЦМАС, из которых проводили выделение чистых культур, были подготовлены, зафиксированы и напылены согласно описанной ранее методике (Tsavkelova et al., 2018). Микроскопирование проводили с помощью сканирующего аналитического электронного микроскопа JSM-6380LA (“Jeol”, Япония) на базе межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

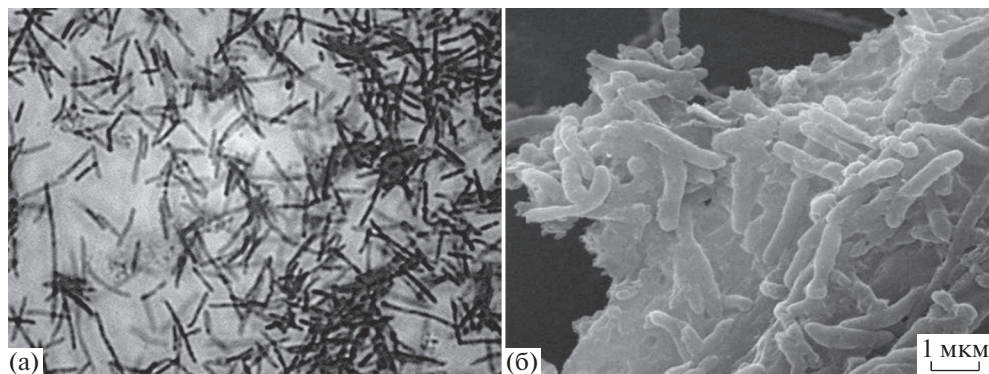


Рис. 1. Морфология клеток анаэробных целлюлозолитических бактерий. Слева (а) культура *Thermoanaerobacterium* sp. (изолят I2) при выращивании на жидкой среде GS2 (световая микроскопия; $\times 2000$; Olympus BX41 TF). Справа (б) — адгезия целлюлозолитиков на фильтровальной бумаге (СЭМ; JSM-6380LA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение чистых культур. При выделении на агаризованных средах (СМ3 и GS2) чистых культур целлюлозолитических бактерий, которые потенциально могли оказаться принадлежащими к роду *Thermoanaerobacterium*, из ЦМАС $\Sigma 4$ и $\Sigma 7$ (Tsavkelova et al., 2018) было получено 150 отдельных колоний, которые были затем вновь пересеяны на те же среды, содержащие МКЦ. Большинство из них, однако, при дальнейших пересевах прекращали свой рост на целлюлозе в качестве единственного источника углерода. В результате нами были отобраны три изолята, которые после пересевов в течение не менее трех пассажей и микроскопирования оставались однородными и активными в отношении деградации целлюлозы. Им были присвоены условные номера: изолят 1 (I1), изолят 2 (I2) и изолят 3 (I3). Изолят I1 был выделен из микробного термофильного сообщества $\Sigma 4$, а два других изолята — из сообщества $\Sigma 7$. Эти два сообщества исходно отличались тем, что $\Sigma 4$ сообщество объединяло четыре наиболее активных метаногенных консорциума, выделенных ранее (Цавкелова и соавт., 2012; Tsavkelova et al., 2018) из навоза крупного рогатого скота, донных осадков и помета копытных животных, а сообщество $\Sigma 7$ дополнительно содержало инокулят, полученный из навоза пони и черной антилопы, а также жомы красного винограда.

Морфология клеток и разложение целлюлозы. Выделенные культуры представляют собой палочки с округлыми концами, длиной около 2.0–10.0 мкм, расположенные одиночно и парами, реже в цепочках. У всех изолятов было отмечено спорообразование при выращивании в жидкой среде GS2. Колонии, которые образовывали культуры на среде СМ3, были небольшими (2–3 мм в диаметре), плоскими и округлыми, имели сероватый оттенок. На рис. 1 представлены микрофотографии изолята I2, выращенного на жидкой среде GS2

(оптическая микроскопия) и при культивировании на фильтровальной бумаге (СЭМ), где можно видеть адгезию клеток на субстрате с формированием агрегатов и микроколоний.

При дальнейшем пассировании в жидкой среде GS2 с фильтровальной бумагой в качестве единственного субстрата в течение 5 пассажей, изоляты сохранили способность к деградации целлюлозы, однако их активность различалась. У всех трех изолятов было отмечено разложение фильтровальной бумаги с образованием сахаров в среде (по реакции с ДНСК), но наиболее быстрое использование (в течение 4 сут) фильтровальной бумаги наблюдали для изолята I1, тогда как изоляты I2 и I3 разлагали субстрат за 7 и 10 сут соответственно. Характерным признаком при росте изолята I2 на жидкой среде стало то, что по мере использования фильтровальной бумаги, он активно образовывал желтый пигмент, типичный для некоторых анаэробных целлюлозолитиков, что также косвенно свидетельствует об использовании им целлюлозы в анаэробных условиях.

Филогенетическое положение. На следующем этапе работы было проведено секвенирование участка гена 16S рРНК для каждого из изолятов с использованием пары универсальных праймеров EUB1 и EUB2. Для I1, I2 и I3 полученные последовательности были депонированы в генбанке (NCBI) с идентичностью 97.34, 99.39 и 100% с *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571; 97.34, 99.39 и 100% с *T. thermosaccharolyticum* M0795; 97.23, 99.30 и 99.84% с *T. thermosaccharolyticum* TG57 под номерами MT859098, MT887224 и MT887225 соответственно. При объединении последовательностей в контиги длиной 1300–1400 п.о. были получены данные, представленные в табл. 1. При сопоставлении референсных геномов с исследуемыми последовательностями 16S rRNA среди гомологичных участков доля совпадающих нуклеотидов была выше 97% (“Identity”), а значе-

Таблица 1. Филогенетическое родство анаэробных целлюлозолитиков, принадлежащих к роду *Thermoanaerobacterium*, по результатам сиквенса участка гена 16S рПНК

Изоляты	Исходное микробное сообщество	Максимальная гомология по данным базы NCBI	Гомология, %
Изолят I1	Σ4	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP002171.1)	97.63
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	97.63
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	97.55
Изолят I2	Σ7	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	99.48
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP002171.1)	99.48
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	99.41
Изолят I3	Σ7	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> M0795 (CP003066.1)	100
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain DSM 571 (CP002171.1)	100
		<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain TG57 (CP016893.1)	99.84

Примечание. Полногеномные последовательности для трех штаммов *T. thermosaccharolyticum* M0795, DSM 571 и TG57 получены из базы данных NCBI. Результаты сиквенса участка гена 16S рПНК для изолятов получены с использованием универсальных праймеров EUB1 и EUB2.

ния E-value ниже 0.01 (BLAST). Согласно полученным результатам, изоляты I2 и I3 имеют более 99% сходства именно со штаммами *T. thermosaccharolyticum* TG57 и *T. thermosaccharolyticum* M0795. Штамм TG57 имеет сходство 99% с типовым штаммом *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 (Li et al., 2018).

Наиболее отличающуюся от описанных ранее штаммов последовательность имел изолят I1: его идентичность со штаммами *T. thermosaccharolyticum* составила 97.63% для M0795 и DSM 571 и 97.55% для TG57 (табл. 1), что является недостаточным основанием для видового соответствия и идентификации. Наиболее вариабельные участки находятся в координатах выравнивания 4–54, 793–840 и 858–1036, среди которых встречались инсерции (1–2 нуклеотида), делеции (5 нуклеотидов), трансверсии и транзиции (данные не представлены).

Для анализа структурного и эволюционного филогенетического родства выделенных изолятов с уже известными штаммами было выполнено множественное локальное выравнивание с помощью программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и UGENE (“Унипро”, Россия). В качестве референсных штаммов были выбраны последовательности гена 16S рПНК, извлеченные из

полных геномов *T. thermosaccharolyticum* штаммов DSM 571, TG57 и M0795, а также ряда других видов одноименного рода: *T. xylanolyticum*, *T. saccharolyticum*, *T. calidifontis*, *T. islandicum*, *T. aciditolerans*, *T. theomosulfurigenes*, *T. aotearoense*, *T. butyriciformans*, *T. themostercoris*, *T. bryantii*. В результате проведенного анализа были построены три филогенетических дерева с использованием методов максимального правдоподобия (Maximum-likelihood), ближайшего соседа (Neighbor-Joining) и максимальной экономии (Parsimony).

Все три филограммы имеют сходную базовую топологию, однако различаются по величинам достоверности ветвления кластеров. Так, на дереве, построенном по алгоритму максимального правдоподобия (Maximum-likelihood, рис. 2а), все три изолята отвечают в группу с узлом ветвления 81% вместе с представителями вида *T. thermosaccharolyticum*, при этом внутри кластера достоверность узлов ветвления составляет 45–59%. В то же время при использовании алгоритма Neighbor-Joining (рис. 2б) изоляты I2 и I3 кластеризуются со штаммами *T. thermosaccharolyticum* M0795, DSM 571 и TG57 с величиной достоверности 88%, тогда как изолят I1 формирует отдельную ветвь на уровне умеренной поддержки ветвления

66%. Аналогичная топология ветвления наблюдается и для дендрограммы, построенной с помощью Parsimony анализа (рис. 2в), где изолят I1 не формирует достоверно определяемый кластер (ближайший, как и в случае филограммы 2б, к *T. bryantii*), что с большей вероятностью свидетельствует о том, что этот изолят принадлежит к другому виду из рода *Thermoanaerobacterium*. Однако для проверки этой гипотезы необходим дальнейший анализ, в том числе по функциональным генам, участвующим в разложении целлюлозы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные нами в этой работе, о способности представителей *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* к биоразложению целлюлозы и выделение чистых культур подтверждают наши предыдущие данные по ДГГЭ анализу состава термофильных анаэробных сообществ (Tsavkelova et al., 2018), где бактериальные популяции этого вида занимали доминирующее положение. При этом они встречались не только в составе консорциумов, культивируемых на легкоразлагаемых субстратах: офисной бумаге и гофрированном картоне, но и на трудноразлагаемых журнальной и газетной бумагах, а также на смеси этих субстратов. Таким образом, микроорганизмы, принадлежащие к роду *Thermoanaerobacterium*, способные к разложению целлюлозосодержащих субстратов с низким содержанием лигнина (на примере бумажной продукции), являются активными анаэробными гидролитами в термофильных метаногенных сообществах, культивируемых при 55°C.

Термофильные изоляты из рода *Thermoanaerobacterium* могут представлять интерес как источник целлюлаз, активных при высоких температурах. Так, новая термо- и галотолерантная целлюлаза была выделена из *Thermoanaerobacterium* sp., изолированного из горячего источника в Исландии (Zarafeta et al., 2016). Этот фермент (CelDZ1) оказался активным при pH 5.0 в широком диапазоне температур с оптимумом при 70°C в отношении растворимых полимерных субстратов, содержащих β -1,4 гликозидные связи, например, КМЦ и β -D-глюкана, однако неактивен по отношению к фильтровальной бумаге и Avicel. В нашем исследовании мы также использовали в качестве одного из субстратов целлюлозу (МКЦ) с аморфными участками после обработки фосфорной кислотой (PASC — phosphoric acid swollen cellulose; Zhang et al., 2006), что увеличивает возможность ее использования целлюлозолитиками.

При выделении чистых культур изолятов мы использовали метод получения отдельных колоний микроорганизмов. При этом известно, что даже визуально различимые единичные колонии

анаэробных целлюлозолитиков, что было показано на примере *Clostridium thermocellum* СТ1 и СТ2, могут представлять собой не единственную культуру, а соседствовать с нецеллюлозолитическими колониями-спутниками (Sizova et al., 2011). Полученные изоляты подтвердили свою целлюлозолитическую активность в течение нескольких пересевов на жидкой среде с фильтровальной бумагой в качестве субстрата. Образующий изолятом I2 желтый пигмент, согласно литературным данным, является водонерастворимым соединением, названным “желтым афинным веществом” (от англ. yellow affinity substance, YAS), которое при росте на целлюлозосодержащих субстратах синтезирует *Clostridium thermocellum* (Ljungdahl et al., 1983; Kannuchamy et al., 2016), а также некоторые другие анаэробные целлюлозолитики, например, *Ruminococcus flavefaciens* (Коресну, Hodrova, 1997). Считается, что это каротиноидоподобное соединение, которое легко обесцвечивается при контакте с кислородом, а его роль заключается в адгезии целлюлосомы к целлюлозе, что повышает ее аффинность к субстрату (Ljungdahl et al., 1983; Коресну, Hodrova, 1997).

Все выделенные нами изоляты показывали наибольшее сходство с представителями рода *Thermoanaerobacterium*, преимущественно с видом *T. thermosaccharolyticum* (ранее *Clostridium thermosaccharolyticum*). Типовым штаммом этого вида является *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 (De Vos et al., 2009). Согласно базе данных GenBank (NCBI CP003066.1), у данного штамма не обнаружено функционального гена β -глюкозидазы, необходимого для расщепления целлюлозы. Соответственно, рост штамма *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 на целлюлозе в качестве единственного субстрата невозможен из-за отсутствия основного фермента, разлагающего целлюлозу (Pei et al., 2012). В литературе упоминается о неспособности представителей *T. thermosaccharolyticum* к использованию целлюлозы (Lynd et al., 2002; Pei et al., 2012). При этом нецеллюлозолитические представители *Thermoanaerobacterium* могут быть спутниками для целлюлозолитиков, например, *Clostridium thermocellum*, которая адгезируется на волокнах целлюлозы, а *T. thermosaccharolyticum* находится в виде планктонной культуры, метаболизируя гексозы, образуемые *C. thermocellum* в процессе гидролиза целлюлозы (He et al., 2011). В то же время у штамма *T. thermosaccharolyticum* M0795 (CP003066.1) геном полностью секвенирован, и в нем подтверждено наличие гена β -глюкозидазы (Shaw et al., 2010).

К настоящему времени уже описано несколько штаммов, принадлежащих к виду *T. thermosaccharolyticum*, способных к деструкции целлюлозы, — это *T. thermosaccharolyticum* M5 (Jiang et al., 2015), *T. thermosaccharolyticum* M0795 (Shaw et al., 2010), *T. thermosaccharolyticum* PSU-2 (O-Thong et al.,

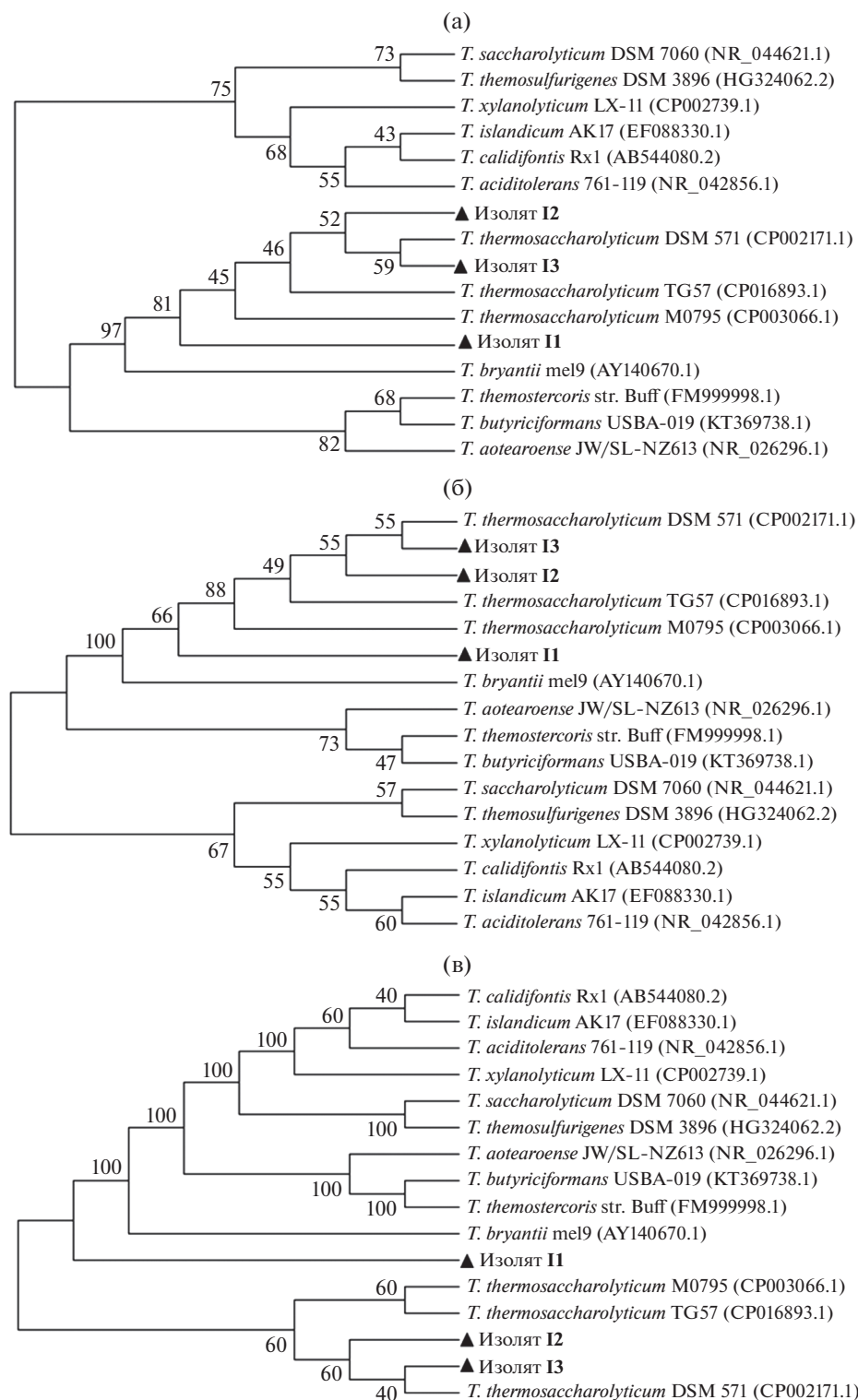


Рис. 2. Филогенетическое древо последовательностей 16S рРНК изолятов, принадлежащих *Thermoanaerobacterium* (1214 п.н.), выделенных из термофильных метаногенных сообществ. Дендрограммы построены на основании анализа множественного выравнивания исследуемых контигов и референсных последовательностей в программе MEGA X[®] с помощью методов Maximum Likelihood (а), Neighbor-Joining (б), Maximum Parsimony (в). В качестве реперных образцов использованы последовательности 16S rRNA (номера указаны согласно базе данных NCBI) нескольких штаммов *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *T. xylanolyticum*, *T. saccharolyticum*, *T. calidifontis*, *T. islandicum*, *T. aciditolerans*, *T. thomosulfurigenes*, *T. aotearoense*, *T. butyriciformans*, *T. thomostercoris*, *T. bryantii*. Значимость разбиения на кластеры указана в цифрах, обозначающих достоверность ветвления согласно бутстреп (bootstrap) анализу (% от 1000 реплик).

2008), а также *T. thermosaccharolyticum* TG57 (Li et al., 2018). Среди них особый практический интерес представляет *T. thermosaccharolyticum* TG57, обладающий высокой активностью бутанодегидрогеназы и эндоцеллюлазы, который при культивировании на среде с 3%-ой МКЦ образует 1.9 г/л бутанола (Li et al., 2018).

В соответствии с литературными данными, таким образом, внутри вида *T. thermosaccharolyticum* имеются штаммы, обладающие функциональным ферментом β-глюкозидазой (*T. thermosaccharolyticum* TG57) и штаммы, у которых этот фермент неактивен (*T. thermosaccharolyticum* DSM 571), что определяет их неспособность к разложению целлюлозы. Результаты нашего исследования показали, что выделенные целлюлозолитики относятся к роду *Thermoanaerobacterium*, при этом нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК изолятов I2 и I3 более чем на 99% соответствовали последовательностям *T. thermosaccharolyticum* TG57, DSM 571 и M0795 (по базе данных NCBI). Согласно филогенетическому анализу, изоляты I2 и I3 формируют единый кластер с *T. thermosaccharolyticum*. Однако изолят I1 не попал в один достоверно выделенный кластер с другими изолятами и имеет менее 98% гомологии со штаммами *T. thermosaccharolyticum*, что является недостаточным условием для идентификации на уровне вида. На филограммах, построенных с помощью трех разных алгоритмов, изолят I1 формирует отдельную ветвь, но с достоверностью объединения организмов в единый кластер лишь 81% (Maximum-likelihood) между представителями *T. thermosaccharolyticum* и *T. bryantii*, на основании чего можно полагать, что изолят I1 принадлежит к новому виду *Thermoanaerobacterium*.

Наши результаты позволили выявить целлюлозолитические свойства представителей рода *Thermoanaerobacterium* и их роль в составе метаногенных термофильных микробных консорциумов, культивируемых на различного типа бумагах, однако в дальнейшем необходим более детальный анализ генома этих микроорганизмов для определения функциональных генов и кодируемых ими ферментов для изучения их филогенетического положения, а также потенциального использования в биотехнологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Л.И. Попова выражает благодарность Германской службе академических обменов (DAAD) и Федерации Европейских микробиологических сообществ (FEMS) за финансовую поддержку стажировки в департаменте микробиологии Университета г. Росток (Германия).

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

- Великодворская Г.А., Чекановская Л.А., Лунина Н.А., Сергиенко О.В., Лукин В.Г., Дворцов И.А., Зверлов В.В. Углевод-связывающий модуль 28 семейства термостабильной эндо-глюканазы CelD из анаэробного микроорганизма *Caldicellulosiruptor bescii* необходим для максимальной активности фермента и необратимо связывается с аморфной целлюлозой // Мол. биол. 2013. Т. 47. С. 667–667.
- Velikodvorskaya G.A., Chekanovskaya L.A., Lunina N.A., Dvortsov I.A., Zverlov V.V., Sergienko O.V., Lunin V.G. Family 28 carbohydrate-binding module of the thermostable endo-1,4-β-glucanase CelD from *Caldicellulosiruptor bescii* maximizes enzyme activity and irreversibly binds to amorphous cellulose // Mol. Biol. 2013. V. 47. С. 581–586.
- Рабинович М.Л., Мельник М.С. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Успехи биол. хим. 2000. Т. 40. С. 205–266.
- Прокудина Л.И., Осмоловский А.А., Егорова М.А., Малахова Д.В., Нетрусов А.И., Цавкелова Е.А. Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов микромицетами с последующей биоконверсией в биогаз // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. С. 200–209.
- Prokudina L.I., Osmolovskiy A.A., Egorova M.A., Malakhova D.V., Netrusov A.I., Tsavkelova E.A. Biodegradation of cellulose-containing substrates by micromycetes followed by bioconversion into biogas // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. P. 190–198.
- Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И. Образование биогаза микробными сообществами при разложении целлюлозы и пищевых отходов // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. С. 417–424.
- Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Petrova E.V., Netrusov A.I. Biogas production by microbial communities via decomposition of cellulose and food waste // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 377–384.
- Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И. Получение биогаза из целлюлозосодержащих субстратов (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. С. 469–483.
- Tsavkelova E.A., Netrusov A.I. Biogas production from cellulose-containing substrates (a review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 421–433.
- Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media. N.Y., USA: CRC Press, 2004. 411 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes / Eds. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. Athens, USA: Springer Science & Business Media, 2009. V. 3. 1422 p.

- He Q., Hemme C.L., Jiang H., He Z., Zhou J. Mechanisms of enhanced cellulosic bioethanol fermentation by co-cultivation of *Clostridium* and *Thermoanaerobacter* spp. // *Bioresour. Technol.* 2011. V. 102. P. 9586–9592.
- Jiang H., Gadow S.I., Tanaka Y., Cheng J., Yu-You L. Improved cellulose conversion to bio-hydrogen with thermophilic bacteria and characterization of microbial community in continuous bioreactor // *Biomass Bioenergy.* 2015. V. 75. P. 57–64.
- Johnson E.A., Madia A., Demain A.L. Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1981. V. 41. P. 1060.
- Koeck D.E., Maus I., Wibberg D., Winkler A., Zverlov V.V., Liebl W., Pühler A., Schwarz W.H., Schlüter A. Draft genome sequence of *Herbinix hemicellulosilytica* T3/55T, a new thermophilic cellulose degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor // *J. Biotechnol.* 2015. V. 214. P. 59–60.
- Koeck D.E., Pechtl A., Zverlov V.V., Schwarz W.H. Genomics of cellulolytic bacteria // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. V. 29. P. 171–183.
- Kopečný J., Hodrova B. The effect of yellow affinity substance on cellulases of *Ruminococcus flavefaciens* // *Lett. Appl. Microbiol.* 1997. V. 25. P. 191–196.
- Li T., Zhang C., Yang K.L., He J. Unique genetic cassettes in a *Thermoanaerobacterium* contribute to simultaneous conversion of cellulose and monosugars into butanol // *Sci. Adv.* 2018. V. 4. e1701475.
- Ljungdahl L.G., Pettersson B., Eriksson K.E., Wiesel J. A yellow affinity substance involved in the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum*. // *Curr. Microbiol.* 1983. V. 9. P. 195–199.
- Lv W., Yu Z. Isolation and characterization of two thermophilic cellulolytic strains of *Clostridium thermocellum* from a compost sample // *J. Appl. Microbiol.* 2013. V. 114. P. 1001–1007.
- Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // *Microbiol. Mol. Biol. R.* 2002. V. 66. P. 506–577.
- O-Thong S., Prasertsan P., Karakashev D., Angelidaki I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. P. 1204–1214.
- Pei J., Pang Q., Zhao L., Fan S., Shi H. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose // *Biotechnol. Biofuels.* 2012. V. 5. P. 31.
- Podosokorskaya O.A., Merkel A.Y., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 2697–2701.
- Shaw A.J., Hogsett D.A., Lynd L.R. Natural competence in *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* species // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 4713–4719.
- Sizova M.V., Izquierdo J.A., Panikov N.S., Lynd L.R. Cellulose- and xylan-degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 2282–2291.
- Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review // *Bioresour. Technol.* 2002. V. 83. P. 1–11.
- Tsavkelova E., Prokudina (Popova) L., Egorova M., Leontieva M., Malakhova D., Netrusov A. The structure of the anaerobic thermophilic microbial community for the bioconversion of the cellulose-containing substrates into biogas // *Process Biochem.* 2018. V. 66. P. 183–196.
- VanFossen A.L., Lewis D.L., Nichols J.D., Kelly R.M. Polysaccharide degradation and synthesis by extremely thermophilic anaerobes // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1125. P. 322–337.
- Vishnivetskaya T.A., Hamilton-Brehm S.D., Podar M., Mosher J.J., Palumbo A.V., Phelps T.J., Keller M., Elkins J.G. Community analysis of plant biomass-degrading microorganisms from Obsidian Pool, Yellowstone National Park // *Microb. Ecol.* 2015. V. 69. P. 333–345.
- Zarafeta D., Kissas D., Sayer C., Gudbergdottir S.R., Ladoukakis E., Isupov M.N., Chatzjoannou A., Peng X., Littlechild J.A., Skretas G., Kolis F.N. Discovery and characterization of a thermostable and highly halotolerant GH5 cellulase from an Icelandic hot spring isolate // *PLoS One.* 2016. V. 11. e0146454.

Isolation of Cellulose-Degrading *Thermoanaerobacterium* Strains from Thermophilic Methanogenic Microbial Communities

L. I. Popova^{1,2}, H. Bahl², M. A. Egorova¹, M. R. Leont'eva¹, A. I. Netrusov¹, and E. A. Tsavkelova^{1,*}

¹Department of Microbiology, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

²Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Rostock, 18051 Germany

*e-mail: tsavkelova@mail.ru

Received September 2, 2020; revised October 22, 2020; accepted October 26, 2020

Abstract—The cultures assigned to the genus *Thermoanaerobacterium* according to the partial sequencing of the 16S rRNA gene were isolated on CM3 and GS2 media at 55°C from two laboratory methanogenic thermophilic cellulolytic microbial communities producing biogas from various paper substrates. Cellulolytic activity was shown for three isolates grown on solid and in liquid media with microcrystalline cellulose and filter paper as the only substrates. In order to compare the phylogenetic relations between these isolates and the reference strains of *T. thermosaccharolyticum* (DSM 571, M0795, and TG57), it was shown that the isolates I2 and I3 belonged to one cluster, whereas the I1 isolate formed a separate branch on the phylogenetic tree.

A unique feature of isolate I2 is the formation of an insoluble yellow affinity substance (YAS), which is usually produced by certain anaerobic cellulolytic bacteria, such as *Clostridium thermocellum*; it is considered a binding component between the cellulase enzyme and its substrate, cellulose. Our results confirmed that cellulolytic *T. thermosaccharolyticum* strains predominated among cellulose-degrading bacteria within the thermophilic microbial communities converting the paper substrates into biogas. Although the type strain *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 lacks cellulolytic capacity, our results are consistent with the recent data on the ability of several *T. thermosaccharolyticum* strains to degrade cellulose.

Keywords: anaerobic microbial community, cellulose biodegradation, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ С ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА

© 2021 г. А. В. Шилова^{а, *}, А. Ю. Максимов^{а, b}, Ю. Г. Максимова^{а, b}

^аИнститут экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН — филиал Пермского федерального
исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

^bПермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: A.Shilova-IEGM@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.07.2020 г.

После доработки 31.08.2020 г.

Принята к публикации 09.11.2020 г.

Идентифицировано 58 культур алкалотолерантных бактерий, обладающих амилазной, липазной, протеазной и целлюлазной активностями, которые были выделены из содового шламохранилища на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) и на богатой среде с рН 11 без селективных субстратов. Исследовано влияние рН и концентрации хлорида натрия на рост и проявление гидролитической активности у штаммов *Pseudomonas peli*, *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* и *Microbacterium kitamiense*, обладающих липазной и амилазной активностями. Показано, что амилазы культур, выделенных на среде с рН 11 и 8, проявляют наибольшую активность при рН 10 и 6 соответственно, тогда как удельная активность внеклеточной липазы изолятов *P. peli*, выделенных при рН 8, максимальна при рН 11. На среде с рН 11 выделены *Bacillus aequororis*, *Brevibacterium pityocampae*, *Microbacterium kitamiense*, *Microcella putealis*, *Oerskovia paurometabola*, *O. enterophila*, *O. jenensis*, обладающие активностью щелочной амилазы.

Ключевые слова: содовое озеро, содовое шламохранилище, алкалофилы, алкалотолерантные микроорганизмы, гидролитическая активность, амилаза, липаза, протеаза, целлюлаза

DOI: 10.31857/S0026365621020130

Места обитания, значительно отличающиеся по одному или нескольким физико-химическим параметрам от большинства экосистем, принято называть экстремальными, а населяющие их организмы — экстремофилами. Экстремальные водные системы широко распространены в природе и отличаются крайними значениями температуры, рН, солености, повышенным давлением, высокими концентрациями токсичных веществ (Horikoshi, 1999; Grant, Sorokin, 2011). Длительное время экстремофилы находятся в центре внимания исследователей. Большой интерес вызывает изучение механизмов биохимической адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды, а также использование их биомассы и экстремоферментов в биотехнологии (Морозкина и соавт., 2010).

Содовые озера — экстремальные природные водные системы, характерной особенностью которых является высокая концентрация солей и щелочная среда. Накопление соды происходит вследствие их питания поверхностными и грунтовыми карбонатными водами, минерализован-

ными за счет выветривания силикатов (Заварзин, Жилина, 2000; Борзенко, Замана, 2008; Sorokin et al., 2015). Щелочные высокоминерализованные водные системы могут иметь и антропогенное происхождение. Это могут быть шламонакопители, места захоронения отходов, щелочные сточные воды. Работы, посвященные изучению микробиома таких искусственных щелочных биоценозов, немногочисленны (Kevbrin, 2019). Так, изучено микробное разнообразие и геохимия озера Калумет на юго-востоке Чикаго. За десятилетия захоронения промышленных отходов крупномасштабное заполнение заболоченных угодий стальным шлаком создало водоносный горизонт со значениями рН, достигающими 12.8. В этой щелочной среде были обнаружены представители *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Firmicutes* (Roadcap et al., 2006). Из золя щелочного диоксида кремния, который является важным малотоннажным химическим продуктом, были выделены штаммы факультативных алкалофилов с протеазной и амилазной активностями (Ren et al., 2014). Щелочные сточные воды также явились источником выделения алкалофиль-

ных бактерий, которые были отнесены к родам *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus*, *Escherichia*, *Mari-nococcus*, *Micrococcus*, *Natronobacterium*, *Neisseria*, *Pleisomonas*, *Pseudomonas* и *Sporosarcina* (Ali et al., 2009). Есть единичный пример исследования микробиома содового шламохранилища. Было изучено микробное разнообразие искусственной щелочной среды — отходов производства карбоната натрия, получаемого из известняка и хлорида натрия по методу Сольве в Польше, г. Яниково. В этой сильно засоленной, щелочной и бедной питательными веществами среде было обнаружено бактериальное сообщество, в котором доминировали филумы *Proteobacteria* (52.8%) и *Firmicutes* (16.6%) (Kalwasińska et al., 2017).

Нами ранее был изучен микробиом шламохранилища АО “Березниковский содовый завод” (Пермский край), на котором кальцинированная сода также производится аммиачным способом по методу Сольве (Шилова и соавт., 2018, 2020). Это техногенное образование характеризуется щелочной реакцией среды (pH до 12) и высокой степенью минерализации за счет содержания катионов натрия, калия и аммония, а также хлорид- и сульфат-анионов. В процессе извлечения аммиака образуется хлорид кальция, который составляет большую часть отходов производства. В шламонакопитель отход поступает в виде пульпы, в которой преобладает жидкая фаза (Блинов и соавт., 2003), что отличает его от содового шламохранилища г. Яниково, где эти отходы представляют собой относительно сухую массу (Kalwasińska et al., 2017).

Выделенные из экстремальных экологических ниш микроорганизмы адаптированы к неблагоприятным факторам окружающей среды и обладают большим биотехнологическим потенциалом. Ферменты, синтезируемые данными микроорганизмами, как правило, обладают повышенной активностью и стабильностью в различных неблагоприятных условиях, в том числе в щелочных условиях и при высоких концентрациях соли (Морозкина и соавт., 2010; Oren, 2010).

Гидролитические ферменты, устойчивые к экстремальным условиям, представляют большой интерес для промышленности. Так, протеазы (КФ 3.4) находят широкое применение в качестве компонентов моющих средств, растворов для контактных линз, в производстве сыра и переработке мясных продуктов (Gupta et al., 2002; Sharma et al., 2017). Амилазы (КФ 3.2.1.1) используются преимущественно в пищевой промышленности: в хлебопечении, в переработке фруктовых соков, а также в обработке бумаги и текстиля, составляя около 25% объема используемых промышленных ферментов. Щелочные амилазы сохраняют активность в диапазоне pH 8–11 и применяются в производстве моющих средств (Sarethy et al., 2011).

Целлюлазы (КФ 3.2.1.4) применяются для модификации целлюлозосодержащих отходов (Jagtap, Rao, 2005). Щелочные целлюлазы также являются компонентами моющих средств и используются в текстильной промышленности (Anish et al., 2007; Новожилов, Пошина, 2011).

Во многих биокаталитических процессах используются липазы (КФ 3.1.1). Они активны по отношению к широкому ряду субстратов, стабильны в органических растворителях, не требуют присутствия кофакторов. Липазы широко используются в биотехнологии, включая синтез биополимеров, биодизельного топлива, фармацевтических препаратов и других соединений, а также биодеструкцию техногенных загрязнителей (Безбородов, Загустина, 2014). Липазы, устойчивые в щелочной среде, в основном находят применение в производстве моющих средств (Hasan et al., 2010).

В связи с этим, целью работы было выделение из содового шламохранилища гидролитических алкалофильных и алкалотолерантных бактерий, их идентификация, а также изучение влияния pH и концентрации хлорида натрия на рост, липазную и амилазную активность наиболее перспективных штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлось содовое шламохранилище АО “Березниковский содовый завод”, расположенное на северо-западной окраине г. Березники Пермского края (59.439618 с.ш., 56.715197 в.д. — 59.427038 с.ш., 56.746573 в.д.). Пробы воды и донных отложений, а также техногенных поверхностных образований в прибрежной зоне действующего и грунта осушенного шламохранилища отбирали в сентябре 2017 г. В почвоподобных образованиях осушенного шламохранилища пробы отбирали с поверхности, а также с глубины 5 и 10 см (в точке 59.428803 с.ш., 56.729718 в.д.). Образцы хранили при температуре 4°C.

Выделение алкалофильных и алкалотолерантных бактерий проводили в двух вариантах:

1) Высев на слабощелочной среде с селективными субстратами (pH 8), создающий условия для преимущественного роста гидролитически-активных бактерий с протеазной, амилазной, целлюлазной и липазной активностями. Пробы высевали на агаризованную среду Пфеннига следующего состава (г/л): NH_4Cl — 0.3, KH_2PO_4 — 0.3, MgCl_2 — 0.3, CaCl_2 — 0.03, дрожжевой экстракт — 0.5, раствор микроэлементов по Липперту—Витману — 1 мл (Рандагуруева, Лаврентьева, 2009). В качестве субстратов вносили до концентрации 1.5%: пептон (“Sigma—Aldrich”) для выделения протеолитиков, крахмал растворимый (ЗАО “ННПЦ ГИП”, Оболенск, Россия) — для амилолитиков, микрокристаллическую целлюлозу ЛТ

(“Chemapol”, Чехословакия) — для целлюлолитиков, твин-80 (“FERAK”, Германия) — для липолитиков. Кислотность среды доводили 1 М раствором NaOH до 8 и инкубировали чашки при 30°C.

2) Высев на богатой среде с pH 11 без селективных субстратов, позволяющий выделить культуры, устойчивые к экстремальному защелачиванию среды. Для этого использовали богатую среду следующего состава (г/л): пептон — 10, глюкоза — 10, дрожжевой экстракт — 5, K_2HPO_4 — 1, Na_2CO_3 — 10, pH 11 (Atlas, 1993).

Идентификацию изолятов до вида проводили методом секвенирования фрагмента гена 16S рРНК, амплифицированного в ПЦР-реакции с использованием универсальных праймеров 27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' и 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Температурный цикл состоял из начальной денатурации при 95°C в течение 3 мин, 35 циклов амплификации (денатурация при 94°C в течение 30 с, отжиг при 54°C в течение 30 с и элонгация при 72°C в течение 60 с) и окончательно элонгация при 72°C в течение 3 мин. ПЦР-ампликоны анализировали электрофоретически в 1% агарозном геле в *трис*-боратном буфере при напряженности поля 5 В/см. Для оценки молекулярной массы фрагментов ДНК использовали маркеры 1 kb (ООО “СибЭнзим”, Новосибирск). Визуализацию полос осуществляли путем окрашивания бромистым этидием с последующим документированием с использованием системы гельдокументации BioDocAnalyze (“Biometra”, Германия). Очистку ПЦР-продукта перед секвенированием осуществляли с использованием смеси ферментов ExoSAPMix (“Thermo Fisher Scientific”, США). Секвенирующую реакцию проводили с праймером 27F и набором Big Dye Terminator v. 3.1 (“Thermo Fisher Scientific”, США), в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили на приборе Genetic Analyzer 3500xl (“Applied Biosystems”, США). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с использованием онлайн-сервиса EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

Для определения липолитической активности изолятов, выращенных на селективной среде с твин-80, проводили биохимическую реакцию с *p*-нитрофениллауратом, который под действием липазы расщеплялся с образованием окрашенного продукта *p*-нитрофенола (Margesin et al., 2002). Активность липазы определяли по приросту оптической плотности среды при λ 405 нм, измеренной на спектрофотометре Ultraspec 3000 (“GE Healthcare”, США).

Активность амилазы оценивали с помощью коммерческого набора реактивов для определения

амилазы Альфа-Амилаза-Ольвекс (ООО “Ольвекс Диагностикум”, Россия). Реакция основана на гидролизе синтетического субстрата этилиден-*p*-нитрофенилмальтогептазида с образованием нитрофенилмальтозидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению α -глюкозидазой до глюкозы и окрашенного продукта *p*-нитрофенола. Активность фермента определяли по изменению оптической плотности среды при λ 405 нм на планшетном ридере Infinite M1000 (“Tecan”, Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 мин.

Измерение целлюлолитической активности культур основано на колориметрическом определении редуцирующих сахаров, выделившихся после 24-часовой инкубации образцов с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Концентрацию глюкозы определяли с помощью коммерческого набора реактивов для определения глюкозы Глюкоза-8-Ольвекс (ООО “Ольвекс Диагностикум”, Россия). Интенсивность окраски определяли фотометрически на планшетном ридере Infinity M1000 (“Tecan”, Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 мин при λ 500 нм. Для качественного определения целлюлолитической активности использовали способность красителя конго красного образовывать комплекс с целлюлозой. Культуры высевали штрихом на чашки с минимальной средой следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 1.0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 3.7, NaCl — 0.5, раствор микроэлементов по Липперту—Витману — 1 мл и КМЦ в качестве субстрата и инкубировали в термостате при 30°C, после чего окрашивали среду 1% конго красным, выдерживали 15 мин и смывали 1 М раствором NaCl. Целлюлолитическую активность оценивали по зоне просветления вокруг штриха.

Протеазную активность оценивали по ширине зоны лизиса казеината натрия (“Sigma—Aldrich”, Германия) вокруг штриха.

Для оценки влияния концентрации хлорида натрия и pH на рост и активность наиболее перспективных изолятов варьировали pH среды Пфеннига, содержащей соответствующий источник углерода, в диапазоне от 6 до 11. Добавляли NaCl до концентрации 0.5, 5, 50, 100, 200 г/л; 4 мл среды инокулировали 50 мкл культуры ($OP_{540} = 1.0$). О росте бактерий судили по увеличению биомассы (мг/мл), которую определяли гравиметрически. Для этого центрифугировали суспензию клеток, полученный осадок высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 50°C и взвешивали на аналитических весах. Выживаемость бактерий оценивали методом КОЕ при высеве из десятикратных разведений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация изолятов. Несмотря на то, что щелочные высокоминерализованные среды антропогенного происхождения бедны питательными субстратами, скрининг образцов грунта, осадков и воды содового шламохранилища г. Березники на наличие бактериальных культур с активностью амилазы, липазы, протеазы и целлюлазы позволил выделить и идентифицировать культуры алкало-толерантных умеренно галофильных гидролитических бактерий (табл. 1, 2). Как отмечено ранее, для поиска бактериальных культур использовали два подхода: выделение на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) и на богатой среде с рН 11 без селективных субстратов, так как объединение нескольких лимитирующих факторов при выделении чистых культур значительно сужает исходный материал для скрининга ферментативных активностей.

Таким образом, проведенные исследования в содовом шламохранилище г. Березники позволили выделить и идентифицировать гидролитические бактерии филумов *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*.

В условиях умеренно-щелочной среды выделены алкалотолерантные микроорганизмы. Среди культур, изолированных из материала старого содового шламонакопителя, значительную часть составляли протеобактерии. Так, на средах с твин-80 и пептоном преобладали представители класса *Alphaproteobacteria* — главным образом *Ensifer morelensis*; *Gammaproteobacteria* — виды рода *Pseudoxanthomonas*; а также класса *Bacilli* (*Firmicutes*). На среде с крахмалом наблюдалось большее таксономическое разнообразие изолятов: были выделены культуры *Sphingopyxis panaciterrae* и *Ensifer morelensis*, относящиеся к классу *Alphaproteobacteria*; *Pseudomonas peli* (*Gammaproteobacteria*); *Microcella putealis* и *Arthrobacter ginsengisoli* (*Actinobacteria*); *Bacillus cereus* (*Firmicutes*, *Bacilli*) и *Pedobacter quisquiliarum* (*Bacteroidetes*, *Sphingobacteriia*).

На среде с целлюлозой, являющейся наиболее сложно метаболизируемым субстратом из используемых, выделены культуры *Lysobacter prati* (*Gammaproteobacteria*); *Paenarthrobacter aurescens* (*Actinobacteria*, порядок *Micrococcales*); *Metabacillus indicus* (*Firmicutes*, класс *Bacilli*).

Из образцов с территории действующего шламохранилища были выделены преимущественно культуры актинобактерий, порядок *Micrococcales* (представители родов *Actinotalea*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Microbacterium*, *Microcella*, *Micrococcus*, *Paenarthrobacter*), а также виды рода *Bacillus*.

При выделении на богатой среде при рН 11 не обнаружено существенных отличий по составу высеваемых микроорганизмов между материалом действующей и старой карты шламонакопителя.

Большую часть изолятов составляли представители актинобактерий. В том числе выделены виды рода *Oerskovia* (*Actinobacteria*; *Micrococcales*), а также бациллы *B. aequororis*, *B. halmapalus*, *B. zhangzhouensis*, которые не выделялись на средах с более низким рН и являются алкалофилами.

У чистых культур, выделенных на твин-80, целлюлозе, пептоне и крахмале в качестве источника углерода, определяли соответствующую гидролитическую активность. Также проводили скрининг на наличие гидролитических активностей у культур, выделенных на богатой среде с рН 11.

Целлюлазная активность изолятов. Изученные образцы характеризовались высоким содержанием целлюлозолитических бактерий. Их максимальная численность была отмечена в грунте старого содового озера (рН 8), отобранном с глубины 5 см — 1.27×10^9 КОЕ/г. Образцы грунта прибрежной зоны действующего шламохранилища (рН 8), содержащие ризосферу растений, также характеризовались высоким количеством микроорганизмов, утилизирующих полисахариды (до 8.4×10^8 КОЕ/г). Очевидно, что их обилие связано с наличием в среде полисахаридов растительного происхождения.

На агаризованной среде Пфеннига с целлюлозой как источником углерода было выделено 11 изолятов. Первоначально проводили качественную оценку целлюлазной активности выделенных культур. Максимальная зона лизиса отмечена у изолятов 11-Ц (9 мм) и 6-Ц (10 мм). В результате секвенирования генов 16S рПНК штамм 11-Ц идентифицирован как *Microbacterium pygmaeum*, а штамм 6-Ц как *Paenarthrobacter aurescens* (табл. 1).

Был проведен скрининг изолятов, выделенных на щелочной среде с рН 11, на наличие целлюлозолитической активности. Максимальная активность целлюлазы (размер зоны просветления 8 мм) была обнаружена у изолята 13-ДБ, идентифицированного как *Oerskovia enterophila* (табл. 2). Значительная зона лизиса (6 мм) была отмечена у изолятов 3-ДБ и 10-ДБ, идентифицированных как *O. paurometabola* и *O. jenensis* соответственно.

Определяли активность целлюлазы в клеточной биомассе и в культуральной жидкости наиболее активных изолятов (табл. 3). В супернатанте максимальная целлюлозолитическая активность (0.49 ммоль/(л сут)) выявлена у изолята 11-Ц. Целлюлазная активность, достигающая 0.47 ммоль/(л сут), также была отмечена у образцов, выделенных из грунта старой карты содового шламохранилища. Максимальная активность целлюлазы (0.17 ммоль/(л сут)), ассоциированной с клеточной биомассой, была выявлена у изолята 8-Ц, идентифицированного как *Metabacillus indicus*.

Амилазная активность изолятов. При скрининге изолятов, выделенных на среде с крахмалом как единственным источником углерода, у всех

Таблица 1. Идентификация изолятов гидролитических бактерий, выделенных на крахмале, пептоне, твин-80 и целлюлозе в качестве единственного источника углерода

Изолят	Субстрат	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных EzBioCloud	Сходство генов 16S рРНК, %	Количество прочтенных нуклеотидов	Идентификационный номер последовательности в GenBank
Старая карта содового шламонакопителя					
8-К	Крахмал	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i> , Gsoil124 ^T AB245353	99.23	783	MT860696
9-К		<i>Pedobacter quisquiliarum</i> , C62-2 ^T KU973598	99.75	808	MT860697
14-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99.65	851	MT860695
15-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99.65	851	MT887618
21-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	726	MT860698
24-К		<i>Bacillus cereus</i> , ATCC14579 ^T AE016877	100	879	MT860699
26-К		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	99.88	872	MT860700
29-К		<i>Arthrobacter ginsengisoli</i> , DCY81 ^T KF212463	99.75	797	MT860701
1-Ц	Целлюлоза	<i>Lysobacter prati</i> , SYSU H10001 ^T MN181427	99.71	802	MT875267
6-Ц		<i>Paenarthrobacter aurescens</i> , NBRC 12136 ^T BJMD01000050	99.36	594	MT875275
8-Ц		<i>Metabacillus indicus</i> , LMG 22858 ^T JGVU01000003	100	693	MT875282
3-Т	Твин-80	<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99.17	855	MT860703
4-Т		<i>Sphingopyxis chilensis</i> , S37 ^T AF367204	99.47	1321	MT860704
5-Т		<i>Bosea lathyri</i> , DSM 26656 ^T jgi.1058926	99.75	809	MT860706
6-Т		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	99.62	795	MT860707
10-Т		<i>Exiguobacterium undae</i> , DSM 14481 ^T JHZV01000003	100	842	MT860708
11-Т		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	99.76	1264	MT860709
13-Т		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	99.63	810	MT860710
14-Т		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99.17	855	MT887617
15-Т		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	100	885	MT860712
16-Т		<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> , AMX 26B ^T AF273082	99.88	843	MT860715
17-Т		<i>Pseudoxanthomonas putridarboris</i> , WD12 ^T GU908487	98.82	847	MT860720
5-П	Пептон	<i>Exiguobacterium undae</i> , DSM14481 ^T JHZV01000003	100	729	MT872007
7-П		<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> , AMX 26B ^T AF273082	99.88	841	MT872010
12-П		<i>Bacillus aquimaris</i> , TF-12 ^T AF483625	99.27	829	MT875305
14-П		<i>Paenarthrobacter aurescens</i> , NBRC 12136 ^T BJMD01000050	92.42	729	MT872020
15-П		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	100	876	MT872021

Таблица 1. Окончание

Изолят	Субстрат	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных EzBioCloud	Сходство генов 16S рРНК, %	Количество прочтенных нуклеотидов	Идентификационный номер последовательности в GenBank
Действующее содовое шламохранилище					
4-К	Крахмал	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i> , SK 55 ^T DQ333897	99.29	841	MT872022
5-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	910	MT872023
6-К		<i>Actinotalea fermentans</i> , DSM 3133 ^T AXCX01000029	98.86	875	MT872026
7-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	831	MT872027
10-К		<i>Microbacterium oxydans</i> , DSM 20578 ^T Y17227	100	790	MT872028
13-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99.40	671	MT872055
19-К		<i>Bacillus vietnamensis</i> , 15-1 ^T AB099708	99.54	879	MT872057
25-К		<i>Bacillus aquimaris</i> , TF-12 ^T AF483625	98.69	768	MT872059
27-К		<i>Paenarthrobacter nitroquajacolicus</i> , G2-1 ^T AJ512504	100	876	MT872058
28-К		<i>Bacillus toyonensis</i> , BCT-7112 ^T CP006863	100	867	MT875308
11-Ц	Целлюлоза	<i>Microbacterium pygmaeum</i> , DSM 23142 ^T LT6296692	99.76	821	MT872064
8-Т	Твин-80	<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12 ^T AF483625	99.88	814	MT875310
9-Т		<i>Metabacillus litoralis</i> , SW-211 ^T AY608605	100	799	MT875314
12-Т		<i>Citricoccus zhacaiensis</i> , FS24 ^T EU305672	99.17	844	MT872066
1-П	Пептон	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , DSM 7 ^T FN597644	99.78	903	MT872067
2-П		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , DSM 7 ^T FN597644	100	838	MT872068
3-П		<i>Dietzia maris</i> , DSM 43672 ^T X79290	100	719	MT872069
6-П		<i>Kocuria polaris</i> , CMS 76or ^T JSUH01000031	99.76	835	MT872071
8-П		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	858	MT872070
9-П		<i>Arthrobacter halodurans</i> , JSM078085 ^T EU583729	99.86	727	MT872072
11-П		<i>Micrococcus luteus</i> , NCTC 2665 ^T CP001628	100	788	MT875311

изученных образцов была определена амилолитическая активность. Численность микроорганизмов, утилизирующих крахмал, была максимальной в образцах грунта старой карты содового шламохранилища с глубины 5 см (рН 8) и достигала 3.31×10^9 КОЕ/г. Также значительное количество бактерий отмечено в образцах ризосферы растений из грунта прибрежной части действующего шламохранилища (рН 8).

Наибольшая активность амилазы была отмечена в образцах культуральной жидкости

(табл. 4). Максимальная активность, равная 30.32 мкмоль/(л мин), определена у изолята *Ensifer morelensis* 26-К. Наибольшая амилолитическая активность (20.03 мкмоль/(л мин)), ассоциированная с клетками, установлена у культуры *Paenisporosarcina quisquiliarum*.

Высокую амилазную активность, как внеклеточную (14.7 мкмоль/(л мин)), так и ассоциированную с клетками (8.65 мкмоль/(л мин)), проявил штамм *Paenarthrobacter nitroquajacolicus*. Рост данного изолята наблюдали при рН 6–10 и 0.5–50 г/л NaCl.

Таблица 2. Идентификация изолятов гидролитических бактерий, выделенных на богатой среде с pH 11

Изолят	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных EzBioCloud	Сходство генов 16S рРНК, %	Количество прочтенных нуклеотидов	Идентификационный номер последовательности в GenBank
Старая карта содового шламонакопителя				
3-ДБ	<i>Oerskovia paurometabola</i> , DSM14281 ^T AJ314821	99.86	748	MT872073
4-ДБ	<i>Brevibacterium pityocampae</i> , DSM21720 ^T EU484189	100	754	MT872074
5-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i> , M-8 ^T KC686697	99.87	758	MT875306
12-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i> , M-8 ^T KC686697	99.76	833	MT875307
13-ДБ	<i>Oerskovia enterophila</i> , DSM 43852 ^T MAQA01000098	100	845	MT872075
Действующее содовое шламохранилище				
7-ДБ	<i>Bacillus halmapalus</i> , DSM 8723 ^T KV917375	99.75	813	MT872080
8-ДБ	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> , DW5-4 ^T JOTP01000061	98.73	709	MT872079
9-ДБ	<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	825	MT872081
10-ДБ	<i>Oerskovia jenensis</i> , DSM46000 ^T AJ314848	100	697	MT872082
16-ДБ	<i>Microbacterium kitamiense</i> , Kitami C2 ^T AB013919	100	802	MT872083

Таблица 3. Целлюлозолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с целлюлозой

Изолят	Организм	Целлюлозолитическая активность	
		супернатант, ммоль/(л сут)/биомасса, мг/мл	биомасса, ммоль/(мг сут)
1-Ц	<i>Lysobacter prati</i>	0.47/6.7	0.17
6-Ц	<i>Paenarthrobacter aureus</i>	0.41/8.9	0.10
8-Ц	<i>Metabacillus indicus</i>	0.41/7.3	0.17
11-Ц	<i>Microbacterium pygmaeum</i>	0.49/13.8	0.07

Максимальное количество жизнеспособных клеток содержала культура, выращенная с 5 г/л NaCl в среде при pH 10. Наибольшая активность амилазы отмечена при pH 6 и 50 г/л NaCl. Данный изолят может быть отнесен к экстремотолерантным микроорганизмам, т.к. была показана его способность к росту на среде с высокими pH и концентрацией соли, но оптимум роста был приближен к нормальным физиологическим условиям.

Изоляты, выделенные на щелочной среде (pH 11), также были исследованы на амилазную активность (табл. 5). Максимальная активность внеклеточной амилазы, отмеченная у изолята 16-ДБ, идентифицированного как *Microbacterium kitamiense*, при pH 8 достигала 23.15 ммоль/(л мин). Диапазон роста данного изолята находился в пределах pH 7–11 и 0.5–100 г/л NaCl. Максимальное

количество жизнеспособных клеток и наибольшая активность амилазы (48.21 ммоль/(л мин)) отмечены в культуре, выращенной при 5 г/л NaCl и pH 10.

Культуры *Bacillus aequororis* и *Oerskovia jenensis* проявили высокую активность амилазы, ассоциированной с клетками, которая достигала 11.8 ммоль/(мг мин).

Липазная активность изолятов. У бактериальных культур, выделенных на среде с твин-80, исследована липолитическая активность культуральной жидкости и биомассы (табл. 6). Из всех изученных образцов шламохранилища выделены изоляты, обладающие липолитической активностью. Максимальная численность микроорганизмов, достигающая 5.7×10^9 КОЕ/г, установлена в образцах техногенных поверхностных образова-

Таблица 4. Амилолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с крахмалом

Изолят	Организм	Амилолитическая активность	
		супернатант, мкмоль/(л мин)/биомасса, мг/мл	биомасса, мкмоль/(мг мин)
3-К	<i>Ensifer morelensis</i>	14.71/5.4	4.33
4-К	<i>Paenisporsarcina quisquiliarum</i>	14.83/3.7	20.03
5-К	<i>Micricella putealis</i>	11.76/3.9	14.36
6-К	<i>Actinotalea fermentans</i>	10.98/10.3	4.51
7-К	<i>Micricella putealis</i>	11.05/4.7	15.94
8-К	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i>	16.10/6.1	4.40
9-К	<i>Pedobacter quisquiliarum</i>	17.38/5.2	12.19
10-К	<i>Arthrobacter agilis</i>	16.11/5.8	2.36
13-К	<i>Pseudomonas peli</i>	10.05/4.5	9.96
14-К	<i>Pseudomonas peli</i>	10.21/5.1	11.88
19-К	<i>Bacillus vietnamensis</i>	10.77/7.5	3.93
21-К	<i>Micricella putealis</i>	13.19/7.5	3.06
24-К	<i>Bacillus cereus</i>	10.58/10.8	2.21
25-К	<i>Bacillus aquimaris</i>	10.37/7.1	4.91
26-К	<i>Ensifer morelensis</i>	30.32/7.6	11.81
27-К	<i>Paenarthrobacter nitroquajacolicus</i>	14.71/3.7	8.65
28-К	<i>Bacillus toyonensis</i>	10.23/10.6	11.34
29-К	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>	14.91/7.1	10.55

Таблица 5. Активность амилазы и липазы штаммов, выделенных на богатой среде с pH 11

Изолят	Организм	Амилолитическая активность		Липолитическая активность	
		супернатант, мкмоль/(л мин)/ биомасса, мг/мл	биомасса, мкмоль/(мг мин)	супернатант, мкмоль/(л мин)/ биомасса, мг/мл	биомасса, мкмоль/(мг мин)
3-ДБ	<i>Oerskovia paurometabola</i>	18.91/16.5	2.96	1.15/3.7	2.37
4-ДБ	<i>Brevibacterium pityocampae</i>	22.06/5.5	8.67	1.20/7.0	1.17
5-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i>	20.69/5.8	11.80	0.95/4.6	1.85
9-ДБ	<i>Microcella putealis</i>	19.52/20.1	2.69	1.45/4.4	1.50
10-ДБ	<i>Oerskovia jenensis</i>	20.05/6.7	11.11	1.16/5.7	1.68
12-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i>	19.56/6.9	7.93	1.09/4.3	1.97
13-ДБ	<i>Oerskovia enterophila</i>	18.92/8.4	7.23	1.44/8.0	0.88
16-ДБ	<i>Microbacterium kitamiense</i>	23.15/12.1	3.95	1.46/3.6	2.62

ний прибрежной зоны действующего шламохранилища. Отмечена липазная активность в культуральной жидкости 6-ти изолятов. Наибольшую активность проявил изолят, идентифицированный как *Pseudomonas peli*. Активность липазы, связанной с клетками, проявили 17 бактериальных культур. Высокая липолитическая активность отмечена у

штаммов *P. peli*, а также *Pseudoxanthomonas mexicana* и *Pseudoxanthomonas putridarboris*.

Изучено влияние pH и концентрации NaCl на рост наиболее перспективного изолята *P. peli*, проявившего активность внеклеточной и ассоциированной с клетками липазы. Было выявлено, что изолят был способен к росту при pH 7–10 и

Таблица 6. Липолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с твин-80

Изолят	Организм	Липолитическая активность	
		супернатант, мкмоль/(л мин)/ биомасса, мг/мл	биомасса, мкмоль/(мг мин)
3-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0.83/1.9	2.97
4-Т	<i>Sphingopyxis chelensis</i>	—	0.19
5-Т	<i>Bosea lathyri</i>	—	0.18
8-Т	<i>Bacillus aquimaris</i>	—	0.12
9-Т	<i>Metabacillus litoralis</i>	—	0.13
10-Т	<i>Exiguobacterium undae</i>	—	0.14
11-Т	<i>Ensifer morelensis</i>	—	0.18
12-Т	<i>Citricoccus zhacaeasis</i>	—	0.18
13-Т	<i>Ensifer morelensis</i>	0.34/3.4	0.33
14-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0.78/4.5	1.36
15-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0.74/3.2	2.24
16-Т	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	0.25/2.3	0.54
17-Т	<i>Pseudoxanthomonas putridae</i>	—	0.41

0.5–50 г/л NaCl. Максимальное количество жизнеспособных микроорганизмов (1.2×10^6 КОЕ/г) содержала культура, выращенная на среде с 5 г/л NaCl и pH 7. Таким образом, выделенный штамм является алкалотолерантным и галотолерантным. Активность внеклеточной липазы возрастала с увеличением концентрации хлорида натрия и pH. Максимальная активность (12.59 мкмоль/(лмин)) отмечена при 100 г/л NaCl и pH 11. Наименьшую активность внеклеточный фермент проявил при pH 6.

Скрининг изолятов, выделенных на среде с пептоном, глюкозой и дрожжевым экстрактом (pH 11), показал, что все культуры обладают липолитической активностью (табл. 5). Штамм 16-ДБ, идентифицированный как *Microbacterium kitamiense*, обладал наибольшей активностью липазы, ассоциированной как с биомассой клеток (2.62 мкмоль/(мг мин)), так и с супернатантом (1.46 мкмоль/(л мин)). Как было отмечено выше, данный штамм также проявил максимальную амилолитическую активность.

Протеазная активность изолятов. Для выявления протеолитической активности бактерии высевали штрихом на агаризованную среду с казеином натрия и оценивали результаты, измеряя зону просветления, которая образуется при расщеплении казеина. Зона лизиса от края штриха для разных изолятов составляла от 1 до 12 мм. При скрининге изолятов, ранее выделенных на среде с пептоном, у всех изученных образцов была определена протеолитическая активность. Наибольшая активность (зона лизиса 12 мм) отмечена у изолята *Arthrobacter halodurans*. Также протеазную активность выявили у культур *Micrococcus luteus* (10 мм),

Bacillus amyloliquefaciens (9 мм) и *Microcella putealis* (7 мм).

Культуры, выделенные и выращенные при pH 11, были исследованы на протеолитическую активность. Наибольшая активность протеазы (зона просветления 15 мм) установлена у *Bacillus halmapalus*, выделенного из грунта прибрежной части действующего шламохранилища. Изолят *Oerskovia jenensis* из грунта старого содового озера с глубины 5 см проявил высокую протеолитическую активность (зона просветления 10 мм). Данный изолят также характеризуется высокой активностью целлюлазы.

Таким образом, из образцов грунта, осадков и воды содового шламохранилища г. Березники на среде с селективными субстратами при pH 8 и на богатой среде с pH 11 выделены культуры алкалотолерантных и алкалофильных умеренно галофильных гидролитических бактерий, обладающих активностью амилазы, липазы, протеазы и целлюлазы. Амилазная активность культур, изолированных на среде при pH 11, была сопоставима с таковой изолятов, выделенных на селективных средах. Однако pH-зависимость ферментов этих изолятов различалась. Наибольшую активность амилазы у культур, полученных на среде с pH 11 и 8, отмечали при pH 10 и 6 соответственно. В то же время, удельная активность внеклеточной липазы изолятов *P. peli*, выделенных при pH 8, была наибольшей при pH 11. Этот факт можно объяснить тем, что большинство известных амилаз наиболее активны в нейтральной и кислой среде (Mc Tigue et al., 1995; Febriani et al., 2019), поэтому

для поиска фермента с максимумом активности в щелочной области следует вести выделение культур в экстремально щелочных условиях. Липазы из большинства источников, в том числе липазы псевдомонад (Rios et al., 2018), более активны в щелочной среде, в результате чего для выделения из экстремальных биотопов культур со щелочными липазами может быть использована среда, близкая к нейтральной.

Выделение бактериальных культур, обладающих щелочной амилазой, представляет определенные сложности. Так, из золя щелочного кремнезема, подверженного процессам гниения, было выделено лишь 2 изолята с амилазной активностью — *Acinetobacter* sp. и *Bacillus thuringiensis*, но эта активность была невысокой (Ren et al., 2014). Ранее сообщалось о выделении щелочных амилаз из клеток алкалофильных представителей рода *Bacillus* (Horikoshi, 1999; Saxena et al., 2007; Kubrak et al., 2010). Нами на среде с pH 11 были выделены изоляты *Bacillus aequororisi*, а также виды, о которых нет упоминания как о продуцентах щелочной амилазы: *Brevibacterium ptyocampae*, *Microbacterium kitamiense*, *Microcella putealis*, *Oerskovia paurometabola*, *O. enterophila*, *O. jenensis*.

Таким образом, было показано, что в содовых шламонакопителях развиваются гидролитические бактерии, адаптированные к экстремальным условиям среды. Скрининг гидролитической активности бактериальных изолятов из искусственной щелочной среды позволил выявить наиболее перспективные штаммы, обладающие как внеклеточными, так и связанными с клетками активностями амилазы (*Ensifer morelensis*, 30.32 мкмоль/(л мин); *Paenisporsarcina quisquiliarum*, 20.03 мкмоль/(л мин); *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* 14.7 мкмоль/(л мин) и 8.65 мкмоль/(л мин)), липазы (*Pseudomonas peli*, 0.83 мкмоль/(л мин) и 2.97 мкмоль/(л мин)), протеазы (*Arthrobacter halodurans*, 12 мм; *Micrococcus luteus*, 10 мм) и целлюлазы (*Microbacterium rugmaeum*, 0.49 ммоль/(л сут); *Lisobacter prati*, 0.47 ммоль/(л сут); *Metabacillus indicus*, 0.17 ммоль/(л сут)). Достаточно высокая активность гидролитических ферментов у многих изолятов, выделенных из содового шламохранилища, вероятно, связана с дефицитом органического субстрата. Известно, что повышенная продукция ферментов, осуществляющих гидролиз органических полимеров и других сложных субстратов, в условиях лимитирования по источнику углерода дает экологические преимущества микроорганизмам-продуцентам. При дальнейшей селекции выделенные изоляты будут представлять интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых в щелочной среде с повышенной минерализацией.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90103.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Безбородов А.М., Загустина Н.А. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. С. 347–373.
- Bezborodov A.M., Zagustina N.A. Lipases in catalytic reactions of organic chemistry // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. P. 313–337.
- Блинов С.М., Максимович Н.Г., Найданова Н.Ф., Шлыков В.Г., Потапов С.С. Минералогические основы утилизации отходов ОАО “Березниковский содовый завод” // Минералогия техногенеза. 2003. Т. 4. С. 51–55.
- Борзенко С.В., Замана Л.В. Сульфатредукция как фактор формирования содовых вод озера Доронинское (Восточное Забайкалье) // Вестник Томского гос. ун-та. 2008. № 312. С. 188–193.
- Заварзин Г.А., Жилина Т.Н. Содовые озера — природная модель древней биосферы континента // Природа. 2000. № 2. С. 45–55.
- Новожилов Е.В., Пошина Д.Н. Биотехнологии в производстве целлюлозы для химической переработки (обзор) // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 15–32.
- Рандагуруева А.А., Лаврентьева Е.В. Внеклеточная протеазная активность в природных образцах термальных источников Прибайкалья // Известия Иркутского гос. ун-та. Сер. Науки о Земле. 2009. Т. 2. № 2. С. 162–166.
- Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Метагеномный анализ родового состава бактериальной флоры грунта, воды и осадков нового и старого шламохранилища ОАО “Сода” (г. Березники, Пермский край) // Биомика. 2018. Т. 10. № 1. С. 24–27.
- Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО “Березниковский содовый завод” // Вода и экология: проблемы и решения. 2020. № 1(81). С. 81–94.
- Ali S.S., Habib I., Riaz T. Screening and characterization of alkaliphilic bacteria from industrial effluents // Punjab Univ. J. Zool. 2009. V. 24. P. 49–60.
- Anish R., Rahman M.S., Rao M. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims // Biotechnol. Bioeng. 2007. V. 96. P. 48–56.
- Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media / Ed. Parks L.C. USA: CRC, 1993. 1079 p.

- Febriani, Rayyana, Ulya M., Oesman F., Akhmaloka, Iqbal-syah T.M. Low molecular weight alkaline thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. nov. // Heliyon. 2019. V. 5. e02171.
- Grant W.D., Sorokin D.Yu. Distribution and diversity of soda lake alkaliphiles // Extremophiles Handbook / Eds. Horikoshi K., Antranikian G., Bull A., Robb F., Stetler K. Springer-Verlag, Tokyo, 2011. P. 27–54.
- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 15–32.
- Hasan F., Shah A.A., Javed S., Hameed A. Enzymes used in detergents: lipases // Afr. J. Biotechnol. 2010. V. 9. P. 4836–4844.
- Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. V. 63. P. 735–750.
- Jagtap S., Rao M. Purification and properties of a low molecular weight 1,4- β -D-glucan glucohydrolase having one active site for carboxymethyl cellulose and xylan from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 329. P. 111–116.
- Kalwasińska A., Felföldi T., Szab A.J., Deja Sikora E., Koso-bucki P., Walczak M. Microbial communities associated with the anthropogenic, highly alkaline environment of a saline soda lime // Ant. van Leeuwenhoek. 2017. V. 110. P. 945–962.
- Kevbrin V.V. Isolation and cultivation of alkaliphiles // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology / Eds. Mammo G., Mattiasson B. Springer, Cham, 2019. V. 172. P. 53–84.
- Kubrak O.I., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. Production and properties of α -amylase from *Bacillus* sp. BKL20 // Can. J. Microbiol. 2010. V. 56. P. 279–288.
- Margesin R., Feller G., Hämmerle M., Stegner U., Schinner F. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil // Biotechnol. Lett. 2002. V. 24. P. 27–33.
- Mc Tighe M.A., Kelly C.T., Doyle E.M., Fogarty W.M. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370 // Enzyme Microb. Technol. 1995. V. 17. P. 570–573.
- Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms // Environ. Technol. 2010. V. 31. P. 825–834.
- Ren L., Han Y., Yang S., Tan X., Wang J., Zhao X., Fan J., Dong T., Zhou Z. Isolation, identification and primary application of bacteria from putrid alkaline silica sol // Front. Chem. Sci. Eng. 2014. V. 8. P. 330–339.
- Rios N.S., Pinheiro B.B., Pinheiro M.P., Bezerra R.M., Sousa dos Santos J.C., Gonçalves L.R.B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications // Process Biochem. 2018. V. 75. P. 99–120.
- Roadcap G.S., Sanford R.A., Jin Q., Pardin J.R., Bethke C.M. Extremely alkaline (pH > 12) ground water hosts diverse microbial community // Ground Water. 2006. V. 44. P. 511–517.
- Sarethy I.P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S.K., Gupta V., Gupta S. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 38. P. 769–790.
- Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5 // Biores. Technol. 2007. V. 98. P. 260–265.
- Sharma K.M., Kumar R., Panwar S., Kuma A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2017. V. 15. P. 115–126.
- Sorokin D.Y., Banciu H.L., Muyzer G. Functional microbiology of soda lakes // Curr. Opin. Microbiol. 2015. V. 25. P. 88–96.

Isolation and Identification of Alkalitolerant Bacteria with Hydrolytic Activity from Soda Storage

A. V. Shilova^{1,*}, A. Yu. Maksimov^{1,2}, and Yu. G. Maksimova^{1,2}

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Urals Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

²Perm State National Research University, Perm, 614990 Russia

*e-mail: A.Shilova-IEGM@yandex.ru

Received July 8, 2020; revised August 31, 2020; accepted November 9, 2020

Abstract—From a technogenic soda sludge storage, 58 cultures of alkalotolerant bacteria with amylase, lipase, protease, and cellulase activities were isolated and identified using a medium with selective substrates in the absence of extreme conditions (pH 8) and a rich medium with pH 11 without selective substrates. The effect of pH and NaCl concentration on the growth and hydrolytic activity of *Pseudomonas peli*, *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* and *Microbacterium kitamiense* with lipase and amylase activities was studied. Amylases of the cultures isolated on media with pH 11 and 8 were shown to exhibit the highest activity at pH 10 and 6, respectively, while the specific activity of extracellular lipase of *P. peli* isolated at pH 8 reached its maximum at pH 11. On the medium with pH 11, *Bacillus aequororis*, *Brevibacterium ptyocampae*, *Microbacterium kitamiense*, *Microcella putealis*, *Oerskovia paurometabola*, *O. enterophila*, *O. jenensis* with alkaline amylase activity were isolated.

Keywords: soda lake, soda sludge storage, alkaliphiles, alkalitolerant microorganisms, hydrolytic activity, amylase, lipase, protease, cellulase

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ТРАНСФОРМАЦИЯ МИКРОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КОМПОНЕНТАХ
ПОЧВЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ РАЗНОГО ГЕНЕЗИСА (ПОЧВА, ТОРФ,
ПЕСОК) ПРИ ПРОЦЕССАХ ЗАМОРАЖИВАНИЯ–ОТТАИВАНИЯ

© 2021 г. А. М. Глушакова^{a, b}, Л. В. Лысак^a, А. В. Качалкин^{a, c}, А. Е. Иванова^{a, d}, А. Б. Умарова^a,
И. А. Абрамян^a, З. С. Ежелев^a, И. А. Максимова^{a, *}

^aМГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^bНИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

^cИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290 Россия

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

*e-mail: maximova.irina@gmail.com

Поступила в редакцию 04.08.2020 г.

После доработки 16.09.2020 г.

Принята к публикации 21.10.2020 г.

В модельном эксперименте исследована трансформация микробных комплексов культивируемых форм сапротрофных бактерий и дрожжевых грибов при процессах замораживания–оттаивания в компонентах специализированных почвенных конструкций, которые используются для решения задач городского озеленения и выращивания травянистых растений. Численность сапротрофных бактерий и дрожжевых грибов зависела как от типа субстрата, так и от изменений температуры при процессах замораживания–оттаивания. Был зафиксирован достоверный рост численности дрожжей на стадии охлаждения торфа и почвы ($A_{\text{пах}}$) до 0 и -5°C и на последующей стадии оттаивания до 0°C . В $A_{\text{пах}}$ и торфе максимальная численность дрожжей составила $5.1 \lg$ (КОЕ/г). В отличие от численности дрожжевых грибов, показатель численности сапротрофных бактерий в $A_{\text{пах}}$ и торфе характеризовался резким снижением, когда температура субстрата принимала отрицательные значения, и была максимальной при температуре 19–22 и 10°C . В $A_{\text{пах}}$ максимальная численность бактерий составила $7.5 \lg$ (КОЕ/г), в торфе – $8.0 \lg$ (КОЕ/г). В песке численность как сапротрофных бактерий, так и дрожжевых грибов не зависела от температуры и составила $5.0 \lg$ (КОЕ/г) для бактерий и $3.4 \lg$ (КОЕ/г) для дрожжевых грибов на всех этапах в циклах замораживания–оттаивания. Всего из разных компонентов почвенных конструкций было выделено 15 видов сапротрофных бактерий и 29 видов дрожжевых грибов. При максимальной температуре охлаждения в циклах до -5°C из $A_{\text{пах}}$ и из торфа удалось выделить три вида бактерий, обладающих как психрофильными свойствами (*Flavobacterium psychrophilum*), так и способных к образованию устойчивых к различным неблагоприятным воздействиям эндоспор (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*). Среди дрожжевых грибов, выделенных из $A_{\text{пах}}$ и торфа при отрицательной температуре и также обладающих психрофильными свойствами, были виды *Candida sake*, *Rhodotorula glutinis*, *Rh. mucilaginosa*, *Solicoccozyma terricola*. В песке при отрицательных температурах обнаружены бактерии, обладающие психрофильными свойствами, *Flavobacterium psychrophilum* и *Pseudomonas fluorescens*, и два вида бацилл – *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*. Только один вид дрожжевых грибов, *Debaryomyces hansenii*, способный переживать стрессовые условия в виде аскоспор, был выделен из песка при -5°C . Изучение в модельном эксперименте влияния краткосрочных перепадов температуры на динамику численности и разнообразия сообществ одноклеточных микроорганизмов в компонентах специализированных почвенных конструкций показало, что они способны “переносить” непродолжительные стрессовые перепады температуры, характерные для весенне–осеннего периода, восстанавливая численность исходных популяций после прекращения негативного воздействия. Это также говорит в пользу способности почвенных конструкций к саморазвитию в процессе функционирования, а не быстрой деградации.

Ключевые слова: конструктоземы, почва, торф, песок, замораживание–оттаивание, дрожжи, сапротрофные бактерии, азотфиксаторы, фитогормоны

DOI: 10.31857/S002636562102004X

Все процессы замораживания–оттаивания являются обычными для почв, формирующихся в зоне умеренного климата. Такие сезоннопромерзающие

почвы занимают значительные территории и подвержены негативным изменениям структурной организации. Постепенно процессы заморажива-

ния—оттаивания в естественных условиях приводят к эрозии и деградации почв (Kværnø, Øygarden, 2006). Чувствительны к этим процессам и теплофизические свойства почв, их изменение сказывается на микробной активности, условиях вегетации растений, водно-физических свойствах почвы (Морина, 2008). Считается, что процессы оттаивания ведут к увеличению скорости минерализации органического вещества почв, что также сказывается на активации микробиоты (Kuhry et al., 2006; Schuur et al., 2008).

Изменения климата, наблюдаемые в настоящее время в умеренном, самом широком по протяженности географическом поясе Северного полушария, свидетельствуют об увеличении частоты промерзания почв и их последующего оттаивания в позднеосенний, зимний и ранневесенний периоды (Оценочный доклад об изменениях климата..., 2008). По мнению климатологов, это связано в первую очередь с устойчивыми трендами увеличения зимних температур и уменьшением высоты и устойчивости снежного покрова (Venäläinen et al., 2001; Гулёв и соавт., 2008; Kim et al., 2012).

Известно, что промерзание и последующее оттаивание почв часто влекут за собой резкое усиление дыхательной активности биоты (Lopes de Gerenyu et al., 2001; Teepe et al., 2001; Kurganova et al., 2004, 2007; Teepe, Ludwig, 2004; Matzner, Borken, 2008; Курганова, Лопес де Гереню, 2015). Повышение температуры влияет на скорость биохимических реакций, ферментативную активность, влечет за собой изменение физических (растворимость газов в воде) и биологических (рост микробных популяций) факторов среды (Степанов и соавт., 1996). Быстрые перепады температур, которые происходят при замерзании и оттаивании почвы, приводят к изменениям активности эмиссии газов, вызывают гибель одних микроорганизмов, приводя к увеличению количества доступных субстратов в почве, и, как следствие, при оттаивании, к росту микробной активности (Yergeau, Kowalchuk, 2008). Следовательно, одной из причин этого считается активация роста одних микроорганизмов на питательных веществах, которые высвобождаются при разрушении неадаптированных клеток других микроорганизмов под воздействием отрицательных температур (Panikov, Dedysh, 2000). Однако есть работы, где приводятся данные об отсутствии явления активации роста микроорганизмов. В работе Копонен и соавт. (2006) было показано, что замораживание и последующее оттаивание почв в бореальной зоне не оказывают заметного влияния на структуру и функционирование микробного сообщества.

До сих пор открытыми и актуальными остаются вопросы, связанные с влиянием сезонных перепадов температуры на численность и разнообразие сообществ почвенных микроорганизмов. Прежде

всего, это касается влияния краткосрочных флуктуаций температуры на состав и функциональную активность сообщества микроорганизмов в почвах (Степанов и соавт., 1996; Larsenet al., 2002; Sulkava, Huhta, 2003; Feng et al., 2007).

В связи с этим, нами была предпринята попытка изучить в модельном эксперименте воздействие последовательных циклов замораживания—оттаивания (ЦЗО) на трансформацию микробных комплексов некоторых групп одноклеточных микроорганизмов (культивируемых сапротрофных бактерий и дрожжей) в компонентах специализированных почвенных конструкций. Такие антропогенно-глобокопреобразованные почвы (по классификации М.Н. Строгановой, 1998) в настоящее время представляют большой интерес и являются востребованными в мегаполисах в связи с решением задач озеленения, создания качественных и безопасных условий для жизни и работы людей на урбанизированных территориях. Почвенные конструкции традиционно представляют собой сочетание различных по генезису и свойствам субстратов — гумусового почвенного горизонта, торфа и песка. От правильного и долговременного функционирования таких почвенных конструкций зависит успешность формирования и поддержания в хорошем качестве зеленых участков высоко урбанизированных территорий современных мегаполисов (Умарова и соавт., 2019).

Постоянными и обязательными обитателями всех почвенных субстратов являются микроорганизмы разных таксономических и эколого-трофических групп. Их численность и таксономическое разнообразие косвенно свидетельствуют об интенсивности минерализационных процессов в почвах (Звягинцев и соавт., 2005). Они играют важную роль в круговороте веществ в природе, определяют состояние других компонентов экосистемы, в том числе обеспечивают произрастание различных видов растений (Добровольская, 2002; Добровольская и соавт., 2015). Продолжительность эксплуатационного периода конструкций в мегаполисах зависит от многих параметров. К ним относятся: интенсивность процессов аккумуляции в корнеобитаемом слое конструкций элементов питания и влаги, степень загрязненности окружающих городских почв, численность, разнообразие и соотношение различных функциональных групп микроорганизмов в урбаноземах и в специализированных почвенных конструкциях. Период функционирования конструкций, в свою очередь, отражается на их экономической рентабельности (Курбатова, 2004; Смагин и соавт., 2006; Смагин, 2012).

Цель работы — изучить в модельном эксперименте трансформацию микробных комплексов культивируемых форм сапротрофных бактерий и дрожжевых грибов в различных компонентах спе-

Таблица 1. Продолжительность отдельных этапов во время ЦЗО ($A_{\text{пах}}$, торф, песок)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$A_{\text{пах}}$		68ч36м	40ч03м		72ч24м		65ч41м	40ч12м		430ч53м
Торф	19	116ч15м	54ч22м	72	81ч12м	22	100ч14м	53ч32м	72	549ч35м
Песок		20ч21м	08ч02м		06ч15м		14ч18м	08ч02м		200ч58м

Обозначения: 1 — варианты субстратов, которыми были заполнены почвенные колонки; 2 — стартовая температура субстратов до начала первого цикла замораживания—оттаивания, °C; 3 — время промерзания до -5°C ($A_{\text{пах}}$, торф, песок) на глубине 7 см (первый цикл), часы и минуты; 4 — время оттаивания до 0°C (первый цикл), часы и минуты; 5 — время содержания колонок при 0°C , часы; 6 — время доведения содержимого колонок до комнатной температуры; 7 — стартовая температура субстратов до начала второго цикла замораживания—оттаивания, °C; 8 — время промерзания до -5°C , ($A_{\text{пах}}$, торф, песок) на глубине 7 см (второй цикл), часы и минуты; 9 — время оттаивания до 0°C (второй цикл), часы и минуты; 10 — время поддержания температуры 0°C , часы; 11 — общая продолжительность циклов замораживания—оттаивания, часы и минуты.

циализированных почвенных конструкций (пахотном почвенном горизонте, торфе, песке) в условиях стресса при процессах краткосрочного замораживания—оттаивания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исходных образцов для эксперимента были выбраны: пахотный горизонт конструкторема, торф, песок. Модельный эксперимент проводился по отработанной методике (Вайгель, 2017; Сусленкова и соавт., 2018) на 36 почвенных колонках (стеклянные трубки высотой 10 см и диаметром 15 см). Всего было создано три варианта почвенных колонок по 12 повторностей для каждого варианта:

вариант 1 — горизонт $A_{\text{пах}}$ конструкторемов 1950-х гг., который был использован при формировании Почвенного стационара МГУ. На протяжении всех лет территория подвергалась вспашке, поэтому данный горизонт продолжает иметь все морфологические признаки пахотного горизонта: серую окраску, зернисто-комковатую структуру, оптимальную плотность;

вариант 2 — торф низинный, высокой степени разложения ($>30\%$), нейтрализованный мелом (рН 5.5–6.5), производитель ООО “Селигер-торф”;

вариант 3 — песок карьерный (преобладающая фракция — мелкий песок).

Колонки на первом этапе эксперимента заполнялись с определенной задаваемой плотностью, которая соблюдалась по всей высоте почвенных колонок. Дно колонок формировалось из четырех слоев капрона. Затем колонки устанавливались на штативы лабораторные ШЛ-98. На следующем фильтрационном этапе эксперимента каждую из колонок проливали одинаковым объемом воды 1000 мл с установлением постоянной скорости фильтрации. Объем проливаемой воды был рассчитан таким образом, чтобы насытить все поровое пространство субстрата влагой. Для фиксирования скорости потока на нижней

границе почвенных колонок осуществляли сбор фильтрата, с регистрацией времени прохождения воды через колонку. Высота водного столба на верхней границе поддерживалась на постоянном уровне и составляла 1 см. После окончания фильтрации и стекания лизиметрических вод, колонки помещали в термостат и замораживали до температуры -5°C . Температуру измеряли на глубине 7 см с помощью технического жидкостного термометра ТТЖ-М с диапазоном измерения $-35\ldots-50^{\circ}\text{C}$ — 160/66 и ценой деления 0.5°C .

Стартовой точкой микробиологического анализа компонентов была температура субстратов до начала моделирования циклов замораживания—оттаивания, соответствующая комнатной температуре (19 и 22°C для первого и второго циклов соответственно). Далее отбор образцов из колонок на микробиологический анализ компонентов проводили на этапах охлаждения до 10, 5, 0°C и при замерзании до -5°C . Следующий отбор образцов производили после оттаивания колонок до 0°C и инкубирования их при нулевой температуре в течение трех суток. Затем колонки вынимали, оставляли при комнатной температуре до достижения стартовых температурных значений субстратов, проливали воду объемом 1000 мл и повторяли цикл. Всего было проведено два последовательных цикла замораживания—оттаивания колонок с компонентами почвенных конструкций. Температуру измеряли в контрольных колонках, из которых образцы не отбирали (табл. 1). Все временные интервалы промерзания—оттаивания для каждого цикла указаны в табл. 1.

Всего было проанализировано 864 образца почвенных компонентов (по 288 образцов каждого субстрата). Общая продолжительность эксперимента составила 28 сут. Каждый образец исследовался в восьми повторностях. Посевы культивировали в течение 7–10 дней.

Выделение и расчет численности (на 1 г абсолютного сухого субстрата) только культивируемых форм бактерий сапротрофного комплекса

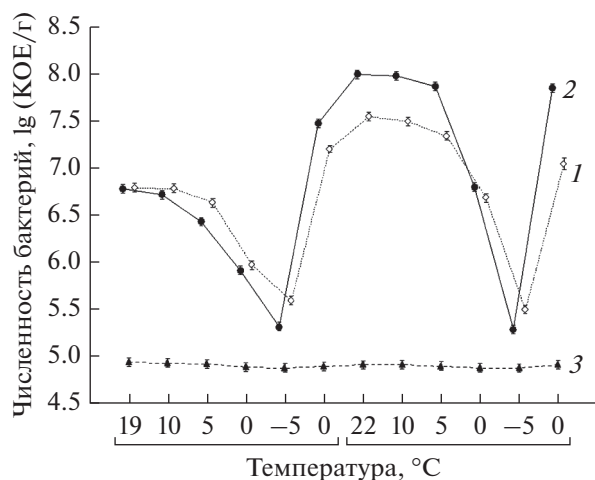


Рис. 1. Изменение численности сапротрофных бактерий в компонентах почвенных конструкций при процессах замораживания–оттаивания; показаны средние значения и ошибка среднего. Условные обозначения: 1 – $A_{\text{пах}}$; 2 – торф; 3 – песок.

проводили классическим методом посева на одну среду. Использовали агаризованную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (ГПД) состава (г/л): глюкоза – 1, пептон – 2, дрожжевой экстракт – 1, гидролизат казеина – 1, CaCO_3 – 0.5, агар-агар – 20. Эта среда позволяет выделить из почвы до 50 родов блока аэробных и факультативно-анаэробных бактерий (Звягинцев, 1991; Лысак и соавт., 2003). Посевы анализировали с микроскопированием всех выросших колоний. Схожие по макро- и микроморфологии колонии выделяли в чистую культуру для последующей генетической идентификации нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с использованием программы BLAST (Mannicharova et al., 2008). Выделение ДНК из чистых культур бактерий проводили с использованием набора PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование ПЦР-продуктов переменных участков V3–V4 гена 16S рРНК проводили по стандартному протоколу MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Kits Protocol (“ThermoFisher”) с использованием стандартных праймеров fD1/rD1 (прямой праймер (fD1): 5'-НААТНУГТGCCAG-CAGC-3' и обратный праймер (rD1): 5'-GTCRTC-CYDCCTCCTC-3') (Weisburg, 1991). Капиллярный форез проводили на генетическом анализаторе ABI Prism 3130. Для анализа полученных электрофореграмм и последовательностей нуклеотидов применяли программное обеспечение MicroSeq ID v2.0 Software и валидированную библиотеку MicroSeq ID 16S rDNA 500 Library v2.0. Анализ последовательностей гена 16S рРНК проводили в Научно-производственной компании “Синтол” (Москва). Всего было идентифицировано 612 штаммов бактерий.

Численность и таксономическое разнообразие дрожжевых грибов определяли с помощью прямого метода посева на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (ГПДА) состава (г/л): глюкоза – 20, пептон – 10, дрожжевой экстракт – 5, агар – 20) с добавлением хлорамфеникола (500 мг/л) для предотвращения роста бактерий. Видовую идентификацию дрожжевых грибов проводили на основе анализа нуклеотидной последовательности ITS региона рДНК. Выделение рДНК и постановку ПЦР проводили по ранее описанной методике (Глушакова, Качалкин, 2017). Секвенирование рДНК проводили с помощью набора реактивов Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer в ЗАО “Евроген” (Москва). Для секвенирования был использован праймер ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) (Fell, Blatt, 1999). Идентификацию дрожжей на основании полученных результатов секвенирования проводили, используя данные генбанка NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базы данных MycoID (www.mycobank.org). Всего было проанализировано 128 штаммов дрожжевых грибов.

На основании проведенной идентификации микроорганизмов рассчитывали относительное обилие таксонов. Относительное обилие каждого таксона бактерий и дрожжевых грибов (в %) определяли, рассчитывая среднее содержание (доли) каждого из них от общей численности бактерий (дрожжей) в образце. Относительное обилие в субстрате в заданных условиях вычисляли как среднее по всем проанализированным образцам.

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя пакет STATISTICA 8.0 (StatSoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность сапротрофных бактерий в $A_{\text{пах}}$ и торфе зависела как от типа субстрата, так и от изменений температуры при процессах замораживания–оттаивания (рис. 1).

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали, что численность бактерий достоверно зависит от субстрата (критерий Фишера 3454.02; $p < 0.050$) и температуры (критерий Фишера 1347.73; $p < 0.050$). В $A_{\text{пах}}$ и торфе наблюдался близкий по значениям диапазон колебаний численности сапротрофных бактерий: в $A_{\text{пах}}$ от 5.4 lg (КОЕ/г) до 7.5 lg (КОЕ/г); в торфе – от 5.5 lg (КОЕ/г) до 8.0 lg (КОЕ/г). Численность сапротрофных бактерий в $A_{\text{пах}}$ и торфе характеризовалась резким снижением, когда температура субстратов принимала отрицательные значения. Максимальные значения численности наблюдались в стартовой

точке и при охлаждении субстратов до 10°C. В песке численность сапротрофных бактерий не зависела от температуры и составляла порядка 5.0 lg (КОЕ/г) на всех этапах циклов замораживания—оттаивания. Из песка в ходе эксперимента выделено четыре вида бактерий: *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Flavobacterium psychrophilum* и *Pseudomonas fluorescens*. Вероятно, как образование эндоспор бациллами, так и метаболическая пластичность психрофильных видов, *Flavobacterium psychrophilum* и *Pseudomonas fluorescens*, позволяют им, оказавшись в неблагоприятных для роста и развития местообитаниях, таких как песок, сохраняться и не гибнуть в течение длительного периода.

Аналогичная закономерность была получена нами ранее в исследованиях образцов дерново-подзолистой почвы, подвергшихся 3-кратному замораживанию (модельный опыт). Показатели суммарной численности клеток изменялись незначительно, однако существенно уменьшалась доля интактных (живых) клеток. Метод окраски почвенной суспензии красителем LIVE/DEAD L7012 позволил определить численность и охарактеризовать физиологическое состояние бактериальных клеток в образцах почвы. При этом даже после трехкратного замораживания—оттаивания образца около 10% клеток сохраняли неповрежденную клеточную мембрану, что, видимо, связано с защитным действием почвы по отношению к населяющим ее организмам, а также с адаптивными возможностями самих бактерий. Безусловно, адаптационные механизмы зависят от вида микроорганизма, его чувствительности к перепадам температур. Примером такого механизма, который к настоящему времени достаточно хорошо изучен, является изменение активности системы метаболических ферментов или текучести клеточных мембран, ассоциированной со спектром жирных кислот (Лысак, 2010; Андрюков и соавт., 2015).

Численность дрожжевых грибов в $A_{\text{пах}}$ и торфе зависела как от типа субстрата, так и от изменений температуры при процессах замораживания—оттаивания (рис. 2).

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали, что численность дрожжевых грибов в $A_{\text{пах}}$ и торфе достоверно зависит от субстрата (критерий Фишера 3658.48; $p < 0.050$) и температуры (критерий Фишера 1016.87; $p < 0.050$). В $A_{\text{пах}}$ и торфе наблюдались синхронные колебания численности дрожжевых грибов в пределах от 4.2 lg (КОЕ/г) до 5.1 lg (КОЕ/г) в циклах замораживания—оттаивания. Рост численности дрожжей был зафиксирован на стадии охлаждения $A_{\text{пах}}$ и торфа до 0 и -5°C и на последующей стадии оттаивания до 0°C .

Общая закономерность в динамике численности дрожжевых грибов в исследованных компо-

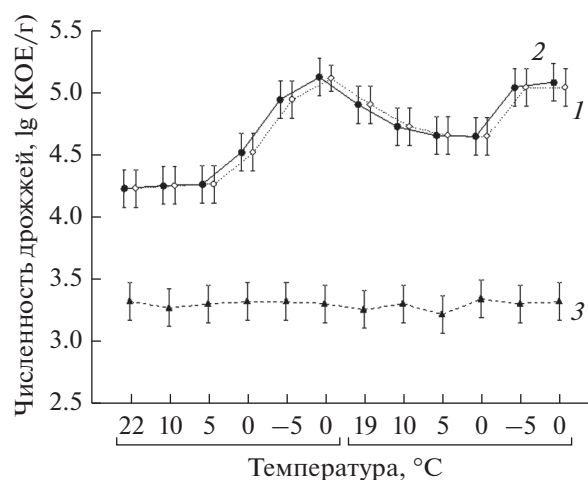


Рис. 2. Изменение численности дрожжевых грибов в ЦЗО почвенных конструкций; показаны средние значения и ошибка среднего. Условные обозначения: 1 — $A_{\text{пах}}$; 2 — торф; 3 — песок.

нентах почвенных конструкций, $A_{\text{пах}}$ и торфе, вероятно, связана со схожими чертами в таксономической структуре обоих субстратов и прежде всего присутствием видов дрожжей, штаммы которых часто обладают психрофильными свойствами (*Cystofilobasidium infirmominatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridiobolus colostri*, *Candida sake*, *Solicozyma terricola*). Рост численности дрожжей при пониженных температурах за счет психрофильных видов, возможно, связан с активацией их роста за счет питательных веществ, которые высвобождаются при разрушении неадаптированных клеток других видов микроорганизмов под воздействием отрицательных температур (Panikov, Dedysh, 2000). В песке численность дрожжевых грибов не зависела от температуры и составила порядка 3.4 lg (КОЕ/г) на всех стадиях в циклах замораживания—оттаивания. Дрожжи в песке были представлены всего двумя видами, аскомицетом *Debaryomyces hansenii* и базидиомицетом *Rhodotorula mucilaginosa*. Это эврибионтные дрожжи с широким ассимиляционным спектром. Они регулярно выделяются из самых разных местообитаний (растительные субстраты, пищевые продукты, морская вода, почва и др.) (Vital et al., 2002; Kurtzman et al., 2011). Важной экологической особенностью этих видов дрожжевых грибов является показанная ранее их устойчивость к длительному периоду высушивания и низкой активности воды, чем объясняется высокая доля этих дрожжей в таком антропогенном субстрате, как пыль жилых помещений (Глушакова и соавт., 2004, 2015). Скорее всего, отсутствие зависимости между значениями численности дрожжей *D. hansenii* и *Rh. mucilaginosa* в таком бедном субстрате как песок и температурой связано со способностью этих видов длительное время сохраняться в

неблагоприятной среде (для *D. hansenii* в том числе и за счет способности образовывать аскоспоры) в условиях недостатка питательных веществ.

Таксономическая структура комплексов сапротрофных бактерий и дрожжевых грибов. Всего из всех компонентов почвенных конструкций было выделено 15 видов сапротрофных бактерий (табл. 2). Из $A_{\text{пах}}$ было выделено 15 видов бактерий, из торфа — 10, из песка — 6.

Относительное обилие некоторых видов бактерий сильно зависело от изменений температуры при процессах замораживания—оттаивания (табл. 2). При максимальной температуре охлаждения в циклах до -5°C из $A_{\text{пах}}$ и торфа выделялись три вида бактерий, обладающие как психрофильными свойствами (*Flavobacterium psychrophilum*), так и способные к образованию устойчивых к различным неблагоприятным воздействиям эндоспор (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*).

Доля вида *Bacillus subtilis* в $A_{\text{пах}}$ при -5°C составила 7.2 и 22.1% в первом и втором циклах соответственно; в торфе — 16.4 и 8.7%. Доля *Bacillus megaterium* составила в $A_{\text{пах}}$ 4.8 и 1.9% соответственно в первом и втором циклах замораживания—оттаивания; в торфе — 4.2 и 3.6%. Доля *Flavobacterium psychrophilum* была наибольшей в $A_{\text{пах}}$ при -5°C и составила 85.7 и 73.8% в первом и втором циклах соответственно; в торфе — 72.6 и 85.6% (табл. 2). Вид *Flavobacterium psychrophilum* регулярно выделяется из почвы и пресных водоемов, особенно активно развивается при пониженных температурах (Намсараев, 2008; Наоуки, 2008). В исследованиях психрофильных бактерий показано, что холодовой шок так изменяет их физиологию, что они приобретают высокую выживаемость и более высокую скорость роста, синтезируя в ответ на охлаждение белки холодового шока (Феофилова, 2003; Воробьева, 2004). Приспособленность спорообразующих бактерий гидролитического комплекса из рода *Bacillus* к условиям низких температур ранее была показана в модельном опыте влияния температуры на структуру микробных сообществ верховых торфяников (Головченко и соавт., 2010). Отдельно хотелось отметить выявленное нами достоверное возрастание относительного обилия азотфиксирующих бактерий *Azospirillum lipoferum* (до 16.2 и 19.2% в первом и втором циклах соответственно) в $A_{\text{пах}}$ и *Beijerinckia mobilis* в $A_{\text{пах}}$ (до 11.3 и 10.9% соответственно в первом и во втором циклах) и в торфе (до 14.2 и 15.6% соответственно в первом и во втором циклах) на этапе оттаивания до 0°C (табл. 2). Влияние этих бактерий на рост растений огромно и по праву сопоставимо с обработкой некоторых почв азотными удобрениями.

Всего из почвенных субстратов было выделено 29 видов дрожжевых грибов — 9 аскомицетовых (табл. 3) и 20 базидиомицетовых (табл. 4).

Больше всего видов дрожжевых грибов — 28, было выделено из $A_{\text{пах}}$, в торфе было встречено 16 видов дрожжевых грибов, в песке удалось обнаружить только два вида дрожжей. Единственный вид дрожжей, который не был выделен нами из пахотного горизонта и встречен только в торфе — *Nadsonia starkeyi-henricii* (Cif.) Kurtzman & Robnett, это типичный, но немногочисленный обитатель торфа и влажных заболоченных почв (Kurtzman et al., 2011).

В целом, выделенный из компонентов почвенных конструкций комплекс дрожжевых грибов был представлен типичными педобионтными видами дрожжей (*Apiotrichum dulcitum*, *A. laibachii*, *A. porosum*, *Barnettozyma californica*, *Goffeauzyma gastrica*, *Saitozyma podzolica*, *Solicoccozyma terrea*, *Solicoccozyma terricola*) — 44.8%; эпифитами (*Hanseniaspora uvarum*, *Filobasidium magnum*, *F. wieringae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Papiliotrema flavescens*, *Rhodospiridiobolus colostri*) — 34.5%; и эврибионтными и оппортунистическими видами дрожжевых грибов (*Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Diutina catenulata*, *Rhodotorula mucilaginosa*) — 20.7%.

Относительное обилие некоторых видов дрожжевых грибов, выделенных из компонентов почвенных конструкций, зависело от температуры в циклах замораживания—оттаивания. Так, доля дрожжей *Cystofilobasidium infirmominiatum* возрастала в $A_{\text{пах}}$ при нулевой температуре до 6.8 и 9.1% в первом и втором циклах соответственно и при -5°C до 7.5% во втором цикле, а также в торфе при 0°C до 41.12 и 42.14% в первом и втором циклах соответственно. Этот вид дрожжей широко распространен на самых различных субстратах, но чаще встречается на листьях растений, в умеренной зоне именно в осенний период. Доля вида *Rhodotorula mucilaginosa* увеличивалась в $A_{\text{пах}}$ до 18% и до 95% в торфе при 10°C . *Rh. mucilaginosa* является эврибионтным видом, это один из самых широко распространенных видов дрожжей, но чаще всего выделяется как эпифит травянистых и древесных растений, где его относительное обилие может в отдельных образцах достигать 100%. Относительное обилие дрожжей *Rhodotorula glutinis* возрастало при отрицательной температуре в $A_{\text{пах}}$ (до 12.3 и 17.8% в первом и втором циклах соответственно и в торфе (до 8.6 и 17.0% в первом и втором циклах соответственно). Этот вид дрожжевых грибов наиболее типичен для филлосферы, однако часто выделяется и из почвы, в умеренном поясе особенно обилён в осенне-зимний период. Также при -5°C активизировался и рост аскомицетовых дрожжей *Candida sake*, доля которых выросла до 6% в $A_{\text{пах}}$ и до 66.5% в торфе в обоих циклах. В Московском регионе *C. sake* преимущественно почвенный вид, но также он регулярно встречается на болотных растениях (Чернов и соавт., 2013). Относительное обилие большинства выделенных

Таблица 2. Относительное обилие сапротрофных бактерий, выделенных из компонентов почвенных конструкций в ЦЗО

	Этапы ЦЗО	<i>Arthrobacter globiformis</i>	<i>Aquaspirillum soli</i>	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Beijerinckia mobilis</i>	<i>Cytophaga</i> sp.	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	<i>Myxococcus</i> sp.	<i>Polysphingium cellulosum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Xanthomonas campestris</i>
А _{пах}	1	4.2	8.5	—	2.2	4.0	4.1	—	14.2	26.5	14.5	—	2.8	1.5	8.3	9.2
	2	4.2	4.7	6.5	3.8	4.9	10.2	11.8	—	29.6	3.1	1.3	2.7	5.4	2.6	9.2
	3	12.4	8.6	—	4.5	7.5	—	4.7	—	47.8	—	—	3.2	6.6	4.7	—
	4	2.6	—	—	4.5	6.8	—	—	—	76.4	—	—	—	6.8	2.9	—
	5	—	—	—	4.8	7.2	—	—	—	85.7	—	—	—	2.3	—	—
	6	3.6	5.4	16.2	2.3	2.3	11.3	9.9	3.3	22.7	6.2	—	3.6	4.5	5.6	3.1
	7	4.1	9.2	7.1	3.2	4.2	5.2	12.4	8.1	33.2	0.5	—	2.4	1.7	2.1	6.6
	8	8.6	—	5.9	3.8	9.0	9.2	10.8	3.2	27.4	—	—	—	4.4	4.1	13.6
	9	5.4	—	—	5.4	6.2	—	—	2.1	70.8	—	—	—	5.5	4.6	—
	10	1.8	—	—	3.4	8.3	—	—	1.2	81.6	—	—	—	3.7	—	—
	11	—	—	—	1.9	22.1	—	—	—	73.8	—	—	—	2.2	—	—
	12	3.6	5.4	19.2	3.6	3.1	10.9	9.9	3.3	20.1	6.8	—	3.6	2.5	4.9	3.1
Торф	1	14.6	—	—	8.1	3.9	—	13.1	—	38.1	10.0	6.7	—	5.5	—	—
	2	—	—	—	16.4	13.6	—	—	—	62.8	—	—	—	7.2	—	—
	3	—	—	—	4.8	17.1	—	—	—	72.4	—	—	—	5.7	—	—
	4	—	—	—	6.2	6.9	—	—	—	82.4	—	—	—	4.5	—	—
	5	—	—	—	4.2	16.4	—	—	—	72.6	—	—	—	6.8	—	—
	6	9.2	—	—	2.4	14.6	14.2	—	—	40.4	11.4	—	—	7.8	—	—
	7	16.3	—	—	7.4	7.7	9.1	—	—	29.8	22.1	2.1	—	5.5	—	—
	8	10.1	—	—	11.4	18.1	4.4	—	—	35.2	5.2	—	—	15.6	—	—
	9	—	—	—	5.1	11.7	—	—	—	78.4	—	—	—	4.8	—	—
	10	—	—	—	7.1	9.2	—	—	—	80.1	—	—	—	3.6	—	—
	11	—	—	—	3.6	8.7	—	—	—	85.6	—	—	—	2.1	—	—
	12	10.7	—	—	4.4	9.8	15.6	23.1	—	18.1	10.1	—	—	8.2	—	—
Песок	1	—	—	—	17.6	26.1	—	—	—	34.2	—	—	—	22.1	—	—
	2	—	—	—	15.8	33.3	—	—	—	28.6	—	—	—	22.3	—	—
	3	—	—	—	18.5	21.2	—	—	—	44.1	—	—	—	16.2	—	—
	4	—	—	—	9.4	14.6	—	—	—	65.4	—	—	—	10.6	—	—
	5	—	—	—	1.5	7.2	—	—	—	87.2	—	—	—	4.1	—	—
	6	—	—	—	15.7	30.6	—	—	—	27.5	4.3	1.1	—	20.8	—	—
	7	—	—	—	18.6	27.8	—	—	—	33.1	2.1	—	—	18.4	—	—
	8	—	—	—	22.8	15.5	—	—	—	45.2	—	—	—	16.5	—	—
	9	—	—	—	14.7	17.7	—	—	—	55.2	—	—	—	12.4	—	—
	10	—	—	—	7.6	12.5	—	—	—	72.4	—	—	—	7.5	—	—
	11	—	—	—	2.2	4.2	—	—	—	90.2	—	—	—	3.4	—	—
	12	—	—	—	27.2	31.8	—	—	—	15.6	—	—	—	25.4	—	—

Этапы ЦЗО: 1 – 19°C (стартовая температура субстратов до начала первого цикла замораживания–оттаивания); 2 – 10°C (промерзание в первом цикле замораживания–оттаивания); 3 – 5°C (промерзание в первом цикле замораживания–оттаивания); 4 – 0°C (промерзание в первом цикле замораживания–оттаивания); 5 – –5°C (завершение этапа промерзания в первом цикле замораживания–оттаивания); 6 – 0°C (оттаивание в первом цикле замораживания–оттаивания); 7 – 22°C (завершение первого цикла замораживания–оттаивания и стартовая температура субстратов второго цикла замораживания–оттаивания); 8 – 10°C (промерзание во втором цикле замораживания–оттаивания); 9 – 5°C (промерзание во втором цикле замораживания–оттаивания); 10 – 0°C (промерзание во втором цикле замораживания–оттаивания); 11 – –5°C (завершение этапа промерзания во втором цикле замораживания–оттаивания); 12 – 0°C (оттаивание во втором цикле замораживания–оттаивания).

Таблица 3. Относительное обилие аскомицетовых дрожжевых грибов, выделенных из компонентов почвенных конструкций в ЦЗО

	Этапы ЦЗО	<i>Barnettozyma californica</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. sake</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Nadsonia starkeyi-henricii</i>	<i>Schwannomyces capriotti</i>
А _{пах}	1	2.06	0.25	1.61	3.70	3.07	2.87	1.23	—	2.38
	2	1.77	0.43	2.14	3.14	2.24	4.26	4.29	—	—
	3	2.21	0.24	2.64	4.20	2.28	4.12	—	—	—
	4	—	—	3.02	—	2.66	4.16	—	—	—
	5	—	—	6.37	6.22	2.10	3.90	—	—	—
	6	1.13	0.98	6.37	10.24	0.58	0.16	—	—	2.38
	7	2.05	0.25	1.61	1.46	2.07	2.87	1.23	—	6.20
	8	3.11	0.43	2.14	3.45	2.24	4.26	3.29	—	—
	9	4.25	0.24	2.64	1.10	2.28	4.12	—	—	—
	10	—	—	3.02	—	3.06	4.16	—	—	—
	11	3.78	0.07	6.45	7.11	—	0.16	—	—	2.56
	12	1.13	1.05	6.92	10.73	0.98	0.16	—	—	2.38
Торф	1	—	—	12.68	4.48	—	3.82	0.40	—	2.22
	2	0.23	—	15.88	2.11	—	2.45	1.16	0.98	—
	3	—	1.29	16.05	6.18	2.13	5.15	—	2.11	—
	4	—	—	24.89	—	2.31	—	—	9.45	—
	5	—	—	66.53	7.23	4.02	—	—	1.72	—
	6	—	—	47.79	8.23	0.54	—	—	11.17	—
	7	—	—	12.38	6.14	—	3.82	0.32	—	7.11
	8	0.78	—	15.11	—	—	2.44	1.16	—	—
	9	—	1.29	16.05	4.44	2.39	5.22	—	—	—
	10	—	—	23.02	—	2.14	—	—	11.37	—
	11	—	—	66.53	6.55	4.09	—	—	5.86	—
	12	—	—	47.96	7.20	0.54	—	—	13.24	—
Песок	1	—	—	—	71.87	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	4.77	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	20.00	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	54.35	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	100	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	100	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	81.20	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	4.57	—	—	—	—	—
	9	—	—	—	24.70	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	46.50	—	—	—	—	—
	11	—	—	—	100	—	—	—	—	—
	12	—	—	—	100	—	—	—	—	—

Обозначения как в табл. 2.

Таблица 4. Относительное обилие базидиомицетовых дрожжевых грибов, выделенных из компонентов почвенных конструкций в ЦЗО

Этапы ЦЗО	<i>Apiclitum dulcitum</i>	<i>A. laibachii</i>	<i>A. porosum</i>	<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Cys. infirmominiatum</i>	<i>Cys. macerans</i>	<i>Dilinia catenulata</i>	<i>Flitobasidium magnum</i>	<i>F. wieringae</i>	<i>Goffeauzyma gastrica</i>	<i>Papillotrema flavescens</i>	<i>Rhodosporeidiobolus colostri</i>	<i>Rhodotritia glutinis</i>	<i>Rh. graminis</i>	<i>Rh. mucilaginosus</i>	<i>Satizozyma podzolica</i>	<i>Solificosozyma aerata</i>	<i>S. terra</i>	<i>S. terricola</i>	<i>Tausonia pullulans</i>
Апах	1	1.37	1.07	2.93	13.00	0.43	—	0.86	3.76	1.19	3.74	7.22	1.37	2.57	10.78	7.36	8.49	13.48	0.33	2.89
	2	1.68	2.05	2.94	24.2	0.57	0.78	1.15	1.78	0.91	0.17	0	1.63	—	18.11	6.01	2.44	12.14	0.39	1.33
	3	1.66	3.21	2.52	27.12	4.14	2.90	—	0.12	0.22	0.87	2.19	5.11	5.53	4.48	2.74	1.84	2.22	8.22	4.33
	4	1.33	1.02	0.45	27.45	6.78	5.34	—	—	—	0.17	4.32	5.85	6.77	6.44	3.00	0.56	0.22	10.11	4.33
	5	1.67	0.23	0.42	26.61	—	5.37	—	—	—	—	5.33	—	3.37	6.00	2.34	1.01	0.08	16.69	—
	6	0.68	0.23	1.04	10.44	10.21	10.91	—	—	—	—	5.33	2.46	1.63	11.67	8.28	—	1.48	3.68	—
	7	2.11	4.17	3.02	8.11	—	—	0.17	6.10	6.12	5.24	6.09	—	2.43	6.43	6.98	7.45	8.02	2.42	7.40
	8	0.88	1.14	6.15	19.45	1.55	0.78	0.28	—	4.13	1.24	—	2.60	—	18.03	6.78	3.12	10.45	0.39	2.00
	9	1.66	3.55	5.24	29.22	—	—	—	—	1.45	1.18	2.20	7.00	3.2	5.15	4.44	0.12	2.55	9.05	6.21
	10	1.33	1.50	1.28	30.12	9.12	9.11	—	—	—	0.68	1.45	1.8	8.45	2.10	1.26	1.12	1.44	14.22	—
	11	0.68	—	5.26	10.56	7.50	9.12	—	—	—	—	6.22	3.16	—	13.8	10.18	—	0.14	4.69	—
Торф	12	0.68	0.23	1.22	10.44	10.21	10.91	—	—	—	—	5.33	2.46	1.63	11.67	7.18	—	0.96	3.61	—
	1	—	0.35	—	—	4.75	—	—	—	—	—	0.92	2.48	—	67.34	—	—	—	—	0.53
	2	—	0.70	—	—	2.66	—	—	—	—	—	5.18	—	—	65.51	—	—	—	—	3.14
	3	—	1.12	—	—	6.23	—	—	—	—	—	—	3.14	—	55.4	—	—	—	—	—
	4	—	0.20	—	—	41.12	—	—	—	—	—	—	6.05	—	10.20	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.67	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	22.05	—	—	—	—	—	—	—	—	10.22	—	—	—	—	—
	7	—	2.16	—	—	4.75	—	—	—	—	2.80	5.25	—	—	49.16	—	—	—	—	6.08
	8	—	0.92	—	—	5.78	—	—	—	—	—	10.18	—	—	58.51	—	—	—	—	5.12
	9	—	2.51	—	—	8.02	—	—	—	—	—	—	3.00	—	55.98	—	—	—	—	—
	10	—	0.56	—	—	42.14	—	—	—	—	—	—	4.23	—	11.04	—	—	—	—	—
	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Песок	12	—	—	—	—	18.51	—	—	—	—	—	—	16.97	—	—	—	—	—	—	—
	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.55	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	28.10	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	95.23	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	80.00	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45.65	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	18.80	—	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	95.43	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	75.30	—	—	—	—	—
	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	53.50	—	—	—	—	—
Обозначения как в табл. 2.	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

нами педобионтных дрожжей было очень низким при отрицательных температурах в циклах замораживания—оттаивания. Исключение составили дрожжи *Solicoccozyma terricola*, относительное обилие которых при отрицательных температурах было 16.7 и 10.2% соответственно, в первом и втором циклах замораживания—оттаивания (типичный обитатель почв умеренной и северной зон).

Комплекс физиологических механизмов позволяет некоторым дрожжевым грибам адаптироваться к низким температурам. Он может включать увеличение в клетках дрожжей концентрации внутриклеточного дисахарида трегалозы и многоатомных спиртов полиолов, нерастворимые мембранные липиды, а также антифризные белки и активные при низких температурах ферменты. В комбинации эти механизмы необходимы для выполнения психротрофной и психрофильной функций (Ткаченко, 2017).

Неоднократно было показано на почвенных и пресноводных бактериях, что краткосрочное замораживание (1–3 сут) замедляет рост и активность микробных сообществ, а рост численности микроорганизмов повышается после 7 и 15-суточного замораживания. Установлено, что чем длительнее замораживание, тем больше времени требуется микроорганизмам после размораживания для адаптации к новым условиям (Upton, 1990; Черобаева и соавт., 2011). В нашей работе была выявлена устойчивая динамика снижения численности (на полтора—два порядка) культивируемых бактерий сапротрофного комплекса от положительных температур вплоть до максимальной отрицательной в эксперименте температуры -5°C . При отрицательной температуре субстратов $A_{\text{пах}}$ и торф из них высевались только устойчивые к низким температурам бациллы и психрофильные бактерии *Flavobacterium psychrophilum*. В то же время для дрожжевых грибов впервые была показана противоположная закономерность, которая характеризовалась устойчивым ростом численности дрожжевого населения в градиенте от положительных до отрицательной температуры инкубирования субстратов $A_{\text{пах}}$ и торф. Показанное явление определенно нуждается в дальнейшем изучении.

Среди выделенных нами из $A_{\text{пах}}$ видов дрожжевых грибов и сапротрофных бактерий для более чем 55% известна способность к синтезу одного или более фитогормонов (ИУК, зеатин, ГК₃), стимулирующих рост и развитие растений. Среди встреченных нами, к ним относятся бактерии из родов *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptomyces*; виды дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida sake*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Cys. infirmominiatum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Solicoccozyma terricola* и другие (Shokri, Emtiazi, 2010;

Стрелецкий, 2017; Streletsii et al., 2019). Фитогормональная активность микроорганизмов, кроме таксономической приуроченности, во многом имеет и штаммовую зависимость.

Исследованная при процессах замораживания—оттаивания микробиота компонентов специализированных почвенных конструкций отличается высокой численностью и эколого-функциональным разнообразием. Среди выделенных грамотрицательных и грамположительных бактерий и дрожжевых грибов были обнаружены представители разных эколого-трофических групп: гидролитики, копиотрофы, копиотрофы-олиготрофы. Оценка в модельном эксперименте влияния краткосрочных перепадов температуры на динамику численности и разнообразия сообществ одноклеточных микроорганизмов в исследованных компонентах почвенных конструкций показала, что они, вероятно, обладают хорошим адаптивным ферментативным аппаратом, который позволяет им “переносить” стрессовые перепады температуры, характерные для весенне-осеннего периода (Männistö et al., 2009). Это также говорит в пользу способности специализированных почвенных конструкций саморазвиваться в процессе функционирования, что пролонгирует промежуток их активного функционирования в урбоэкосистеме без дополнительного вмешательства и затрат (Просьянников, Рыженков, 2009; Смагин, 2012). Среди выделенных нами из исследованных компонентов почвенных конструкций микроорганизмов присутствуют виды, для которых известна способность к стимуляции роста и развития растений за счет продуцирования фитогормонов, прежде всего, ИУК. Для оценки фитогормональной активности выделенных нами штаммов бактерий и дрожжей на всех этапах в циклах замораживания—оттаивания в настоящее время проводятся биохимические исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-29-05252 мк.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Жирные кислоты как объект исследования температурных

- адаптационных стратегий микроорганизмов-психрофилов // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2015. № 3(61). С. 43–49.
- Вайгель А.Э. Агрофизические свойства почвенных конструкций разного строения и их трансформация в первые годы функционирования в условиях города Москвы. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2017. 25 с.
- Воробьева Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. С. 261–269.
- Vorob'eva L.I. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: a review // Appl. Biochem. Microbiol. 2004. V. 40. P. 217–224.
- Глушакова А.М., Желтикова И.Ю., Чернов И.Ю. Группировки дрожжей в домашней пыли и источники ее формирования // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 111–117.
- Glushakova A.M., Zheltikova T.M., Chernov I.Y. Groups and sources of yeasts in house dust // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 94–98.
- Глушакова А.М., Качалкин А.В., Желтикова Т.М., Чернов И.Ю. Устойчивость дрожжей разных экологических групп к длительному сохранению в высушенном состоянии // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 379–387.
- Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Zheltikova T.M., Chernov I.Y. Resistance of various yeast ecological groups to prolonged storage in dry state // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 442–448.
- Головченко А.В., Семенова Т.А., Добровольская Т.Г., Богданова О.Ю., Кухаренко О.С. Влияние температуры на структуру микробных сообществ верхового торфяника (модельные опыты) // Вестник Томского гос. пед. ун-та. 2010. Т. 3. № 93. С. 92–99.
- Гулёв С.К., Катцов В.М., Соломина О.Н. Глобальное потепление климата продолжается // Вестник РАН. 2008. Т. 78. С. 20–27.
- Gulev S.K., Kattsov V.M., Solomina O.N. Global warming continues // Herald of the Russian Academy of Sciences. 2008. V. 78. P. 44–50.
- Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2002. 282 с.
- Добровольская Т.Г., Звягинцев Д.Г., Чернов И.Ю., Головченко А.В., Зенова Г.М., Лысак Л.В., Манучарова Н.А., Марфенина О.Е., Полянская Л.М., Степанов А.Л., Умаров М.М. Роль микроорганизмов в экологических функциях почв // Почвоведение. 2015. Т. 48. № 9. С. 1087–1096.
- Dobrovol'skaya T.G., Zvyagintsev D.G., Chernov I.Y., Golovchenko A.V., Zenova G.M., Lysak L.V., Manucharova N.A., Marfenina O.E., Polyanskaya L.M., Stepanov A.L., Umarov M.M. The role of microorganisms in the ecological functions of soils // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 959–967.
- Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ, 1991. 304 с.
- Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М.: МГУ, 2005. 445 с.
- Курбатова А.С. Ландшафтно-экологические основы формирования градоостроительных структур. М.: Маджента, 2004. 400 с.
- Курганова И.Н., Лопес де Гереню В.О. Вклад абиотических факторов в усиление эмиссии CO₂ из почв при процессах замораживания–оттаивания // Почвоведение. 2015. Т. 48. № 9. С. 1145–1152.
- Kurganova I.N., Lopes de Gerenyu V.O. Contribution of abiotic factors to CO₂ emission from soils in the freeze–thaw cycles // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 1009–1015.
- Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификация почвенных бактерий. М.: МаксПресс, 2003. 120 с.
- Лысак Л.В. Бактериальные сообщества городских почв. Автореферат дис. ... докт. биол. наук. М.: МГУ, 2010. 46 с.
- Морина О.М., Холоден Е.Э., Лобанов С.А., Дербенцева А.М. Динамика температур почв при антропогенных нагрузках: учеб. пособие. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2008. 115 с.
- Намсараев Б.Б., Абидуева Е.Ю., Лаврентьева Е.В., Банзаракцаева Т.Г., Бархутова Д.Д., Буянтуева Л.Б. Экология микроорганизмов экстремальных водных систем: учеб. пособие. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского государственного университета, 2008. 94 с.
- Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. Т. 1, 2. 800 с.
- Оценочный доклад об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации (техническое резюме). М.: Росгидромет, 2008. 89 с.
- Просянкин Е.В., Рыженков Д.Д. Почвенные конструкции с заданными свойствами // Агрохимический вестник. 2009. № 3. С. 13–14.
- Смагин А.В. Теория и практика конструирования почв. М.: Изд-во Московского университета, 2012. 542 с.
- Смагин А.В., Садовникова Н.Б. Создание почвоподобных конструкций // Почвоведение. 2015. Т. 48. С. 1112–1123.
- Smagin A.V., Sadovnikova N.B. Creation of soil-like constructions // Eurasian Soil Science. 2015. V. 48. P. 981–990.
- Смагин А.В., Азовцева Н.А., Смагина М.В., Степанов А.Л., Мягкова А.Д. Некоторые критерии и методы оценки экологического состояния почв в связи с озеленением городских территорий // Почвоведение. 2006. Т. 39. С. 603–615.
- Smagin A.V., Azovtseva N.A., Smagina M.V., Stepanov A.L. Criteria and methods to assess the ecological status of soils in relation to the landscaping of urban territories // Euras. Soil Sci. 2006. V. 39. P. 539–551.
- Степанов А.Л., Судницын И.И., Умаров М.М., Галиманге Б. Влияние плотности почв и давления почвенной влаги на эмиссию закиси азота и диоксида углерода // Почвоведение. 1996. Т. 29. С. 1337–1340.
- Stepanov A.L., Sudnitsyn I.I., Umarov M.M., Galimange B. The effect of soil bulk density and moisture tension on nitrous oxide and carbon oxide emission // Euras. Soil Sci. 1996. V. 29. P. 1247–1250.
- Стрелецкий Р.А. Эколого-таксономические аспекты распространения фитогормональной активности среди дрожжей. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2017. 26 с.

- Строганова М.Н. Городские почвы: генезис, систематика и экологическое значение (на примере г. Москвы). Докт. дис. в форме науч. докл., 1998. 74 с.
- Сусленкова М.М., Умарова А.Б., Бутылкина М.А. Микроструктура почв разного генезиса и ее трансформация в составе конструкторземов в условиях г. Москвы // Почвоведение. 2018. Т. 51. С. 1265–1273.
- Suslenkova M.M., Umarova A.B., Butylkina M.A. Microstructure of soils of different geneses and its transformation in constructozems of Moscow // Euras. Soil Sci. 2018. V. 51. P. 1220–1228.
- Ткаченко О.Б. Кривофильные грибы: способы адаптации к пониженным температурам // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. С. 15–18.
- Умарова А.Б., Сусленкова М.М., Бутылкина М.А., Салимгареева О.А., Кокорева А.А., Ежелев З.С., Гасина А.И. Гидросорбционные и микроструктурные характеристики почвенных субстратов разного генезиса и их изменение в составе конструкторземов // Почвоведение. 2019. Т. 52. С. 1346–1355.
- Umarova A.B., Suslenkova M.M., Butylkina M.A., Salimgareeva O.A., Kokoreva A.A., Ezhelev Z.S., Gasina A.I. Hydro-sorption and microstructural characteristics of soil horizons of different geneses and their change in constructozems // Euras. Soil Sci. 2019. V. 52. P. 1369–1377.
- Феофилова Е.П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. С. 5–24.
- Чернов И.Ю. Дрожжи в природе. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. 336 с.
- Чернов И.Ю., Глушакова А.М., Качалкин А.В. Аннотированный список видов дрожжей Московского региона // Микология и фитопатология. 2013. Т. 47. С. 103–115.
- Черобаева А.С., Степанов А.Л., Кравченко И.К. Отклик аммонийоокисляющих бактерий и архей на резкие изменения температуры в почвах разных климатических зон // Проблемы агрохимии и экологии. 2011. № 3. С. 17–24.
- Fell J., Blatt G. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis // J. Ind. Microbiol. Biotech. 1999. V. 23. P. 677–681.
- Feng X., Nielsen L.L., Simpson M. Responses of soil organic matter and microorganisms to freeze–thaw cycles // Soil Biol. & Biochem. 2007. V. 39. P. 2027–2037.
- Kim D.-G., Vargas R., Bond-Lamberty B., Turetsky M.R. Effects of soil rewetting and thawing on soil gas fluxes: a review of current literature and suggestions for future research // Biogeosciences. 2012. V. 9. P. 2459–2483.
- Koponen H.T., Jaakkola T., Keinänen-Toivola M.M., Kainainen S., Tuomainen J., Servomaa K., Martikainen P.J. Microbial communities, biomass, and activities in soils as affected by freeze thaw cycles // Soil Biol. Biochem. 2006. V. 38. P. 1861–1871.
- Kuhry P., Turunen J. The postglacial development of boreal and subarctic peatlands // Boreal Peatland Ecosystems / Eds. Wieder R.K., Vitt D.H. N.Y.: Springer, 2006. P. 25–46.
- Kurganova I., Teepe R., Loftfield N. Influence of freeze-thaw events on carbon dioxide emission from soil at different moisture and land use // Carbon Balance and Management. 2007. V. 2. P. 1–9.
- Kurganova I., Teepe R., Lopes de Gerenyu V., Loftfield N., Flessa H. Effect of contrasting changes in hydrothermic conditions on the N₂O emission from forest and tundra soils // Euras. Soil Sci. 2004. V. 40. P. 795–799.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Roberts V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts // The Yeasts: A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam: Elsevier Science, 2011. P. 87–110.
- Kværnø S., Øygarden L. The influence of freeze–thaw cycles and soil moisture on aggregate stability of three soils in Norway // Catena. 2006. V. 67. P. 175–182.
- Larsen K.S., Jonasson S., Michelsen A. Repeated freeze-thaw cycles and their effect on biological processes in two arctic ecosystem types // Appl. Soil Ecol. 2002. V. 21. P. 187–195.
- Lopes de Gerenyu V.O., Kurganova I.N., Rozanova L.N., Kudryarov V.N. Annual emission of carbon dioxide from soils of the Southern Taiga soils of Russia // Euras. Soil Sci. 2001. V. 34. P. 931–944.
- Manucharova N.A., Vlasenko A.N., Tourova T.P., Panteleeva A.N., Stepanov A.L., Zenova G.M. Thermophilic chitolytic microorganisms of brown semidesert soil // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 610–615.
- Matzner E., Borken W. Do freeze-thaw events enhance C and N losses from soils of different ecosystems? A review // Eur. J. Soil Sci. 2008. V. 59. P. 274–284.
- Männistö M.K., Tirola M., Häggblom M.M. Effect of freeze-thaw cycles on bacterial communities of arctic tundra soil // Microb. Ecol. 2009. V. 58. P. 621–631.
- Misaka N., Nishizawa T., Yoshimizu M. Quantitative detection of viable *Flavobacterium psychrophilum* in Chum Salmon *Oncorhynchus keta* by colony blotting and immunostaining // Fish Pathology. 2008. V. 43. P. 117–123.
- Panikov N.S., Dedysh S.N. Cold season CH₄ and CO₂ emission from boreal peat bogs (West Siberia): Winter fluxes and thaw activation dynamics // Global Biogeochem. Cycles. 2000. V. 14. P. 1071–1080.
- Schuur E.A., Abbott B. Climate change: high risk of permafrost thaw // Nature. 2011. V. 480(7375). P. 32–33.
- Stirk W.A., Ördög V., Novák O., Rolčík J., Strnad M., Bálint P., van Staden J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains // J. Phycol. 2013. V. 49. P. 459–467.
- Streletsii R.A., Kachalkin A.V., Glushakova A.M., Yurkov A.M., Demin V.V. Yeasts producing zeatin // Peer J. 2019. V. 7. e6474.
- Sulkava P., Huhta V. Effects of hard frost and freeze-thaw cycles on decomposer communities and N mineralisation in boreal forest soil // Appl. Soil Ecol. 2003. V. 22. P. 225–239.
- Teepe R., Brumme R., Beese F. Nitrous oxide emission from soil during freezing and thawing periods // Soil Biol. Biochem. 2001. V. 33. P. 1269–1275.
- Teepe R., Ludwig B. Variability of CO₂ and N₂O emissions during freeze-thaw cycles: results of model experiments on undisturbed forest soil cores // J. Plant Nutr. Soil Sci. 2004. V. 167. P. 153–159.
- Upton A.C., Nedwell D.B., Wyrr-William D.D. The selection of microbial communities by constant or fluctuating tem-

peratures // FEMS Microbiol. Ecol. 1990. V. 74. P. 243–252.

Venäläinen A., Tuomenvirta H., Heikinheimo M., Kellomäki S., Peltola H., Strandman H., Vaisanen H. Impact of climate change on soil frost under snow cover in a forested landscape // Climate Research. 2001. V. 17. P. 63–72.

Vital M., Abranches J., Hagler A., Mendonça-Hagler L. Mycogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Ma-

racá ecological station, Roraima-Brazil // Braz. J. Microbiol. 2002. V. 33. P. 230–235.

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

Yergeau E., Kowalchuk G.A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze–thaw cycle frequency // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 10. P. 2223–2235.

Transformation of Microbial Complexes in Components of Soil Structures of Different Origin (Soil, Peat, Sand) during Freezing-Thawing Processes

A. M. Glushakova^{1,2}, L. V. Lysak¹, A. V. Kachalkin^{1,3}, A. E. Ivanova^{1,4}, A. B. Umarova¹, I. A. Abramyan¹, Z. S. Ezhelev¹, and I. A. Maksimova^{1,*}

¹Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia

³Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of RAS, Pushchino, 142290 Russia

⁴Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: maximova.irina@gmail.com

Received August 4, 2020; revised September 16, 2020; accepted October 21, 2020

Abstract—In a model experiment, the transformation of microbial complexes of cultivated forms of saprotrophic bacteria and yeasts during freezing-thawing was studied in various natural substrates that are used to create soil structures for urban landscaping and for growing herbaceous plants. The number of saprotrophic bacteria and yeasts depended both on the type of substrate and on temperature changes during freezing-thawing. At the stage of freezing of peat and soil (A_{arable}) to 0 and -5°C and at the subsequent stage of thawing to 0°C , a significant increase in yeast abundance was registered. The maximum number of yeasts in soil and peat was 5.1 lg (CFU/g). In contrast to the number of yeasts, abundance of saprotrophic bacteria in soil and peat was characterized by a sharp decrease when the substrate temperature was negative and peaked at 19–22 and 10°C , respectively. The maximum bacterial numbers in soil and peat were 7.5 and 8.0 lg (CFU/g), respectively. In sand, abundance of both saprotrophic bacteria and yeasts did not depend on the temperature and was 5.0 lg (CFU/g) for bacteria and 3.4 lg (CFU/g) for yeasts at all stages of the freezing-thawing cycles. In total, 15 species of saprotrophic bacteria and 29 species of yeasts were isolated from different components of soil structures. At the maximum temperature of freezing in the cycles (-5°C), three species of bacteria with psychrophilic properties (*Flavobacterium psychrophilum*) and ability to form endospores resistant to various adverse effects (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*) were isolated from soil and peat. Among the yeasts isolated from soil and peat at negative temperature and also having psychophilic properties were *Candida sake*, *Rhodotorula glutinis*, *Rh. mucilaginosa*, and *Solicoccozyma terricola*. Bacteria with psychophilic properties, *Flavobacterium psychrophilum* and *Pseudomonas fluorescens*, as well as two species of bacilli, *Bacillus subtilis* and *B. megaterium* were revealed in sand at negative temperatures. Only one yeast species, *Debaryomyces hansenii*, capable of surviving stress conditions in the form of ascospores, was isolated from sand at -5°C . The effect of short-term temperature drops on the dynamics of the number and diversity of microbial communities of the investigated components of soil structures in a model experiment showed that specialized soil structures were able to “tolerate” short-term temperature stress drops typical of the spring and autumn period, restoring the number of initial populations after cessation of the negative impacts. This also indicates development of the soil structures in the process of functioning, rather than their rapid degradation.

Keywords: constructozems, soil, peat, sand, freezing-thawing, yeasts, saprotrophic bacteria, nitrogen fixers, phytohormones

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ
И ДЕТЕРМИНАНТЫ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ У БАКТЕРИЙ
РОДА *PSEUDOMONAS*
В ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЯХ Г. ПУЩИНО**

© 2021 г. И. А. Кошелева^а, Т. Ю. Измалкова^{а, *}, О. И. Сазонова^а, Т. В. Сиунова^а,
А. Б. Гафаров^а, С. Л. Соколов^а, А. М. Боронин^а

^аФедеральный исследовательский центр “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук,
Московская область, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: tatiz@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 30.06.2020 г.

После доработки 20.10.2020 г.

Принята к публикации 28.10.2020 г.

В работе охарактеризованы антибиотикорезистентные штаммы, изолированные методом прямого высева из пяти проб, отобранных из очистных сооружений г. Пушкино в апреле 2015 г. на различных стадиях очистки. Проведен первичный анализ коллекции (около 800 штаммов) на устойчивость к антибиотикам: карбенициллину, канамицину, стрептомицину, амикацину, тобрамицину, хлорамфениколу, рифампицину, гентамицину, тетрациклину, цефтазидиму, цефепиму и меропенему. Показано, что наиболее часто встречающимися антибиотикоустойчивыми микроорганизмами в очистных сооружениях г. Пушкино являются бактерии родов *Pseudomonas* и *Alcaligenes*. Исследовано распространение генов резистентности к тетрациклину и показано, что в штаммах из очистных сооружений г. Пушкино преобладают гены *tetA/tetC*, контролирующие активный вывод антибиотика из клетки. Штаммы, содержащие гены, ассоциированные с интегронами I-го типа (*int11*, *qacE/qacΔE1* и *su11*) составили четвертую часть от исследованных образцов. У четырех штаммов псевдомонад обнаружены IncN плазмиды, семь штаммов *Pseudomonas* spp. содержат плазмиды группы несовместимости P-9 (ε-подгруппы). Три IncP-9 плазмиды являются конъюгативными и несут детерминанты устойчивости к тетрациклину, стрептомицину и гентамицину одновременно, что показано впервые для ε-подгруппы IncP-9 плазмид.

Ключевые слова: антибиотики, очистные сооружения, множественная лекарственная устойчивость, плазмиды, интегроны, группы несовместимости плазмид

DOI: 10.31857/S0026365621020087

Антибиотики являются широко распространенной группой лекарственных препаратов, наиболее успешно применяемой в медицине и ветеринарии. Потребление данных веществ по всему миру оценивается в сотни тысяч тонн в год. В медицине антибиотики являются третьей группой фармацевтических препаратов по частоте назначения (Puckowski et al., 2016). В ветеринарии эти соединения широко применяются не только для лечения, но и для стимуляции роста животных. Широкое применение антибиотиков в XXI в. привело к возникновению и быстрому распространению патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, которое все чаще ставит под угрозу успешное лечение бактериальных инфекций и является глобальной проблемой в области здра-

воохранения, решение которой требует эффективных действий. Однако распространение резистентных патогенных микроорганизмов в клинике не может рассматриваться отдельно от процессов циркуляции детерминант устойчивости к антибиотикам в природных экосистемах. В настоящее время многие страны разрабатывают стратегию действий по предотвращению распространения резистентности к антибиотикам, которая основана на концепции неразрывной связи жизнедеятельности человека и животных с окружающей средой (Ashbolt et al., 2013). Загрязнение фармацевтическими отходами наземных и водных экосистем наблюдается повсеместно, причем порой концентрация антибиотиков в окружающей среде превышает их терапевтические уровни (Lars-

son et al., 2007; Li et al., 2016; Puckowski et al., 2016). Неизменные остатки лекарственных средств попадают в больших количествах в окружающую среду вследствие физиологической экскреции людей, животных, в составе бытового фармацевтического мусора и при обработке антибиотиками сельскохозяйственных животных. Также оставшиеся без изменений исходные соединения и их биологически активные метаболиты сбрасываются в почву при использовании навоза в качестве удобрения. Распространение антибиотиков сточными водами приводит к загрязнению водной среды.

В последнее время все больше внимания уделяется очистным сооружениям, которые являются резервуарами устойчивых к антибиотикам бактерий, и, благодаря высокой плотности и разнообразию микробиоты активного ила, служат “горячими точками” горизонтального переноса, рекомбинации и распространения в окружающей среде генов антибиотикорезистентности (Dalkmann et al., 2012). Город Пушкино Московской области (население около 20 тыс. чел.) не содержит на своей территории крупных производств, поэтому основным источником попадания в очистные сооружения антибиотиков и антибиотикорезистентных штаммов служат коммунально-бытовые сточные воды.

Целью данной работы было изучение культивируемых антибиотикорезистентных микроорганизмов и детерминант множественной лекарственной устойчивости в отсутствие влияния промышленных и сельскохозяйственных производств на примере очистных сооружений г. Пушкино.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали бактериальные штаммы, устойчивые к антибиотикам, изолированные методом прямого посева из проб, отобранных из очистных сооружений г. Пушкино на различных стадиях очистки (табл. 1).

Штаммы выращивали при 28°C на богатой агаризованной среде LB (Sambrook et al., 1989) с добавлением одного из следующих антибиотиков (мкг/мл): карбенициллин – 500, цефтазидим – 40, цефепим – 40, меропенем – 40, тетрациклин – 30, канамицин – 100, стрептомицин – 100, амикацин – 30, тобрамицин – 50, гентамицин – 10, рифампицин – 100 и хлорамфеникол – 100. Концентрации антибиотиков подбирали на основании базы данных Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам EUCAST (<http://www.eucast.org>) с учетом того, что конечная концентрация антибиотика в среде должна быть выше минимальной ингибирующей концентрации и обеспечивать устойчивый рост резистентных штаммов. Общую численность культивируемых микроорганизмов (КОЕ/мл образца) для каждой пробы определяли путем прямого подсчета коло-

ний, выросших на богатой агаризованной среде LB без добавления антибиотика; численность антибиотикоустойчивых микроорганизмов также определяли прямым подсчетом выросших колоний. Эксперименты проводили в трех повторностях. Для селекции штаммов, относящихся к роду *Pseudomonas*, использовали среду PIA – *pseudomonas* isolation agar (“Difco”, США); среду King B (“Pronadisa Conda”, Испания) использовали для выявления псевдомонад флуоресцирующей группы.

Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по протоколу фирмы-изготовителя, используя систему MALDI Biotyper (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация), основанную на сравнении масс-спектров рибосомальных белков исследуемого штамма с базой спектров референсных микроорганизмов известных видов (“Bruker Daltonics”, Германия). На основании полученных оценочных величин выше 2.000 (2.074–2.368) выделенные нами микроорганизмы были определены до вида, в диапазоне 1.845–1.921 – до рода. Пробы для анализа готовили согласно (De Bruyne et al., 2011).

Геномную ДНК бактерий выделяли с использованием AxyPrep Bacterial Genomic DNA MiniPrep Kit по протоколу фирмы-изготовителя (“Axygen Biosciences”, США). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Sambrook et al., 1989). Концентрацию ДНК определяли на флуориметре ТК-100 фирмы “Hoefer Scientific Instruments” (США) с красителем Hoechst 33258 (“Bio-Rad”, США) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в цикле GeneAmp PCR System 9700 (“Applied Biosystems”, США). Реакцию проводили в стандартных условиях, при конечной концентрации дезоксирибонуклеотидтрифосфатов 200 мкМ, 1.5 мМ или 2 мМ MgCl₂ и, в некоторых случаях, 5% диметилсульфоксида (ДМСО) (“Sigma”, США). Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 2.

Электрофорез ДНК проводили в 1–2.5% агарозе в 0.5× Трис-боратном буфере по стандартной методике (Sambrook et al., 1989). Визуализацию ДНК проводили путем окрашивания геля в растворе бромистого этидия. ДНК очищали из геля, используя AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit (“Axygen”, США), по протоколу фирмы-изготовителя.

В работе использовали ферменты и буферные растворы компании “Thermo Fisher Scientific” (США). Все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Конъюгационный перенос плазмид в реципиентный штамм *P. putida* KT2442 (*gfpKm^R*) осуществляли на мембранных фильтрах на агаризованной среде LB. Культуры донорных и реципиентных бактерий, выращенных на среде LB и находящихся в

Таблица 1. Мультирезистентные штаммы, изолированные из очистных сооружений г. Пущино на разных этапах очистки

Обозначение штамма*	Характеристика**	Плазмиды***	<i>tet</i> -гены	<i>intI1/sul1/qacΔE1</i>	Размер кассеты, п.н.
<i>P. fragi</i> 1C-5	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Rif ^R Cm ^R Caz ^R Fep ^R	+	<i>tet A/C</i> ++	-/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 1Cb-36	Tc ^R Caz ^R Fep ^R	+	<i>tet A/C</i> ++	+/-/-	
<i>P. lundensis</i> 1G-10	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cm ^R Caz ^R Fep ^R	IncP-9	<i>tet A/C</i> ++	-/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 1G-5	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cm ^R Mer ^R	IncP-9	<i>tet A/C</i> ++	+ / + / +	~700
<i>Pseudomonas</i> sp. 1K-1	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Rif ^R Cb ^R Caz ^R Fep ^R	Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R	<i>tet A/C</i> ++	+ / + / +	
<i>P. lundensis</i> 1S-2	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Rif ^R	IncP-9	<i>tet A/C</i> ++	-/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 1T-27	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Km ^R	HO	—	+/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 1T-31	Tc ^R Sm ^R Caz ^R Fep ^R	IncN	<i>tet A/C</i> ++	+ / + / +	~1400
<i>Pseudomonas</i> sp. 1T-50	Tc ^R Sm ^R Ak ^R Fep ^R	IncN	—	+/-/-	
<i>P. fragi</i> 2G-2	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cm ^R Caz ^R Mer ^R Cb ^R	IncP-9	<i>tet A/C</i> ++	-/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 2G-7	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Cb ^R Mer ^R	IncP-9 Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R	<i>tet A/C</i> ++	-/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 2S-6	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cb ^R Cm ^R Caz ^R Mer ^R	Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R	<i>tet A/C</i> ++	+ / + / +	~1500
<i>Pseudomonas</i> sp. 2S-8	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Cm ^R Fep ^R		<i>tet A/C</i> ++	-/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 2S-9	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Cb ^R	IncP-9 Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R	<i>tet A/C</i> ++	-/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 2T-67	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Fep ^R Mer ^R	HO	<i>tet A/C</i> ++	+ / + / +	~1000
<i>Pseudomonas</i> sp. 2T-108	Tc ^R Sm ^R Caz ^R Fep ^R Mer ^R	HO	<i>tet A/C</i> ++	+/-/-	
<i>Alcaligenes faecalis</i> 3R-2	Tc ^R Gm ^R Rif ⁺ Cm ^R		<i>tet A/C</i> ++ <i>tet Ribo</i> ++	-/-/-	
<i>Pseudomonas</i> sp. 3Cb-32	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Ak ^R Tob ^R Fep ^R	+	—	+ / + / +	~1000
<i>Pseudomonas</i> sp. 3Cb-33	Km ^R Tob ^R Caz ^R Fep ^R	+	—	+ / + / +	~2400
<i>Pseudomonas</i> sp. 3T-6	Tc ^R Tob ^R Caz ^R				
<i>Pseudomonas</i> sp. 3T-35	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Ak ^R Tob ^R Caz ^R Fep ^R	HO	—	+ / + / +	~1000
<i>Alcaligenes faecalis</i> 4C-8	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Rif ⁺ Caz ^R Fep ^R		<i>tet Ribo</i> ++	-/-/-	

Таблица 1. Окончание

Обозначение штамма*	Характеристика**	Плазмиды***	<i>tet</i> -гены	<i>int11/sul1/qacΔE1</i>	Размер кассеты, п.н.
<i>Pseudomonas</i> sp. 4Cb-25	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Ak ^R Tob ^R Caz ^R Fep ^R	IncN	<i>tet A/C</i> +/–	+ / + / +	~1200
<i>Pseudomonas</i> sp. 4G-3	Tc ^R Sm ^R Gm ^R Cb ^R Cm ^R	IncP-9 Tra ⁺ Tc ^R Sm ^R Gm ^R	<i>tet A/C</i> +/– <i>tet G</i> ++	+ / + / +	~1500
<i>Pseudomonas</i> sp. 4S-2	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Caz ^R Fep ^R		<i>tet G</i> ++	+ / + / +	~1500
<i>Pseudomonas</i> sp. 5Cb-1	Sm ^R Gm ^R Caz ^R Fep ^R Mer ^R	IncN	–	+ / + / +	~750
<i>Pseudomonas</i> sp. 5Cb-24	Km ^R Sm ^R Ak ^R Fep ^R Mer ^R	+	–	– / – / –	
<i>Pseudomonas</i> sp. 5Cb-35	Km ^R Sm ^R Ak ^R Tob ^R Fep ^R Mer ^R	+	–	– / – / –	
<i>Pseudomonas</i> sp. 5S-96	Tc ^R Km ^R Sm ^R Gm ^R Cm ^R Mer ^R Cb ^R	Tra ⁺ Sm ^R Gm ^R	<i>tet G</i> ++	+ / + / +	~1500

* В названии штамма первая цифра обозначает номер пробы, заглавная буква – антибиотик, на котором был изолирован штамм (С – хлорамфеникол, Сb – карбенициллин, Т – тетрациклин, G – гентамицин, К – канамицин, S – стрептомицин, R – рифампицин). ** Tc^R, Km^R – устойчивость к тетрациклину, канамицину, Cb^R – устойчивость к карбенициллину, Sm^R – устойчивость к стрептомицину, Cm^R, Gm^R, Rif^R – устойчивость к хлорамфениколу, гентамицину, рифампицину, Ak^R – устойчивость к амикацину, Tob^R – устойчивость к тобрамицину, Caz^R – устойчивость к цефтазидиму, Fep^R – устойчивость к цефепиму, Mer^R – устойчивость к меропенему. *** Tra⁺ – способность плазмид к конъюгационному переносу; HO – плазмиды не обнаружены.

логарифмической фазе роста, смешивали в соотношении 1 : 1 и наносили на нитроцеллюлозные фильтры (Synrog 6, размер пор 0.45 мкм, Чехия), помещенные на поверхность полноценной агаризованной среды. Бактерии инкубировали 12–18 ч при 30°C. Выросшие клетки смывали физиологическим раствором и высевали на селективные среды. Трансконъюганты тестировали на присутствие плазмид и гена *gfp*.

Нуклеотидную последовательность ампликонов определяли с помощью генетического анализатора ABI 3130 xl Analysis System (“Applied Biosystems”, США) по протоколу фирмы-производителя. Анализ идентичности нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изоляция и идентификация микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам. В апреле 2015 г. из Пушкинских очистных сооружений было отобрано 5 проб для выделения и анализа микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам. В состав очистных сооружений входят: решетки, песколовки, первичные отстойники, аэротенки, вторичные отстойники, си-

стема обеззараживания с помощью гипохлорита натрия, контактные резервуары, иловые площадки. Качество очистки сточных вод соответствует нормативу сброса сточных вод в водоемы рыбохозяйственного назначения (<https://www.pushchino-tvk.ru/>). Проба № 1 была отобрана из песколовки и представляла собой мутную, сильно загрязненную жидкость. Пробу № 2 отбирали из канала, по которому очищаемые стоки попадают в первичные отстойники. Проба № 3 была взята из аэротенка, проба № 4 – из вторичных отстойников. Проба № 5 отобрана после последнего этапа очистки и представляла собой прозрачную жидкость. Высевы из проб производили на богатую агаризованную среду (LA), содержащую один из следующих антибиотиков, относящихся к разным группам: карбенициллин (β-лактамы пенициллины); канамицин, стрептомицин и гентамицин (аминогликозиды); тетрациклин (тетрациклины); хлорамфеникол (левомицетин); рифампицин (ансампицины), в концентрациях, указанных в разделе “Материалы и методы исследования”.

Общая численность культивируемых микроорганизмов (КОЕ/мл образца) для каждой пробы, а также численность микроорганизмов, полученных методом прямого посева на индивидуальных анти-

Таблица 2. ПЦР праймеры, использованные в работе

Ген	Праймеры	Нуклеотидная последовательность	Размер ПЦР продукта, п.н.	Ссылка
<i>intI1</i>	intI1F intI1R	5'-CCTCCCGCACGATGATC-3' 5'-TCCACGCATCGTCAGGC-3'	280	Kraft et al., 1986
<i>sul1</i>	Sul1F Sul1B	5'-CTTCGATGAGAGCCGGCGGC-3' 5'-GCAAGGCGGAAACCCGCGCC-3'	437	Sandvang et al., 1997
<i>qacΔE1</i>	qacΔE1F qacΔE1B	5'-ATCGCAATAGTTGGCGAAGT-3' 5'-CAAGCTTTTGCCCATGAAGC-3'	228	
Генная кассета интегрона	5_-CS: intIF 3_-CS: intIB	5'-GGCATCCAAGCAGCAAGC-3' 5'-AAGCAGACTTGACCTGAT-3'	Вариабельный	
<i>sul2</i>	Sul2-F Sul2-B	5'-GCGCTCAAGGCAGATGGCATT-3' 5'-GCGTTTGATACCGGCACCCGT-3'	293	Kerrn et al., 2002
<i>tet A, C</i>	tetAC-150f tetAC-716r	5'-GCTRTATGCGTTGRTGCAAT-3' 5'-TCCTCGCCGAAAATGACC-3'	567	Yu et al., 2005
<i>tet G</i>	tetG-247f tetG-678r	5'-GTCGATTACACGATTATGGC-3' 5'-CACTTGGCCGATCAGTTGA-3'	432	
<i>tet M, O, P, Q, S, T, W</i>	Ribo2-FW Ribo2-RV	5'-GGMCAYRTGGATTTYWTIGC-3' 5'-TCIGMIGGIGTRCTIRCIGGRC-3'	1315	
IncN (rep)	IncN-rep-1 IncN-rep-2	5'-AGTTCACCACCTACTCGCTCCG-3' 5'-CAAGTTCTTCTGTTGGGATTCCG-3'	165	Götz et al., 1996
IncQ (<i>oriV</i>)	IncQ-oriV-1 IncQ-oriV-2	5'-CTCCCGTACTAAGTGCACG-3' 5'-ATCGACCGAGACAGGCCCTGC-3'	436	
IncW (<i>oriW</i>)	IncW-oriV-1 IncW-oriV-2	5'-GACCCGGAACCAAAAATA-3' 5'-GTGAGGGTGAGGGTGCTATC-3'	1140	
IncP-1 <i>trfA1</i>	trfA1-1 trfA1-2	5'-ATGACGACCAAGAAGCG-3' 5'-AACCCCCAGCCGGAAGT-3'	889	
IncP-9 <i>repAB</i>	repF repR	5'-CCAGCGCGGTACWTGGG-3' 5'-GTCGGCAICTGCTTGAGCTT-3'	554	Greated, Thomas, 1999
IncP-7 <i>rep</i> -область	Upper Lower	5'-CCCTATCTCACGATGCTGTA-3' 5'-GCACAAACGGTCGTCAG-3'	524	Измалкова и соавт., 2005

биотиках, представлена на рис. 1. Обнаружено, что если для одних антибиотикоустойчивых микроорганизмов обработка сточных вод приводила к значительному снижению численности, то для микроорганизмов, устойчивых к канамицину, стрептомицину и хлорамфениколу, общая численность была сходной во всех пяти пробах и составляла в среднем 10^3 – 10^4 клеток/мл образца (рис. 1). Небольшой рост, наблюдаемый в случае гентамицина, вероятно, связан с участием мобильных генетических элементов в распространении Gm^R-фенотипа (Schluter et al., 2007). Наиболее эффективно очистка сточных вод снижала количество микроорганизмов, устойчивых к карбенициллину, рифампицину и тетрациклину. Данный факт может быть связан с разложением молекулы

антибиотика в процессе очистки сточных вод, как в случае β-лактамов (Chaturvedi et al., 2021), с деградацией микробным консорциумом (Chaturvedi et al., 2021), а также с элиминацией генов антибиотикорезистентности, что было показано для *tet*-генов (Wen et al., 2016).

Выросшие на индивидуальных антибиотиках микроорганизмы (приблизительно по 100 резистентных штаммов с каждого антибиотика) методом перекрестных реплик проверялись на устойчивость к остальным вышеуказанным антибиотикам, а также к тобрамицину и амикацину (аминогликозиды II-го и III-го поколения соответственно); цефтазидиму и цефепиму (β-лактамы цефалоспорины III-го и IV-го поколения соответственно) и меропенему (β-лактамы карба-

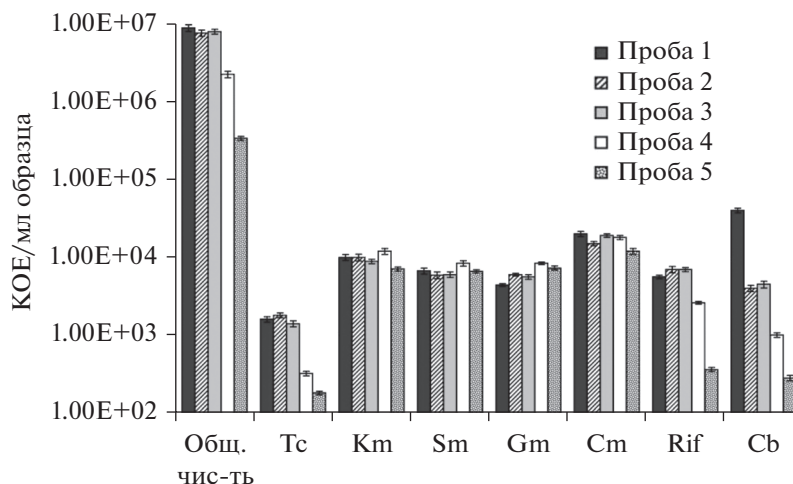


Рис. 1. Общая численность микроорганизмов (КОЕ/мл образца) и общая численность антибиотикоустойчивых микроорганизмов (КОЕ/мл образца), изолированных методом прямого высева из пяти проб очистных сооружений г. Пущино на разных стадиях очистки. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению от средних значений измерений в трех повторностях (4–10% в зависимости от степени загрязненности пробы). Обозначения: Tc – тетрациклин, Km – канамицин, Sm – стрептомицин, Rif – рифампицин, Gm – гентамицин, Cm – хлорамфеникол, Cb – карбенициллин.

пенемы). Всего было проверено 784 штамма. Среди общего числа перекрестно проверенных штаммов, 66% были устойчивы к карбенициллину, 45% – к канамицину, 48% – к стрептомицину, 41% – к амикацину, 29% – к тобрамицину, 35% – к хлорамфениколу, 33% – к рифампицину, 38% – к гентамицину, 15% – к тетрациклину. Наименьшее количество штаммов оказалось устойчиво к цефалоспорином III и IV поколения (10% к цефтазидиму и 8% к цефепиму) и карбапенемам (2% к меропенему). Большинство исследованных штаммов (65%) оказались мультирезистентными и обладали устойчивостью к трем (21%) и более (до девяти – 1.6%) антибиотикам. В среднем 40% устойчивых изолятов росли на селективной среде для выделения псевдомонад, 18.5% флуоресцировали на среде King B. Всего было получено 167 фенотипов резистентности из 784 исследуемых штаммов.

Некоторые штаммы, устойчивые к трем и более антибиотикам (96 фенотипов резистентности), идентифицировали с использованием масс-спектрометрической системы MALDI Biotyper. Наиболее часто встречающимися культивируемыми антибиотикоустойчивыми микроорганизмами в очистных сооружениях г. Пущино были бактерии родов *Pseudomonas* (53% идентифицированных штаммов) и *Alcaligenes* (8%). Также были обнаружены представители родов *Aeromonas* и *Serratia*. Наиболее интересные штаммы представлены в табл. 1. Полученные данные не отражают реальный видовой состав популяции, тем не менее, они являются предварительной иллюстрацией встречаемости культивируемых форм резистентных микроорганизмов. В дополнение стоит отметить, что при

анализе сезонных колебаний микробных сообществ очистных сооружений провинции Чжэцзян восточного Китая методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 гипервариабельных участков генов 16S рРНК показано высокое содержание псевдомонад (15.71%) именно в весенних пробах (Zhang et al., 2018).

Исследование разнообразия генов устойчивости к тетрациклину (tet) у резистентных микроорганизмов. Тетрациклины представляют собой группу соединений, к которой относятся как природные (тетрациклин, хлортетрациклин, окситетрациклин), так и полусинтетические (доксициклин, миноциклин) антибиотики. В настоящее время антибиотики тетрациклинового ряда, благодаря их высокой биологической активности, являются одними из наиболее широко применяемых препаратов в здравоохранении, сельском хозяйстве, животноводстве и рыбоводстве. Поскольку тетрациклины плохо усваиваются в организме человека и животных, их значительная часть попадает в сточные воды с отходами жизнедеятельности, провоцируя рост численности резистентных бактерий (Li et al., 2016). Штаммы, изолированные из очистных сооружений г. Пущино, методом ПЦР тестировали на наличие *tet*-генов, отвечающих за различные механизмы резистентности. По последним данным известно 62 гена, контролирующих резистентность микроорганизмов к тетрациклину (Roberts, 2020). Основными механизмами, обеспечивающими устойчивость к тетрациклину является активный вывод (эффлюкс) антибиотика из клеток и механизм защиты рибосомы, поскольку в основе антибактериального действия тетрациклинов лежит

подавление синтеза белка за счет ингибирования связывания аминоксил-тРНК с А-участком 30S субъединицы бактериальной рибосомы (Nguyen et al., 2014). Среди исследованных к настоящему времени *tet*-генов, гены, контролирующие эффлюкс-систему, в частности, ген *tetA*, являются преобладающими и представлены 35 классами (Nguyen et al., 2014; Roberts, 2020). В качестве маркерных генов в данной работе мы использовали гены *tetA*, *tetC* и *tetG*, контролирующие активный вывод тетрациклина из клеток, а также группу генов *tetRibo*: *tetM*, *tetO*, *tetB(P)*, *tetQ*, *tetS*, *tetT* и *tetW*, кодирующих белки, защищающие рибосому (Yu et al., 2005). Показано, что гены *tetA/tetC*, контролирующие активный вывод антибиотика из клетки, являются наиболее распространенными в штаммах из очистных сооружений г. Пушкино, тогда как гены, обеспечивающие защиту рибосомы, встречаются значительно реже и обнаружены только у представителей *Alcaligenes faecalis*, которые составляют всего 8% от исследованных штаммов (табл. 1). Следует отметить, что в то время как одни авторы считают гены эффлюкс-систем устойчивости к тетрациклинам преобладающими в сточных водах или активном иле, отмечая их более быстрое распространение в микробной популяции (Zang et al., 2011; Yu et al., 2015), другие обнаруживают доминирование генов, кодирующих защиту рибосомы, в частности, *tetW* и *tetM* (Wen et al., 2016; Svobodova et al., 2018). Возможно, это связано как с видовым составом микробных сообществ (например, самая большая группа тетрациклиновых эффлюкс-помп TetA–TetL чаще встречается у грамотрицательных бактерий), локализацией *tet*-генов в составе мобильных элементов, например, плазмид, так и с присутствующими в среде антибиотиками. Гены активного вывода, как правило, обеспечивают резистентность к тетрациклину, но гораздо менее эффективны в отношении антибиотиков второго поколения, таких как доксициклин и миноциклин, и практически не обеспечивают устойчивость к третьему поколению глициклинов (Nguyen et al., 2014).

Анализ штаммов, устойчивых к антибиотикам на наличие интегров класса 1. Ассоциация генов антибиотикорезистентности с мобильными генетическими элементами — плазмидами, транспозонами и интегронами, обеспечивает их быстрое распространение в микробной популяции. Ведущая роль в этом процессе принадлежит интегронам, которые представляют собой природные системы горизонтального переноса генов. Всего выделяют 5 классов интегров на основании гомологии последовательностей кодируемых ими интеграз, три из которых могут нести гены устойчивости к антибиотикам (Rowe-Magnus, Mazel, 2002). Однако большинство интегров антибиотикорезистентности относят к классу 1. Интегроны I-го типа

включают два концевых региона, называемых константными последовательностями (constant sequences, CS), и высоковариабельный центральный участок. В 5'-CS, обычно находятся ген интегразы (*intI*), сайт рекомбинации кассеты (*attI*), и промотор, с которого экспрессируются гены кассеты. Кассета представляет собой сегмент ДНК, содержащий открытые рамки считывания (ОРС) без промотора и уникальный рекомбинационный сайт *attC* (57–141 п.н.). В 3'-CS интегрона I-го типа находится чаще делетированный или полноразмерный вариант гена устойчивости к четвертичным аммониевым соединениям (*qacE/qacΔE1*), ген резистентности к сульфониламидам (*sul1*), и ген с неустановленной функцией (*orf5*) (рис. 2). Дополнительные факторы, такие как внедрение в состав транспозонов (часто ассоциированы с Tn21-семейством) и использование плазмид с широким кругом хозяев, позволяют интегронам множественной лекарственной устойчивости эффективно распространяться среди микроорганизмов различных систематических групп (Partridge et al., 2018). Быстрое изменение количества резистентных бактерий, содержащих интегроны I-го типа, в популяции в ответ на внешнее воздействие позволяет использовать ген интегразы, *intI1*, в качестве маркера антропогенного загрязнения антибиотиками (Gillings et al., 2014).

Коллекцию тестировали методом ПЦР в стандартных условиях на присутствие генов, ассоциированных с интегронами I-го типа: гена интегразы (*intI1*), генов устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям (*qacE/qacΔE1*) и гена резистентности к сульфониламидам (*sul1*), который часто находится в 3'-консервативной области. Штаммы, содержащие гены *intI1*, *qacE/qacΔE1* и *sul1*, составили четвертую часть от исследованных образцов. Двенадцать исследованных штаммов содержали кассеты генов резистентности к антибиотикам размером от 500 до 2400 п.н. (табл. 1).

Роль плазмид в распространении антибиотикорезистентности в очистных сооружениях г. Пушкино. Плазмиды, генетические внехромосомные элементы, способные к автономной репликации, являются идеальным транспортным средством для горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности, как обособленных, так и в составе транспозонов и интегров. Часто генетические детерминанты резистентности к различным антибиотикам могут локализоваться на одной и той же плазмиде. Плазмиды с мультирезистентностью обычно имеют размер более 50 т.п.н. и являются конъюгативными. Для доказательства плазмидной локализации генов резистентности проводили конъюгационные скрещивания 43 штаммов из очистных сооружений г. Пушкино, одновременно устойчивых к стрептомицину и тетрациклину, с использованием в качестве реципиента *P. putida* KT2442. В результате скрещиваний были получе-

(Schluter A. et al., 2007), в штаммах из очистных сооружений города Пушкино плазмид данной группы обнаружено не было. Также не было обнаружено плазмид IncP-4 (IncQ), IncP-7 и IncW. У четырех штаммов *Pseudomonas* sp. 1T-31, 1T-50, 4Cb-25, 5Cb-1 обнаружены IncN плазмиды. Плазмиды группы несовместимости N, несмотря на относительно небольшой размер (около 50 т.п.н.), являются конъюгативными и часто содержат транспозоны или интегроны класса I (Partridge et al., 2018). В составе ряда IncN плазмид были обнаружены гены резистентности к цефалоспорином III и IV поколений, а также карбапенемам (*bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M} и *bla*_{IMP}) (Caratolli et al., 2013). Штаммы *Pseudomonas* sp. 1T-31, 1T-50, 4Cb-25, 5Cb-1 устойчивы к цефтазидиму и/или к цефепиму, а 5Cb-1 также и к меропенему, однако связано ли это с наличием в штаммах IncN плазмид еще предстоит выяснить.

Семь штаммов *Pseudomonas* spp., изолированных на разных стадиях очистки (*P. lundensis* 1G-10, *Pseudomonas* sp. 1G-5, *P. lundensis* 1S-2, *P. fragi* 2G-2, *Pseudomonas* sp. 2G-7, *Pseudomonas* sp. 2S-9, *Pseudomonas* sp. 4G-3), содержат плазмиды группы несовместимости P-9 (табл. 1). Эксперименты по конъюгационному переносу в рецепиентный штамм *P. putida* KT2442 и ПЦР-анализ полученных трансконъюгантов показали, что, по крайней мере, три IncP-9 плазмиды (p2G-7, p2S-9 и p4G-3) являются конъюгативными и несут детерминанты устойчивости к тетрациклину (*tetA/tetC*), стрептомицину и гентамицину. Плазида p4G-3 также содержит в своем составе интегрон класса I, размер кассеты составляет около 1500 п.н. (табл. 1). Выделение плазмидной ДНК показало, что трансконъюганты действительно содержат P-9 плазмиды размером около 100 т.п.н. Плазмиды биодegradации IncP-9 группы широко распространены среди почвенных псевдомонад, однако плазмид резистентности этой группы описано крайне мало.

Анализ *rep*-генов плазмид антибиотикорезистентности IncP-9 группы. Невозможность сосуществования в одной клетке плазмид со сходной организацией областей, ответственных за репликацию и стабильное поддержание (так называемого базового репликона), послужило основой для традиционной системы классификации плазмид по группам несовместимости. К настоящему времени у псевдомонад описаны плазмиды, принадлежащие к 14 различным группам, 13 из которых связаны с распространением детерминант устойчивости к антибиотикам (Boropin, 1992). Представителей IncP-9 группы, помимо фенотипического разнообразия, характеризует вариабельность организации областей инициации репликации. В настоящее время известно по крайней мере 9 подгрупп IncP-9, которые выделены на основании

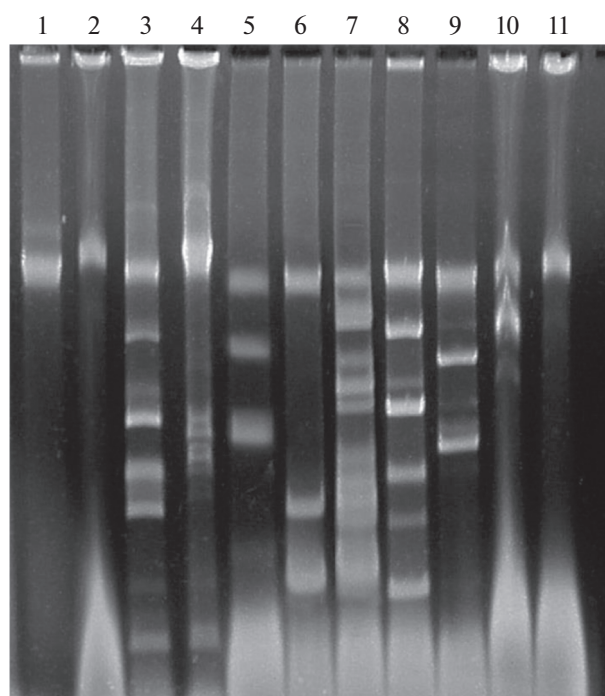


Рис. 3. Плазмидный профиль штаммов, изолированных из очистных сооружений г. Пушкино: 1 – 1Cb-36, 2 – 1T-27, 3 – 1T-31, 4 – 1T-50, 5 – 4Cb-25, 6 – 5Cb-24, 7 – 5Cb-35, 8 – 3Cb-32, 9 – 3Cb-33, 10 – 3T-6, 11 – 3T-35.

анализа *rep*-генов и *oriV*-сайтов (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ и ι) (Sevastyanovich et al., 2008). Для определения места плазмид антибиотикорезистентности из очистных сооружений г. Пушкино в системе классификации IncP-9, были определены нуклеотидные последовательности ампликонов *rep*-генов штаммов *P. lundensis* 1G-10 (MK820708), *Pseudomonas* sp. 1G-5 (MK820707), *P. lundensis* 1S-2 (MK820709), *P. fragi* 2G-2e (MK820704), *Pseudomonas* sp. 2G-7 (MK820706), *Pseudomonas* sp. 2S-9 (MK820710), *Pseudomonas* sp. 4G-3 (MK820705).

Результаты кластерного анализа нуклеотидных последовательностей *rep*-генов плазмид группы несовместимости P-9, принадлежащим к различным подгруппам, который проводился при помощи программы MEGA (версия 7.0), показали, что IncP-9 плазмиды из очистных сооружений г. Пушкино относятся к ϵ -подгруппе (рис. 4). Данная подгруппа включает плазмиды антибиотикорезистентности и принадлежит к ветви pWWO, куда относятся плазмиды устойчивости к антибиотикам подгрупп α , ϵ и η , а также плазмиды деградации ксенобиотиков (подгруппы β и γ). Нуклеотидные последовательности ПЦР фрагментов *rep*-генов IncP-9 плазмид из очистных сооружений г. Пушкино полностью идентичны последовательности *rep*-гена мультирезистентной плазмиды pVIM_Pse-KSS14 штамма *P. putida* KSS14 (MF564291), несущей детерминанты устойчиво-

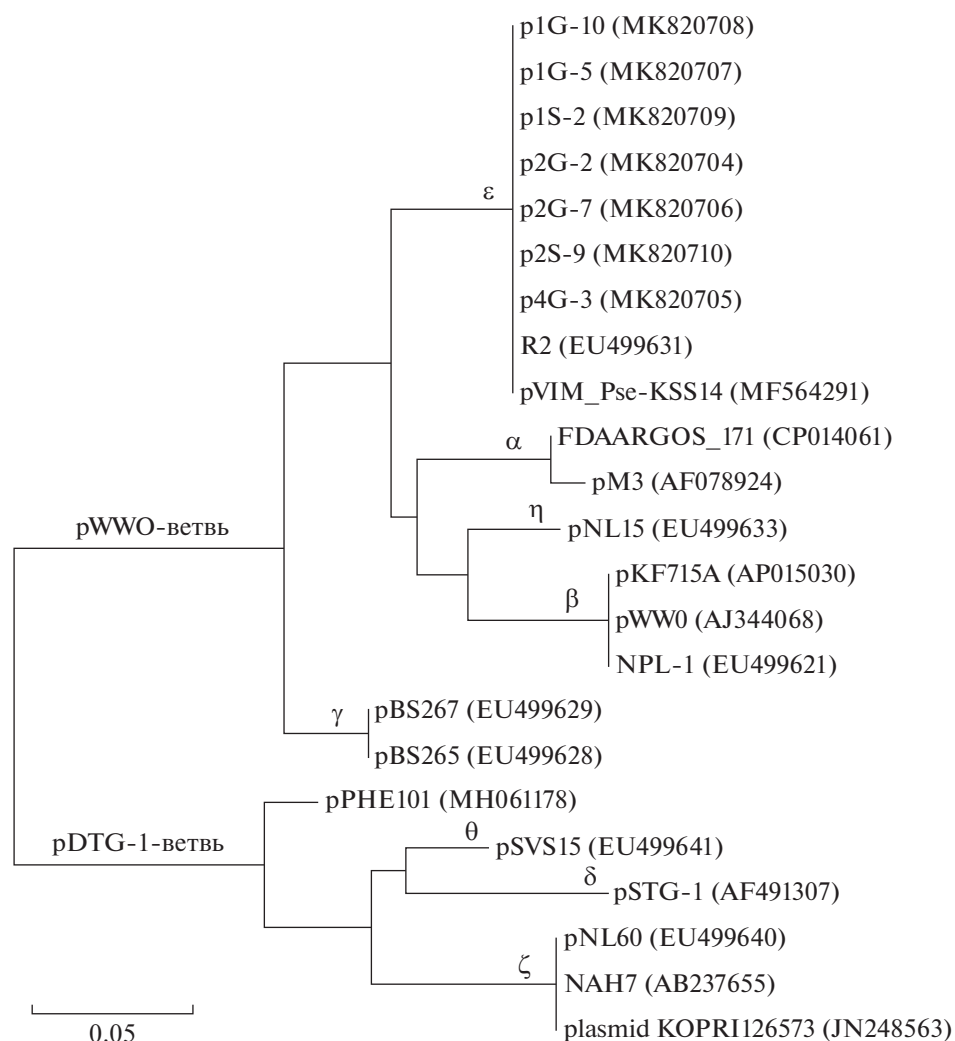


Рис. 4. Филогенетическое древо, иллюстрирующее эволюционные взаимоотношения между областями *rep*-генов плазмид группы несовместимости P-9, принадлежащим к различным подгруппам (α, β, γ, δ, ε, ζ, η, θ). Относительные дистанции и конечный график построены при помощи программы MEGA (версия 7.0), метод максимального правдоподобия, алгоритм Neighbor-Joining (ближайших соседей). Шкала соответствует оценке эволюционного расстояния в пять замен на 100 нуклеотидов.

сти в аминогликозидам (*aacA4* и *aadA1*), карбапенемам (*bla_{VIM-2}*) и фосфомицину (*fosE*) (Hong et al., 2018).

Принадлежность плазмиды к определенной группе несовместимости определяет не только круг ее бактериальных хозяев и потенциал распространения в определенных бактериальных популяциях, но и возможность совмещения различных признаков в одном штамме, а следовательно, косвенно обуславливает адаптивные возможности микроорганизмов к различным условиям окружающей среды. Нами впервые выделены IncP-9ε плазмиды резистентности к тетрациклину, стрептомицину и гентамицину, что говорит о широком распространении плазмид резистентности IncP-9ε и недооценке их

вклада в распространение генов множественной лекарственной устойчивости. Полученные данные расширяют наши представления о роли IncP-9 плазмид в переносе и распространении генов устойчивости к антибиотикам. Обнаружение мультирезистентных штаммов, интегронов I-го типа и плазмид с широким кругом хозяев указывает на высокую скорость горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам на всех стадиях очистки в очистных сооружениях г. Пушкино и свидетельствует о потенциальной опасности увеличения детерминант антибиотикорезистентности в водной среде и необходимости мониторинга микробных сообществ водных экосистем.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. Плазмиды биodeградации нафталина и салицилата Р-7 группы несовместимости в штаммах флуоресцирующих псевдомонад // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 342–348.
- Izmalkova T.Yu., Sazonova O.I., Sokolov S.L., Kosheleva I.A., Boronin A.M. The P-7 incompatibility group plasmids responsible for biodegradation of naphthalene and salicylate in fluorescent pseudomonads // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 290–295.
- Ashbolt N.J., Amézquita A., Backhaus T., Borriello P., Brandt K.K., Collignon P., Coors A., Finley R., Gaze W.H., Heberer T., Lawrence J.R., Larsson D.G., McEwen S.A., Ryan J.J., Schönfeld J., Silley P., Snape J.R., Van den Eede C., Top E. Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance // Environ. Health Perspect. 2013. V. 121. P. 993–1001.
- Boronin A.M. Diversity of *Pseudomonas* plasmids: to what extent? // FEMS Microbiol Lett. 1992. V. 79. P. 461–467.
- Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance // Int. J. Med. Microbiol. 2013. V. 303. P. 298–304.
- Chaturvedi P., Giri B.S., Shukla P., Gupta P. Recent advancement in remediation of synthetic organic antibiotics from environmental matrices: Challenges and Perspective // Bioresour. Technol. 2021. V. 319. 124161.
- Dalkmann P., Broszat M., Siebe C., Willaschek E., Sakinc T., Huebner J., Amelung W., Grohmann E., Siemens J. Accumulation of pharmaceuticals, *Enterococcus*, and resistance genes in soils irrigated with wastewater for zero to 100 years in central Mexico // PLoS One. 2012. V. 7. e45397.
- De Bruyne K., Slabbinck B., Waegeman W., Vauterin P., De Baets B., Vandamme P. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning // Syst. Appl. Microbiol. 2011. V. 34. P. 20–29.
- Gillings M.R., Gaze W.H., Pruden A., Smalla K., Tiedje J.M., Zhu Y.G. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution // ISME J. 2015. V. 9. P. 1269–1279.
- Götz A., Pukall R., Smit E., Tietze E., Prager R., Tschäpe H., van Elsland J.D., Smalla K. Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 2621–2628.
- Greated A., Thomas C.M. A pair of PCR primers for IncP-9 plasmids // Microbiology (SGM). 1999. V. 145. P. 3003–3004.
- Hong J.S., Yoon E.-J., Song W., Seo Y.B., Shin S., Park M.-J., Jeong S.H., Lee K. Molecular characterization of *Pseudomonas putida* group isolates carrying *bla*_{VIM-2} disseminated in a university hospital in Korea // Microb. Drug Resist. 2018. V. 24. P. 627–634.
- Kraft C.A., Timbury M.C., Platt D.J. Distribution and genetic location of Tn7 in trimethoprim-resistant *Escherichia coli* // J. Med. Microbiol. 1986. V. 22. P. 125–131.
- Kerrn M.B., Klemmensen T., Frimodt-Møller N., Espersen F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance // J. Antimicrob. Chemother. 2002. V. 50. P. 513–516.
- Larsson D.G.J., de Pedro C., Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals // J. Hazard. Mater. 2007. V. 148. P. 751–755.
- Li J., Zhang H., Chen Y., Luo Y., Zhang H. Sources identification of antibiotic pollution combining land use information and multivariate statistics // Environ. Monit. Assess. 2016. V. 188. P. 430.
- Nguyen F., Starosta A.L., Arenz S., Sohm D., Dönhöfer A., Wilson D.N. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms // Biol. Chem. 2014. V. 395. P. 559–575.
- Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance // Clin. Microbiol. Rev. 2018. V. 31. P. 1–61.
- Puckowski A., Mioduszevska K., Łukaszewicz P., Borecka M., Caban M., Maszkowska J., Stepnowski P. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review // J. Pharm. Biomed. Anal. 2016. V. 127. P. 232–255.
- Roberts M.C. Mechanism of resistance for characterized *tet* and *otr* genes. <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf> (modified: Feb 2020).
- Rowe-Magnus D.A., Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture // Int. J. Med. Microbiol. 2002. V. 292. P. 115–125.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sandvang D., Aarestrup F.M., Jensen L.B. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multi-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 160. P. 37–41.
- Schluter A., Szczepanowski R., Puhler A., Top E.M. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 449–477.
- Sevastyanovich Y.R., Krasowiak R., Bingle L.E.H., Haines A.S., Sokolov S.L., Kosheleva I.A., Leuchuk A.A., Titok M.A., Smalla K., Thomas C.M. Diversity of IncP-9 plasmids of

Pseudomonas // Microbiology (SGM). 2008. V. 154. P. 2929–2941.

Svobodová K., Semerád J., Petráčková D., Novotný Č. Antibiotic resistance in Czech urban wastewater treatment plants: microbial and molecular genetic characterization // Microb. Drug Resist. 2018. V. 24. P. 830–838.

Wen Q., Yang L., Duan R., Chen Z. Monitoring and evaluation of antibiotic resistance genes in four municipal wastewater treatment plants in Harbin, Northeast China // Environ. Pollut. 2016. V. 212. P. 34–40.

Yu J., Liu D., Li K. Influence of tetracycline on tetracycline-resistant heterotrophs and *tet* genes in activated sludge process // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. P. 415–422.

Yu Z., Michel F.C., Hansen G., Jr., Wittum Th., Morrison M. Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 6926–6933.

Zhang B., Yu Q., Yan G., Zhu H., Xu X. Yang, Zhu L. Seasonal bacterial community succession in four typical wastewater treatment plants: correlations between core microbes and process performance // Sci. Rep. 2018. V. 8. 4566. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22683-1>

Zhang X.X., Zhang T. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. P. 2598–2604.

Antibiotic-Resistant Microorganisms and Multiple Drug Resistance Determinants in *Pseudomonas* Bacteria from Pushchino Water Treatment Facilities

I. A. Kosheleva¹, T. Yu. Izmalkova^{1,*}, O. I. Sazonova¹, T. V. Siunova¹, A. B. Gafarov¹, S. L. Sokolov¹, and A. M. Boronin¹

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center of Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: tatiz@ibpm.pushchino.ru

Received June 30, 2020; revised October 20, 2020; accepted October 28, 2020

Abstract—The work presents characterization of antibiotic-resistant strains isolated by direct plating of five samples collected at different treatment stages from the Pushchino water treatment facilities in April 2015. Primary analysis of resistance of the collection (~800 strains) to the following antibiotics was carried out: carbenicillin, kanamycin, streptomycin, amikacin, tobramycin, chloramphenicol, rifampicin, gentamicin, tetracycline, ceftazidime, cefepime, and meropenem. Antibiotic-resistant bacteria most common in the Pushchino water treatment facilities were found to belong to the genera *Pseudomonas* and *Alcaligenes*. Occurrence of tetracycline resistance genes was investigated, and predominance of the *tetA/tetC* genes responsible for active transport of this antibiotic from the cell were found to be predominant among the studied strains. The strains containing the genes associated with type I integrons (*intI1*, *qacE/qacΔE1*, and *su1*) constituted 25% of the studied ones. Four *Pseudomonas* strains were found to contain the IncN plasmids, while seven strains of this genus contained plasmids of the P-9 incompatibility groups (ε-subgroup). Three IncP-9 plasmids were conjugative and carried simultaneously the determinants of tetracycline, streptomycin, and gentamicin resistance, which has not been previously reported for the ε-subgroup IncP-9 plasmids.

Keywords: antibiotics, water treatment facilities, multiple drug resistance, plasmids, integrons, plasmid incompatibility groups

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА *rosR* НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*

© 2021 г. З. Р. Вершинина^а, *, О. В. Чубукова^а, Ю. М. Никоноров^а, Л. Р. Хакимова^а,
А. М. Лавина^а, Л. Р. Каримова^а, Ан. Х. Баймиев^а, Ал. Х. Баймиев^а

^аИнститут биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450098 Россия

*e-mail: zilyaver@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.

После доработки 20.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Кодируемый геном *rosR* регуляторный белок участвует в процессах, связанных с адаптацией клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* к изменяющимся условиям окружающей среды. Он влияет на экспрессию многих генов, связанных с синтезом экзополисахаридов, которые играют критическую роль в формировании биопленок бактериями на различных поверхностях. Целью данной работы являлось изучение влияния сверхэкспрессии гена *rosR* у ризобий *R. leguminosarum* на образование биопленок на инертных поверхностях и корнях гетерологичных растений-макросимбионтов путем получения рекомбинантных вариантов штаммов с дополнительной копией гена *rosR* под управлением промотора Pm. Проведенный анализ рекомбинантных штаммов показал, что дополнительные экспрессируемые копии гена *rosR* позволяли ризобиям преодолевать ингибирующее воздействие на биопленкообразование низких концентраций кальция в среде, воздействие протеаз, детергентов и более эффективно формировать биопленки на поверхности корней томата и клевера. Полученные результаты открывают перспективы для использования *rosR* в качестве инструмента как для повышения эффективности эндосимбиоза ризобий с бобовыми растениями, так и для формирования устойчивых ассоциативных взаимодействий с другими сельскохозяйственными культурами.

Ключевые слова: *Rhizobium leguminosarum*, ген *rosR*, доза гена, биопленка, растительно-микробное взаимодействие, клевер, томат

DOI: 10.31857/S0026365621020154

Одним из наиболее изученных взаимодействий между растениями и микроорганизмами является бобово-ризобияльный симбиоз. Ризобии — это граммотрицательные бактерии, формирующие азотфиксирующие клубеньки на корнях бобовых растений. Симбиоз растений с этими бактериями играет значительную роль в круговороте азота в биосфере, а бобовые растения являются одними из самых важных сельскохозяйственных растений в мире. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* в природе вступает в симбиоз с растениями клевера (*Trifolium* spp.) (Корусиńska et al., 2018). В свободноживущем состоянии этот микросимбионт подвергается воздействию, в том числе и негативному, различных факторов окружающей среды. Чтобы приспособиться к изменяющимся условиям существования, ризобии выработали ряд эффективных стратегий защиты, которые позволяют им выживать в почве. Важнейшей адаптационной формой развития этих беспоровых бактерий является фор-

мирование биопленок на различных поверхностях (Rinaudi et al., 2006; Rachwał et al., 2017).

Биопленки служат для многих бактерий физическим барьером от токсичных соединений и защитой от неблагоприятных условий окружающей среды. Кроме того, для клубеньковых бактерий (ризобий) биопленкообразование является фактором, определяющим конкурентоспособность штаммов ризобий в почвенных условиях. В этом процессе немаловажную роль играют экзополисахариды (ЭПС), биосинтез и функции которых для *R. leguminosarum*, в отличие, например, от *Sinorhizobium meliloti*, изучены на сегодняшний день недостаточно. У *R. leguminosarum* основной набор генов биосинтеза ЭПС (более 20 генов) образует кластер Pss-I в хромосоме (González et al., 2006; Вершинина и соавт., 2020). Данные о регуляции биосинтеза ЭПС в *R. leguminosarum* очень фрагментарны. До сих пор было описано лишь несколько регуляторных генов, участвующих в

этом процессе. К ним относятся гены *psiA* и *psrA*, расположенные на симбиотической мегаплазмиде (pSym), и гены *exoR*, *pssB*, *rosR* и *expR*, расположенные на хромосоме *R. leguminosarum* (Reeve et al., 1996; Janczarek et al., 1999; Janczarek, Skorupska, 2007; Edwards et al., 2009).

Регуляторный белок, кодируемый геном *rosR*, необходим для адаптации *R. leguminosarum* к изменяющимся условиям окружающей среды. Этот белок влияет на экспрессию многих генов, связанных с синтезом ЭПС и поверхностных компонентов клеточной стенки ризобий, выделением внеклеточных белков и другими процессами. Было показано, что RosR, массой 15.7 кДа, содержит структурный мотив “цинковый палец” C₂H₂, ответственный за связывание с промоторными областями таких генов, как *exoB*, *exoR*, *prsD*, *pssA*, *pssB*, *pssK* и *plyA* (Janczarek, Skorupska, 2007; Jaszek et al., 2014; Rachwał et al., 2017). Продукт гена *rosR* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* принадлежит к семейству регуляторов транскрипции Ros/MucR, которые участвуют в регуляции синтеза ЭПС у нескольких видов ризобий, включая *S. meliloti*, *Rhizobium etli* и *Agrobacterium tumefaciens* (D’Souza-Ault et al., 1993; Keller et al., 1995; Bittinger et al., 1997; Chou et al., 1998). Мутации в *rosR* и *mucR* влияют на образование биопленок как свободноживущих ризобий, так и на начальных этапах симбиоза с растениями-хозяевами. Так экспрессия гена *rosR* необходима *R. etli* не только для производства ЭПС, а также для колонизации и образования клубеньков на фасоли (*Phaseolus* spp.) (Bittinger et al., 1997). Мутантный по *rosR* штамм *R. leguminosarum* продуцирует значительно меньшее количество ЭПС, чем дикий тип, он более чувствителен к поверхностно-активным веществам (ПАВ), проявляет пониженную подвижность и образует не фиксирующие азот клубеньки на корнях клевера (Rachwał et al., 2015, 2016, 2017). Все эти данные свидетельствуют о том, что RosR является важным белком, участвующим в клеточных процессах на различных этапах становления и функционирования бобово-ризобиального симбиоза.

Целью данной работы являлось изучение влияния сверхэкспрессии *rosR* на образование биопленок рекомбинантными по данному гену штаммами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на инертных поверхностях и корнях гетерологичных растений макросимбионтов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и растения. В качестве объектов были использованы штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy12 и VSy3 из коллекции клубеньковых и ризосферных бактерий “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН, выделенные из клубеньков дикорастущего бобового растения Южного Урала горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.). Бактерии культи-

вировали на среде YM (масс. % в водном растворе: маннитол — 1, дрожжевой экстракт — 0.04, NaCl — 0.01, MgSO₄ — 0.01, K₂HPO₄ · 3H₂O — 0.05) и RDM (Vincent, 1970) при оптимальной температуре 28°C.

Escherichia coli XL1-Blue выращивали на среде LB (масс. % в водном растворе: бактотриптон — 1, дрожжевой экстракт — 0.5, NaCl — 0.5) при температуре 37°C.

В качестве селективного антибиотика для трансформированных штаммов использовали ампициллин в конечной концентрации 100 мг/л (“Fisher scientific”, США). Экспрессию гена *rosR*, находящегося в составе плазмиды pJB658 под контролем индуцируемого промотора Pm, активировали 1 mM *m*-толуиловой кислотой (“Sigma Aldrich”, США).

В качестве макросимбионтов были выбраны клевер белый (*Trifolium repens* L.) сорта Ривендел (“DLF”, Дания) и томат сорта Грунтовый Грибовский 1180 (“СибНИИРС”, Россия). Выбор клевера белого был обусловлен тем, что фенотипические проявления штаммов, трансформированных дополнительной копией гена *rosR*, ранее изучались на растениях клевера. Это позволило провести сравнения активностей колонизации корней и образования биопленок полученных нами рекомбинантных штаммов с литературными данными. Выбор томата объясняется тем, что ранее была разработана система агробактериальной трансформации томата промышленного сорта Грунтовый Грибовский 1180 геном лектина гороха посевного *psl*, что позволило получить устойчивые корневые ассоциации этой важной для сельского хозяйства культуры с ризобиями, защищающими от фитопатогенных грибов (Вершинина и соавт., 2015). Кроме того, трансформация томата ризобияльным агглютинином RapA1 способствовала созданию эффективных симбиотических систем для фиторемедиации почв, загрязненных кадмием (Вершинина и соавт., 2019).

Получение генно-инженерной конструкции, несущей ген *rosR*, на основе вектора pJB658GFP. В рамках данного исследования были получены векторные конструкции на основе плазмиды широкого круга хозяев pJB658 с копийностью 5–7 на клетку (Blatny et al., 1997). В вектор pJB658 был клонирован ген зеленого флуоресцентного белка *gfp* под контролем конститутивного промотора T5. Для этого фрагмент ДНК, включающий промотор T5 и ген *gfp* был вырезан рестриктазой *Hind*III из полученного ранее вектора pJN105TurboGFP (Баймиев и соавт., 2011) и клонирован по аналогичному сайту в вектор pJB658 (рис. 1). Ризобии, трансформированные полученной плазмидой pJB658GFP, имели устойчивое зеленое окрашивание, что значительно облегчало отбор рекомбинантных штаммов и позво-

ляло отслеживать стабильность данной плазмиды в процессе культивирования бактерий.

Для секвенирования и амплификации полноразмерной последовательности гена *rosR* из *R. leguminosarum* VSy3 были использованы праймеры 5'-TACG-TACATATGACGGATATAGCGACCGGCAA-3' (с сайтом для рестриктазы *NdeI*), 5'-TACGATGAAT-TCTTCGCACGTTCTGACTGGCT-3' (с сайтом для рестриктазы *EcoRI*). Праймеры были подобраны к последовательности ДНК *R. leguminosarum* bv. *trifoli* штамм 24.1. (AY683453.1). Последующее секвенирование показало идентичность генов *rosR* для изучаемых штаммов ризобий. Амплификация проводилась с помощью высокоточной термостабильной ДНК полимеразы Q5 ("NEB", Великобритания). Размер полученного амплификата составил 564 п.н., который включал полноразмерную последовательность гена *rosR* и 111 п.н. из 3'-нетранслируемой области. Затем плазмиду pJB658GFP и ПЦР продукт расщепляли соответствующими рестрикционными эндонуклеазами *NdeI* и *EcoRI* ("NEB", Великобритания) и лигировали фрагменты ДНК с помощью T4 ДНК лигазы ("NEB", Великобритания) (рис. 1). Таким образом, в плазмиду pJB658GFP был направлен клонирован ген *rosR* под регуляцией индуцируемого промотора Pm. Полученная конструкция была проверена секвенированием, и в дальнейшем ей были трансформированы путем электропорации штаммы *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3.

Выделение бактериальной ДНК, подготовка компетентных клеток и их трансформация, а также электрофорез фрагментов ДНК проводились согласно (Sambrook et al., 1989).

Исследование уровня экспрессии гена *rosR* в контрольных и рекомбинантных штаммах методом ПЦР в реальном времени. РНК из бактерий выделяли с применением набора FastRNA Pro BlueKit ("MP Bio-medicals", США). Для активации экспрессии гена *rosR* культура клеток *R. leguminosarum* предварительно выращивалась в течение 1 сут на среде RDM с добавлением *m*-толуиловой кислоты (1 мМ) до OD₆₆₀ 0.9–1.0. Для построения кДНК использовали MMLV-ревертазу ("Евроген", Россия). Для постановки ПЦР в реальном времени использовали праймеры 5'-GTGGAAGTACAGCCGACATTG-3' и 5'-GTGACGCTTGAGGGACTTGAA-3'. В качестве референсного гена (housekeeping) был использован ген *recA*, кодирующий белок, необходимый для гомологичной рекомбинации, с праймерами 5'-GGC-GAGGGTGTTCCTCAAGAC-3' и 5'-GACGCTG-GCTGTTATAGGAGAAC-3' согласно исследованию (Rachwał et al., 2017). Для анализа относительного уровня экспрессии генов применяли 2-ΔΔCT метод (Livak, Schmittgen, 2001).

Анализ ризобияльных биопленок, формируемых на инертных поверхностях. Для получения биопленок использовали среды YM и RDM (Vincent,

1970) с применением 24-луночных пластиковых планшетов (полистирол) ("Corning Inc.", США). Для этого исходные и рекомбинантные штаммы *R. leguminosarum* выращивали 48 ч в жидкой среде на качалке при 28°C и 140 об./мин до концентрации 10⁸–10⁹ КОЕ/мл. Концентрация ризобий измерялась на спектрофотометре Benchmark Plus ("Biorad", США). Затем культуру разводили свежей средой до 10⁶ КОЕ/мл и переносили по 1 мл в лунки 24-луночного пластикового планшета. На данном этапе также добавляли ампициллин, индуктор *m*-толуиловую кислоту в случае трансформированных штаммов, а также хлорид кальция (Ca²⁺ 0–4.5 мМ) или додецилсульфат натрия (ДДС) (0.05%, об.) в экспериментах по влиянию Ca²⁺ и ДДС на относительное количество биомассы в биопленках. Планшеты герметизировали Parafilm ("Amcor", США) и инкубировали при температуре 18–37°C и 50 об./мин в течение 7 сут. После культивирования из лунок удаляли среду с планктонными клетками. Биопленки промывали 1 М фосфатносолевым буфером (PBS, pH 6.5), окрашивали 5 мин 0.1% об. раствором генциан фиолетового ("Агат-Мед", Россия) и осторожно промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в этаноле и измеряли оптическую плотность при длине волны 590 нм (O'Toole, Kolter, 1998). Оптическую плотность образцов измеряли с помощью прибора Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader ("PerkinElmer", США).

Исследование влияния бактерий на ростовые параметры растений. Семена растений в течение 1 мин стерилизовали в 70% спирте, а после – 20 мин в 5% растворе гипохлорита натрия. Далее семена были обработаны трехсуточными культурами ризобий, которые предварительно выращивали на качалках в жидкой среде RDM (перед инокуляцией плотность суспензии ризобий была измерена на спектрофотометре и доведена до 10⁵ КОЕ/мл). Затем инокулированные семена раскладывали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Часть семян оставили неинокулированными в качестве контроля. Неделью инкубировали при комнатной температуре и проводили расчет проросших и не проросших семян.

Для определения ростостимулирующего эффекта ризобактерий на корневую систему проростков измеряли длину корня опытных проростков и сравнивали с длиной контрольных проростков.

Исследование ростовых параметров и биомассы растений. Стерильные семена выращивали в течение 2 нед. в предварительно прокаленном вермикулите в условиях светоплощадки (освещение 5000 Лк, световой день 16 ч). После этого отмытые от вермикулита корни растений обрабатывали штаммами бактерий, которые выращивали до плотности OD₆₆₀ 0.75 при 28°C на среде RDM. Проростки

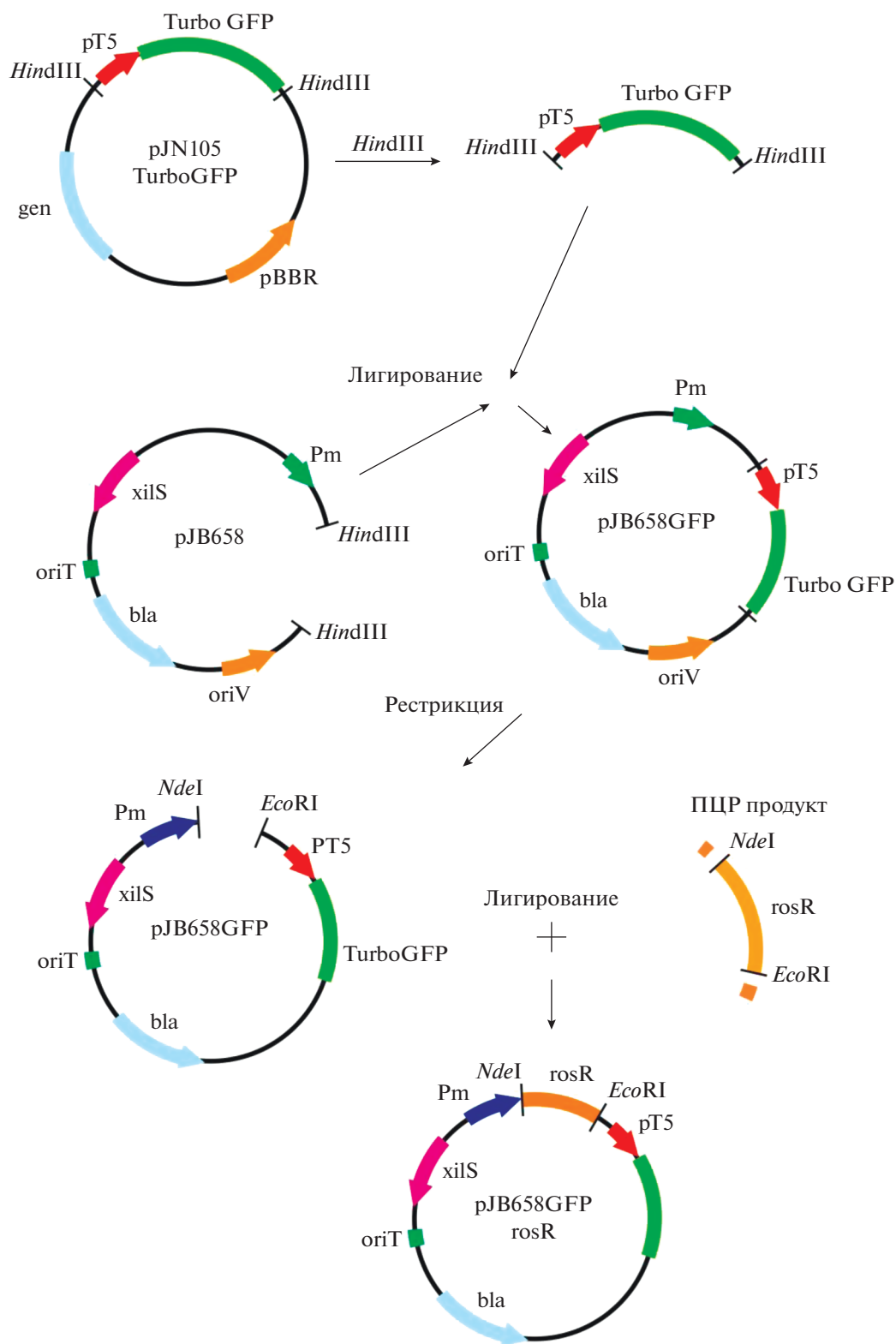


Рис. 1. Этапы получения генно-инженерных конструкций pJB658GFP и pJBGFPProSR для экспрессии генов *gfp* и *rosR* в клетках ризобий.

высаживали в торфяной грунт ("Terra Vita", Россия), прогретый в течение 1 ч при 70°C, и культивировали в теплице. Ростовые параметры и биомассу определяли после роста растений в течение 1 мес. Для анализа использовали по 50 проростков.

Микроскопирование корней растений и обработка корней протеазами. Стерильные семена проращивали в течение 1 нед. на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Далее проростки выдерживали при покачивании (25 об./мин) в суспензии ризобий (10^5 КОЕ/мл) в 50 мМ PBS (pH 7.2). Для приготовления суспензий использовали двухсуточные культуры бактерий, выращенные в жидкой среде RDM и отмытые от PBS. Через 3 ч проростки промывали стерильным PBS и помещали в пробирки, содержащие 10 мл жидкой среды MS (Murashige, Skoog, 1962). Растения выращивали в стерильных условиях 3 сут при 25°C и естественном освещении. Затем проростки однократно отмывали стерильным PBS (5 мин при покачивании 25 об./мин) и корни нарезали на фрагменты длиной 10–15 мм для микроскопирования или обработки протеазами.

Пепсин ("Sigma-Aldrich", США) растворяли в 10 мМ HCl до концентрации 10 мг/мл. Для эксперимента фермент разводили 1 : 1 дистиллированной водой, проводили через бактофильтр и выдерживали в этом растворе корни растений в течение 2 ч при 37°C. Для оценки количества адгезированных на корнях растений бактерий, фрагменты корней, предварительно взвесив, трижды отмывали стерильной водой по 5 мин на микрошейкере и гомогенизировали в 50 мкл среды RDM. Полученный объем разбавляли в 1000 раз и 50 мкл этой суспензии рассеивали на агаризованную RDM среду с ампициллином (100 мг/л) или без антибиотиков и выращивали в термостате при 28°C в течение 2 сут. Количество адгезированных бактерий определяли по числу выросших колоний.

Визуальное наблюдение меченых бактерий на корнях растений проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImagerM1 ("CarlZeiss", Германия).

Статистическая обработка результатов. На всех этапах исследования проводили не менее пяти независимых экспериментов как минимум в пяти повторностях. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение трансформированных штаммов бактерий и ПЦР в реальном времени. Для контроль-

ных и рекомбинантных по гену *rosR* штаммов был исследован уровень экспрессии гена *rosR* в условиях индукции Pm промотора и без индуктора методом ПЦР в реальном времени. Было показано, что относительное содержание мРНК гена *rosR* превышает таковое в контрольных штаммах более чем в 5–7 раз даже в отсутствии индуктора (рис. 2а). Этот факт может объясняться в данном случае присутствием, так называемого эффекта "протекания", т.е. неполным блокированием операторной области Pm промотора, в результате чего РНК-полимераза постоянно транскрибирует ген *rosR*, находящийся под контролем Pm промотора.

Отсутствие реакции на использование индуктора, выраженной в виде повышения экспрессии гена, требует дальнейшего изучения и может частично объясняться тем, что белок RosR распознает и связывается с мотивом RosR-box на хромосоме и негативно регулирует транскрипцию собственного гена *rosR* у изучаемых штаммов бактерий (Janczarek, Skorupska, 2007; Rachwał et al., 2017).

Подбор оптимальных условий для оценки эффективности биопленкообразования на инертных поверхностях. Была изучена эффективность образования биопленок дикими штаммами ризобий *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3 и штаммами, трансформированных плазмидой pJBGFProSR, на инертных поверхностях: 24-луночных пластиковых планшетах и пластиковых чашках Петри на различных питательных средах. Для формирования биопленок использовались углеводные, безбелковые среды YM и RDM. Проведенные исследования показали, что как контрольные, так и трансформированные бактерии эффективно образовывали биопленки на инертных поверхностях в обеих средах. Однако относительное количество биомассы в биопленках диких и трансформированных штаммов ризобий при культивировании на среде RDM превышало соответствующие показатели на среде YM более чем в два раза (рис. 2б, 2в).

Ранее было показано, что ризобии эффективнее образуют биопленки при росте в бедной на питательные вещества среде RDM, а не в более богатых средах, таких как LB или TY (Fujishige et al., 2006). Для ризобий формирование биопленок является стратегией выживания в условиях ограниченного питания, поскольку подобная организация клеток обеспечивает ряд преимуществ, таких как, например, повышение концентрации необходимых для роста питательных веществ, которые могут поглощаться поверхностью биопленки (Wimpenny, Colasanti, 1997; Rinaudi et al., 2006).

В статье Janczarek et al. (2009) было обнаружено, что введение дополнительной копии гена *rosR*, клонированного в плазмиду pBBR1MCS-2 под управлением собственного промотора, значитель-

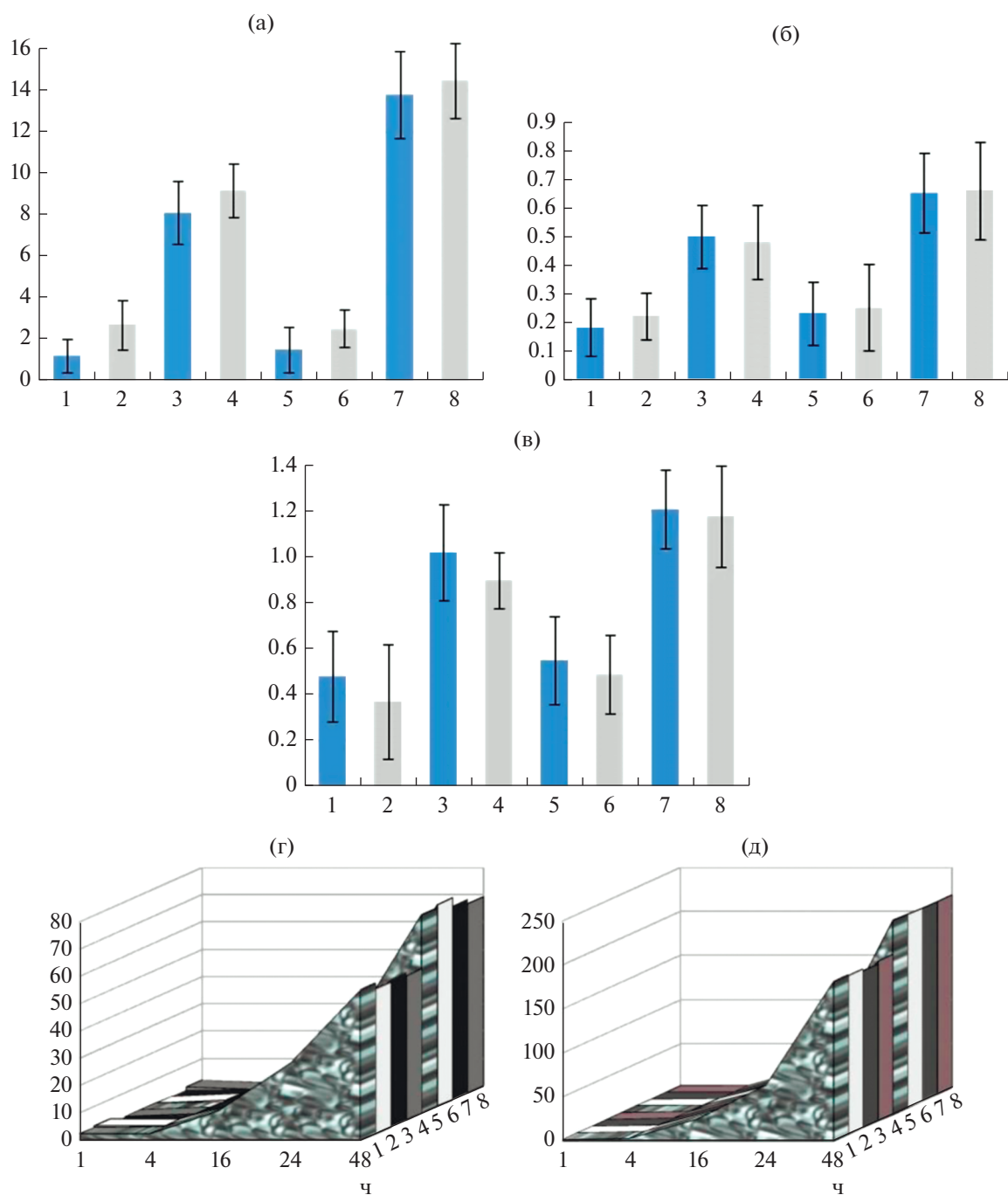


Рис. 2. (а) – Количественный ПЦР анализ уровня транскрипции гена *rosR*. По оси *Y* – условные единицы, обозначающие уровень транскрипции гена *rosR* в рекомбинантных штаммах относительно дикого штамма. (б, в) – Относительная биомасса биопленок исходных и трансформированных штаммов бактерий после 7 сут культивирования. По оси *Y* – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах; (б) – среда YM; (в) – среда RDM. (г, д) – Скорость роста штаммов на разных питательных средах. По оси *Y* – 10^7 КОЕ/мл; (г) – среда YM; (д) – среда RDM. Обозначения штаммов *R. leguminosarum* (1–8): 1 – VSy3; 2 – VSy3 при воздействии индуктора; 3 – VSy3 (pJBGFProsR); 4 – VSy3 (pJBGFProsR) при воздействии индуктора; 5 – VSy12; 6 – VSy12 при воздействии индуктора; 7 – VSy12 (pJBGFProsR); 8 – VSy12 (pJBGFProsR) при воздействии индуктора.

но увеличивает скорость роста ризобий. В настоящей работе не было зафиксировано разницы в скорости роста между трансформированными и контрольными бактериями, что, возможно, объясняется особенностями использованных в экспериментах штаммов или конструкции pJB658GFP и требует дальнейшего изучения (рис. 2г, 2д).

Влияние содержания кальция в питательной среде и температуры на образование биопленок исходными и трансформированными штаммами бактерий. Проведенные исследования выявили, что эффективность образования биопленок напрямую зависит от концентрации кальция Ca^{2+} в культуральной среде. Было показано, что добавление в среду 4.5 мМ Ca^{2+} увеличивает относительное количество биомассы в биопленках на 80% в среде YM и на 65% в среде RDM (рис. 3а). В связи с этим в экспериментах с воздействием температурного режима была использована концентрация Ca^{2+} в среде 4.5 мМ. Проведенные исследования показали зависимость биопленкообразования штаммов *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3 от температурных условий. Как контрольные, так и трансформированные бактерии эффективно образовывали биопленки при температуре 28°C. При культивировании в условиях более низкой температуры, способность штаммов формировать биопленки снижалась более чем в 2 раза. При повышении температуры до 38°C статистически значимых различий в эффективности формирования биопленок по сравнению со штаммами, выращенными при 28°C, найдено не было (рис. 3б).

Ранее было показано, что оптимальная концентрация Ca^{2+} для роста *S. meliloti* в RDM составляет 0.7 мМ (Flemming et al., 2000). Увеличение концентрации Ca^{2+} выше этого оптимума стимулировало биопленкообразование, незначительно ингибируя скорость размножения бактериальных клеток. Связано это с тем, что двухвалентные катионы, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , неспецифически связываются с отрицательно заряженными группами полисахаридных цепей ЭПС, тем самым обеспечивая большую стабильность образуемой биопленки (Flemming et al., 2000). Известно, что у бактерий Ca^{2+} принимает непосредственное участие не только в формировании внешнего липополисахаридного слоя и клеточной стенки, но и во многих процессах клеточного цикла и деления. Полученные в настоящей работе результаты объясняются тем, что снижение скорости размножения клеток могло способствовать образованию биопленок, как ответ на стресс, или, наоборот, изначальное присутствие высокого уровня Ca^{2+} могло стабилизировать ЭПС, способствуя формированию “зрелой” биопленки (Smith, 1995; Rinaudi et al., 2006).

Одним из критически важных абиотических факторов как для размножения ризобий, так и для формирования биопленок является температура.

Для большинства ризобий оптимум роста находится между 28 и 31°C, и многие не растут при 37°C. Несмотря на то, что экстремальные температуры отрицательно влияют на рост и биопленкообразование, существуют работы, описывающие устойчивые к высоким температурам штаммы ризобий (Rinaudi et al., 2006). Изучение устойчивости ризобий к повышенным или пониженным температурам необходимо для подбора оптимальных микросимбионтов для растений, обитающих в зоне пустынь и тундр. Штаммы *R. leguminosarum*, использованные в настоящей работе, растут и эффективно образуют биопленки при 37°C, что в сочетании с их ростостимулирующим эффектом открывает дополнительные перспективы для применения этих микросимбионтов для производства биоудобрений.

Анализ эффективности использования генов, регулирующих биосинтез ЭПС, для изменения биопленкообразования ризобий. Проведенные исследования выявили, что трансформация штаммов *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3 дополнительной копией гена *rosR* положительно влияет на эффективность образования биопленок. В экспериментах с трансформированными геном *rosR* штаммами относительное количество биомассы в биопленках увеличивалось в среднем в 1.4 раза по сравнению с контрольными штаммами (при 28°C и 4.5 мМ Ca^{2+} в среде). Полученные результаты также выявили, что использование индуктора Pm не влияет на этот показатель у трансформированных штаммов ризобий (рис. 2б, 2в, 3а–3в). Данный факт согласуется с результатами ПЦР в реальном времени, описанными выше (рис. 2а).

Ранее было показано, что дополнительные копии гена *rosR* увеличивают выработку ЭПС у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* в 1.5–2 раза. Объясняется это тем, что RosR положительно регулирует экспрессию гена *pssA*, кодирующего ключевой фермент в синтезе ЭПС. При этом интересно, что увеличение копий гена *pssA* не несет столь же положительного эффекта на количество ЭПС, как дополнительные копии гена *rosR* (Bittinger et al., 1997; Janczarek, Skorupska, 2007; Janczarek et al., 2009).

Анализ устойчивости исследуемых штаммов к ДДС показал, что данный детергент практически не влияет на образование биопленок трансформированными штаммами, хотя в случае контрольных штаммов относительное количество биомассы в биопленках уменьшалось в среднем в 2 раза (рис. 3в). Ранее было показано, что мутации в гене *rosR* приводят к повышенной чувствительности штаммов к воздействию детергентов, гипер- и гипосмотического стресса и бета-лактамов антибиотиков. Связано это, по всей видимости, с тем, что RosR регулирует синтез белков, участвующих в формировании клеточной мембраны. К таким белкам у

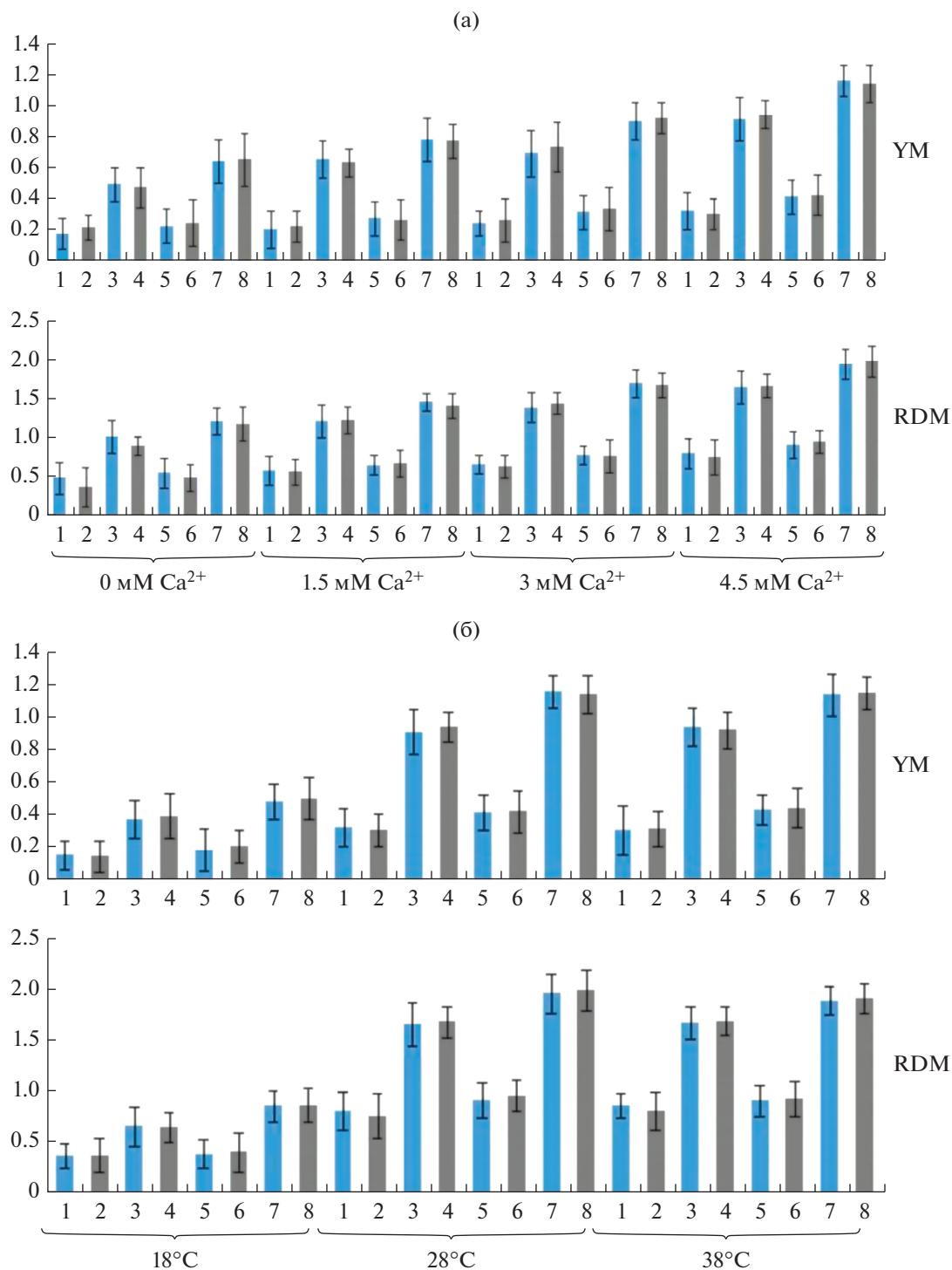


Рис. 3. Относительная биомасса биопленок исходных и трансформированных штаммов бактерий после 7 сут культивирования при 28°C в зависимости от: (а) — содержания Ca^{2+} (мМ) в среде; (б) — температуры (°C); (в) — ДДС (об. %). По оси Y — оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах. Обозначения штаммов *R. leguminosarum* (1–8) — как на рис. 2.

R. leguminosarum, например, относится RopA, RopA1 и RopB1. Экспрессия данных белков значительно снижается в мутантных по гену *rosR* штаммах (Janczarek et al., 2010).

Анализ уровня колонизации корней и образования биопленок, в том числе при воздействии протеаз. Штаммами *R. leguminosarum* VSy12 и VSy3, контрольными и трансформированными pJBGFP_{RosR},

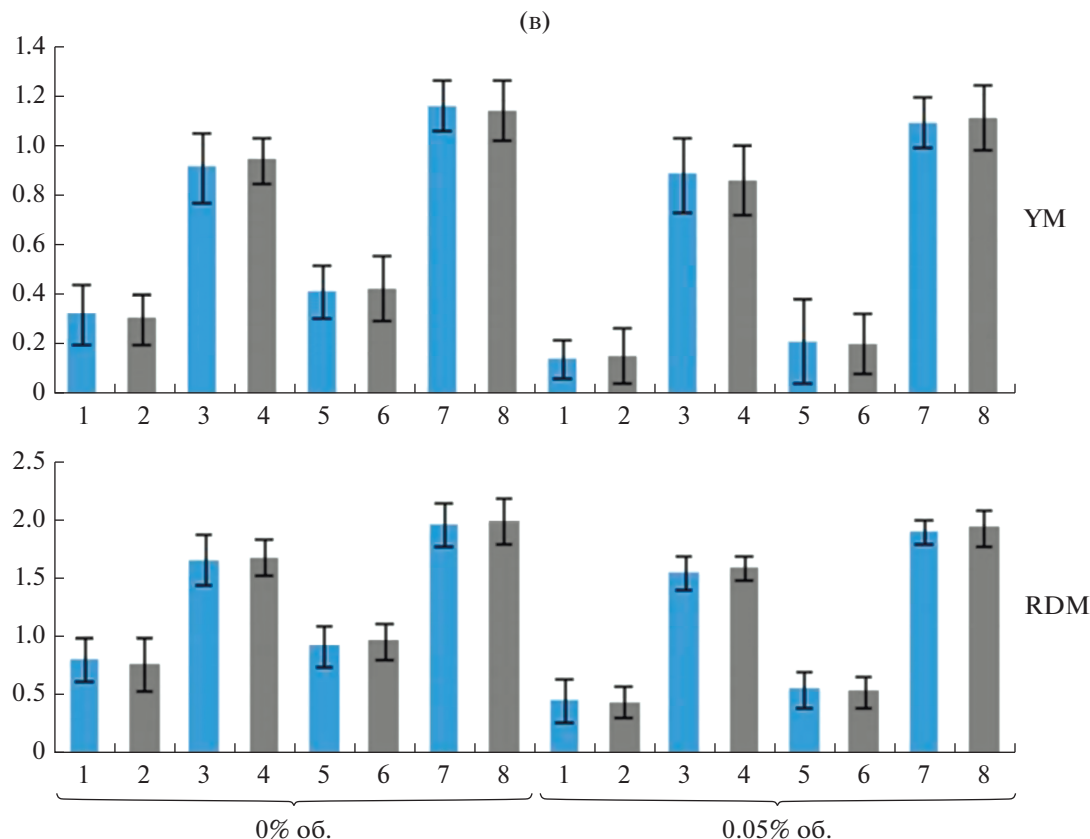


Рис. 3. Окончание

были обработаны растения клевера лугового. Было показано, что трансформация не оказывает существенного влияния на прорастание семян (рис. 4а), ростовые параметры (рис. 4б) и биомассу растений (рис. 4в) — разница с дикими типами штаммов не имела достоверных различий.

Анализ уровня колонизации корней после 7 сут совместного культивирования показал незначительное увеличение “заякорившихся” на корнях бактерий в случае трансформированных штаммов по сравнению с контрольными штаммами (рис. 5а). При этом через 3–4 сут микроскопирование выявило образование на корнях клевера и томата бактериальных агломераций и микроколоний преимущественно для трансформированных штаммов (рис. 5б). Также было показано, что штамм VSy12 образует биопленки преимущественно на поверхности корней растений, в отличие от VSy3, сродство которого выше к корневым волоскам (рис. 5в). Эксперимент по обработке протеазами выявил повышение устойчивости клеточных агломераций в случае трансформированных штаммов по сравнению с контрольными штаммами в среднем на 30% (рис. 5г).

Способность ризобияльных клеток прикрепляться к поверхности корней растений-макро-

симбионтов является критическим фактором взаимодействий, и ЭПС ризобий вносят существенный вклад в бактериальную адгезию (Rinaudi, Gonzalez, 2009). Ранее было показано, что трансформация *R. leguminosarum* bv. *trifolii* дополнительными копиями гена *rosR* приводит к повышению конкурентоспособности рекомбинантных ризобий по сравнению с дикими штаммами, почти в два раза (Bittinger et al., 1997; Janczarek, Skorupska, 2007; Janczarek et al., 2009). Мутантные по гену *rosR* штаммы образовывали значительно меньше клубеньков на корнях клевера красного; в отличие от диких штаммов, для них были характерны различные дефекты в образовании и развитии инфекционных нитей и низкая колонизация поверхности корня (Janczarek et al., 2010). Кроме очевидного влияния на выработку ЭПС ризобиями, полученные данные указывают на активацию белком RosR экспрессии ряда генов, непосредственно связанных с симбиозом (Janczarek, Skorupska, 2011). Немаловажным является и тот факт, что ЭПС играет защитную роль на ранних и поздних стадиях симбиотических взаимодействий, когда ризобии подвергаются окислительному стрессу со стороны растений-хозяев (Santos et al., 2001; Janczarek et al., 2009).

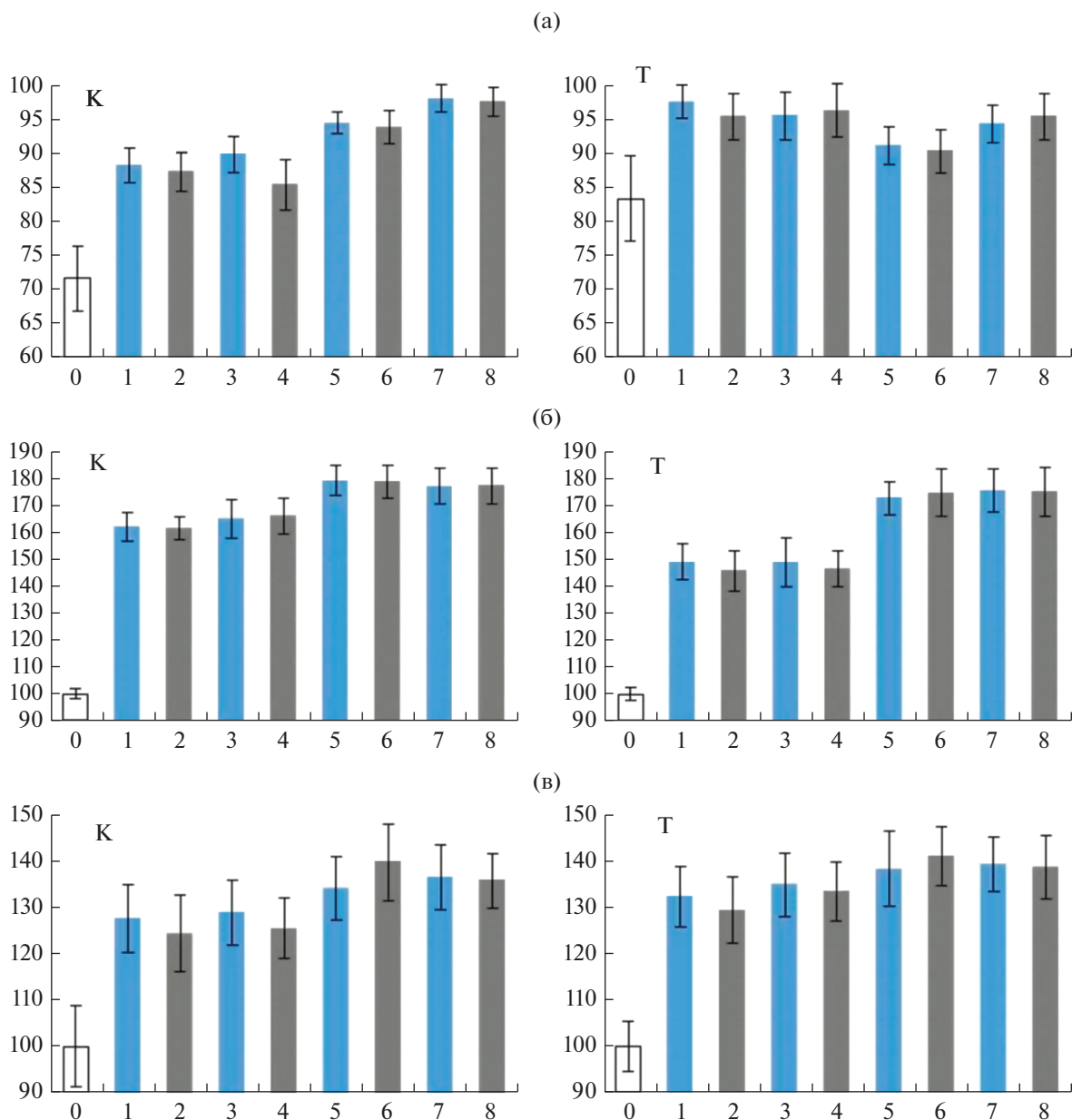


Рис. 4. Влияние исходных и трансформированных штаммов ризобий на: (а) — всхожесть семян растений (по оси ординат число проросших семян из 100 шт.); (б) — рост корней растений (по оси ординат изменение длины корней в %); (в) — биомассу растений (по оси ординат изменение сухой биомассы растений в %). К — клевер, Т — томат, 0 — без обработки бактериями. Обозначения штаммов *R. leguminosarum* (1–8) — как на рис. 2.

Таким образом, в данной работе впервые была получена генно-инженерная конструкция для экспрессии дополнительных копий гена *rosR* под управлением промотора Pm и изучена способность к симбиозу, в том числе и к ассоциативному, у трансформированных полученной плазмидой штаммов ризобий. Было показано, что клубеньковые бактерии с дополнительными копиями гена *rosR* отличались более эффективным образованием биопленок и обладали значительно большей способностью прилипать к различным поверхно-

стям, включая абиотические поверхности и корни макросимбионтов. Более того, было обнаружено, что повышенная экспрессия гена *rosR* и опосредованное им усиленное образование биопленок может защитить эти бактерии от протеаз, детергентов, а также способствовать выживанию ризобий при низком содержании питательных веществ в окружающей среде. Вследствие этого, использование генов, участвующих в образовании ЭПС ризобиями, в качестве трансгенов имеет перспективы не только для создания эффек-

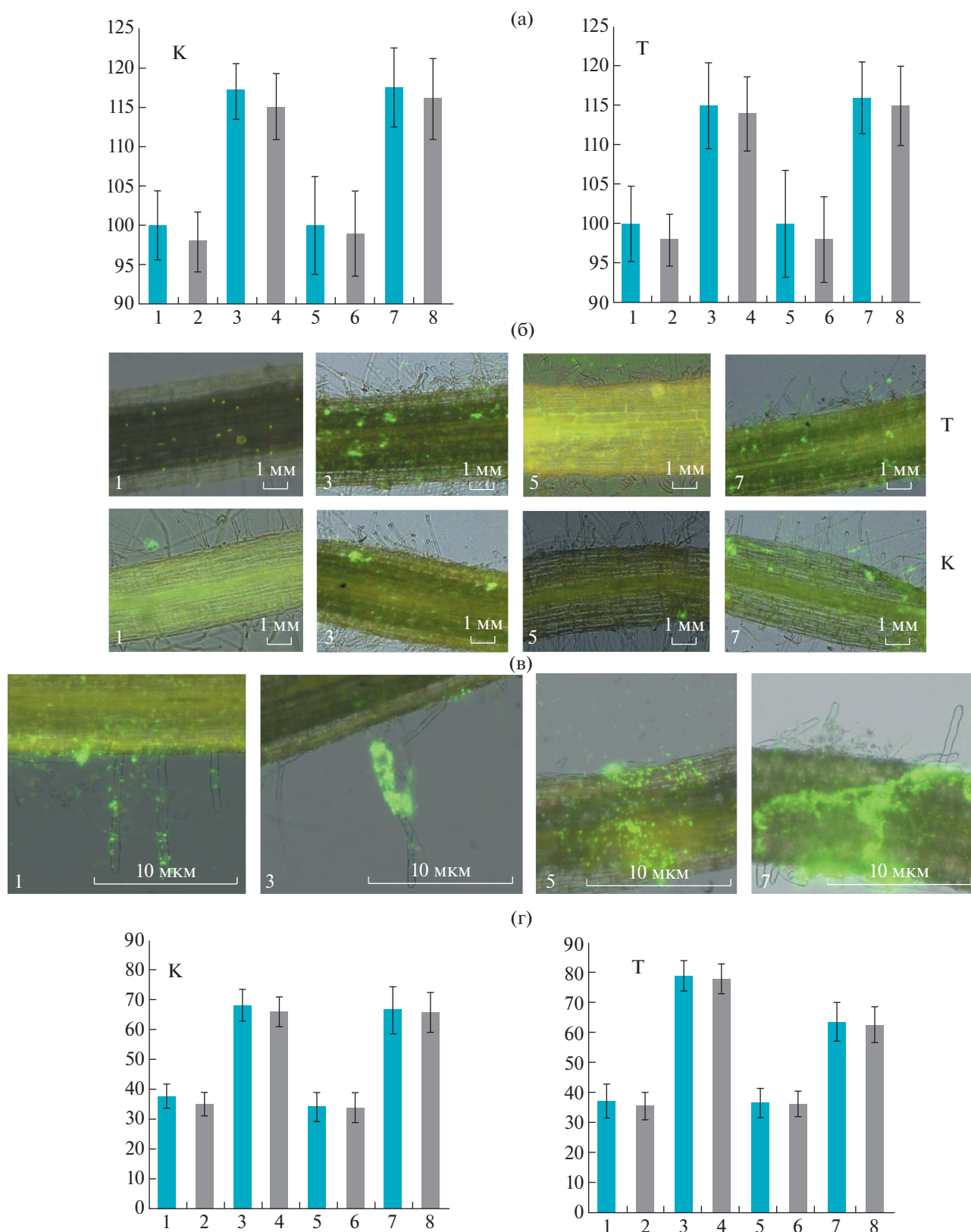


Рис. 5. Анализ колонизации корней бактериями после инокуляции исходными и трансформированными штаммами: (а) — число бактерий, “заякорившихся” на корнях (по оси ординат изменение числа бактерий в %); (б) — агглютинация штаммов на поверхности корней растений через 4 дня совместного культивирования; (в) — образование биопленок на поверхности корней растений томата через 7 дней совместного культивирования; (г) — анализ количества бактерий на корнях растений после обработки пепсином (по оси ординат изменение числа бактерий в % от исходного количества до обработки ферментом). К — клевер, Т — томат. Обозначения штаммов *R. leguminosarum* (1–8) — как на рис. 2.

тивных биоудобрений для бобовых растений, но и для конструирования ассоциативных взаимодействий ризобий с небобовыми растениями, которые могут найти применение в сельском хозяйстве и биоремедиации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена с привлечением приборного парка РЦКП «Агидель» УФИЦ РАН в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований 18-34-20004 мол_а_вед.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баймиев А.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* // Мол. биология. 2011. Т. 45. С. 984–991.
- Baymiev A.K., Yamidanov R.S., Matniyazov R.T., Blagova D.K., Chemeris A.V. Preparation of fluorescent labeled nodule bacteria strains of wild legumes for their detection *in vivo* and *in vitro* // Mol. Biol. (Moscow). 2011. V. 45. С. 904–910.
- Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Ассоциативный симбиоз трансгенных томатов с ризобиями повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* // Биотехнология. 2015. Т. 31. № 3. С. 42–53.
- Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Федяев В.В., Баймиев А.Х., Баймиев Ал.Х. Взаимодействие томатов (*Solanum lycopersicum* L.), трансформированных *rapAl*, с бактериями *Pseudomonas* sp. 102, устойчивыми к высоким концентрациям кадмия, как основа эффективной симбиотической системы для фиторемедиации // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 2. С. 38–48.
- Вершинина З.Р., Лавина А.М., Чубукова О.В. Экзополисахариды *Rhizobium leguminosarum* – краткий обзор // Биомика. 2020. Т. 12. С. 27–49.
- Bittinger M.A., Milner J.L., Saville B.J., Handelsman J. *RosR*, a determinant of nodulation competitiveness in *Rhizobium etli* // Mol. Plant-Microbe Interact. 1997. V. 10. P. 180–186.
- Blatny J.M., Brautaset T., Winther-Larsen H.C., Karunkaran P., Valla S. Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria // Plasmid. 1997. V. 38. P. 35–51.
- Chou A.Y., Archdeacon J., Kado C.I. *Agrobacterium* transcriptional regulator *Ros* is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene *ipt* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 5293–5298.
- D'Souza-Ault M.R., Cooley M.B., Kado C.I. Analysis of the *Ros* repressor of *Agrobacterium virC* and *virD* operons: molecular intercommunication between plasmid and chromosomal genes // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 3486–3490.
- Fleming H.C., Wingender J., Griegbe T., Mayer C. Physicochemical properties of biofilms // Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control / Ed. Evans L.V. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000. P. 19–34.
- Fujishige N.A., Kapadia N.N., DeHoff P.L., Hirsch A.M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation // FEMS Microbiol. Ecol. 2006. V. 56. P. 195–206.
- González V., Santamaría R.I., Bustos P., Hernández-González I., Medrano-Soto A., Moreno-Hagelsieb G., Chandra Janga S., Ramírez M.A., Jiménez-Jacinto V., Collado-Vides J., Dávila G. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3834–3839.
- Janczarek M., Krol J., Skorupska A. The *pssB* gene product of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is homologous to a family of inositol monophosphatases // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 173. P. 319–325.
- Janczarek M., Skorupska A. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *RosR*: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production // Mol. Plant-Microbe Interact. 2007. V. 20. P. 867–881.
- Janczarek M., Jaroszk-Ścisł J., Skorupska A. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Antonie van Leeuwenhoek. 2009. V. 96. P. 471–486.
- Janczarek M., Kutkowska J., Piersiak T., Skorupska A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. 284.
- Janczarek M., Skorupska A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* by phosphate and clover root exudates // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 4132–4155.
- Jaszek M., Janczarek M., Kuczyński K., Piersiak T., Grzywnowicz K. The response of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* wild-type and exopolysaccharide-deficient mutants to oxidative stress // Plant and Soil. 2014. V. 376. P. 75–94.
- Keller M., Roxlau A., Weng W.M., Schmidt M., Quandt J., Niehaus K., Jording D., Arnold W., Pühler A. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan // Mol. Plant-Microbe Interact. 1995. V. 8. P. 267–277.
- Kopycińska M., Lipa P., Cieślak J., Kozieł M., Janczarek M. Extracellular polysaccharide protects *Rhizobium leguminosarum* cells against zinc stress *in vitro* and during symbiosis with clover // Environ. Microbiol. Rep. 2018. V. 10. P. 355–368.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.

- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 28. P. 449–461.
- Rachwał K., Matczyńska E., Janczarek M. Transcriptome profiling of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* mutant reveals the role of the transcriptional regulator RosR in motility, synthesis of cell-surface components, and other cellular processes // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. Art. 1111. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2332-4>
- Rachwał K., Boguszewska A., Kopcińska J., Karaś M., Tchorzewski M., Janczarek M. The regulatory protein RosR affects *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* protein profiles, cell surface properties, and symbiosis with clover // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 1302. P. 1–21.
- Rachwał K., Lipa P., Wojda I., Vinardell J.M., Janczarek M. Regulatory elements located in the upstream region of the *Rhizobium leguminosarum* *rosR* global regulator are essential for its transcription and mRNA stability // *Genes.* 2017. V. 8. Art. 388.
- Reeve W.G., Dilworth M.J., Tiwari R.P., Glenn A.R. Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710 involves *exoR* // *Microbiol. (SGM).* 1996. V. 143. P. 1951–1958.
- Rinaudi L., Fujishige N.A., Hirsch A.M., Banchio E., Zorreguieta A., Giordano W. Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation // *Res. Microbiol.* 2006. V. 157. P. 867–875.
- Rinaudi L.V., Gonzalez J.E. The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. P. 7216–7224.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
- Santos R., Herouart D., Sigaud S., Touati D., Puppo A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2001. V. 14. P. 86–89.
- Smith R.J. Calcium and bacteria // *Adv. Microb. Physiol.* 1995. V. 37. P. 83–133.
- Vincent J.M. *A manual for practical study of root nodule bacteria.* IBP Handbook No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publishers, 1970. 164 p.
- Wimpenny J.W.T., Colasanti R.A. A unifying hypothesis for the structure of microbial films based on cellular automation models // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1997. V. 22. P. 1–16.

Effect of the *rosR* Gene Overexpression on Biofilm Formation by *Rhizobium leguminosarum*

Z. R. Vershinina^{1,*}, O. V. Chubukova¹, Yu. M. Nikonorov¹, L. R. Khakimova¹, A. M. Lavina¹, L. R. Karimova¹, An. Kh. Baimiev¹, and Al. Kh. Baimiev¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450098 Russia*

*e-mail: zilyaver@mail.ru

Received September 2, 2020; revised November 20, 2020; accepted November 30, 2020

Abstract—The regulatory protein encoded by the *rosR* gene is involved in the processes of adaptation of root nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum* to changes in environmental conditions. It affects the expression of a number of genes associated with the synthesis of exopolysaccharides, which play a critical role in formation of bacterial biofilms on various surfaces. The goal of this work was to study the effect of overexpression of the *rosR* gene on formation of *R. leguminosarum* biofilms on inert surfaces and roots of heterologous plant hosts by obtaining recombinant strains with an additional copy of the *rosR* gene under the control of the Pm promoter. Our analysis of recombinant strains showed that additional expressed copies of the *rosR* gene allowed rhizobia to overcome the inhibitory effect on biofilm formation of low calcium concentrations in the medium, the effect of proteases and detergents, and to form biofilms more efficiently on the surface of tomato and clover roots. The results obtained open up prospects for using *rosR* as a tool both for increasing the efficiency of endosymbiosis of rhizobia with legumes, and for the formation of stable associative interactions with other agricultural crops.

Keywords: *Rhizobium leguminosarum*, *rosR* gene, gene dosage, biofilm, plant–microbe interaction, clover, tomato

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

**PANTOEAE BRENNERI AS3 И BACILLUS GINSENGIHUMI M2.11
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ
И СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ**

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

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

*e-mail: laia9301@mail.ru

Поступила в редакцию 19.07.2020 г.

После доработки 10.10.2020 г.

Принята к публикации 11.11.2020 г.

Исследовали механизмы биоконтрольного действия штаммов *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11. Установлена способность штаммов к выделению ионов аммония и цианидов, целлюлазной и протеазной активности, фиксации азота, а также к мобилизации почвенных фосфатов и фитатов. Выявлена способность штаммов к синтезу сидерофоров, максимальная продукция которых обнаружена на 48 ч культивирования и составляла 198 ± 8 мкМ у штамма *B. ginsengihumi* M2.11 и 84 ± 7 мкМ у штамма *P. brenneri* AS3. Бактерии продуцировали фитогормон — индолилуксусную кислоту (ИУК), выход которой на 24 ч роста составил 34 ± 3 мкг/мл у *B. ginsengihumi* M2.11 и 29 ± 2 мкг/мл у *P. brenneri* AS3. Установлено, что оба штамма обладали фунгицидной активностью против фитопатогенов рода *Fusarium*: рост представителей разных видов *Fusarium* подавлялся более чем на 90% в присутствии бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11. Сделано заключение, что обладая множественными полезными для растений характеристиками, штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 могут быть использованы в качестве объектов для создания технологий биоудобрений и стимуляторов роста растений.

Ключевые слова: *Pantoea*, *Bacillus*, биологическая активность, сидерофоры, ИУК, фунгицидная активность

DOI: 10.31857/S0026365621020063

Борьба с заболеваниями растений, вызванными фитопатогенными микроорганизмами, является главным направлением в развитии агробиотехнологии для увеличения качества и урожайности возделываемых культур. Поиск новых метаболитов микробиологического происхождения, обладающих фунгицидным действием, направлен на создание экологически безопасного производства средств защиты растений и продуктов сельского хозяйства, поскольку использование химических пестицидов и фунгицидов связано с загрязнением окружающей среды и нарушением естественного баланса микрофлоры почвы (Veliz et al., 2017). Кроме того, присутствие остатков пестицидов и фунгицидов на пищевых продуктах может оказывать неблагоприятное воздействие на здоровье человека, в связи с чем становится очевидной необходимость в использовании новых эффективных агентов биологического контроля (Norovsuren et al., 2018).

Все большую значимость приобретает применение бактериальных удобрений на основе ассоциативных ризобактерий, стимулирующих рост

растений (plant growth-promoting rhizobacteria — PGPR), которые являются неотъемлемой частью ризосферной биоты (Muller et al., 2017). В связи с высокой адаптацией в широком диапазоне активных сред, быстрым темпом роста и биохимической универсальностью метаболизма, ризобактерии рассматриваются как необходимый компонент в управлении сельскохозяйственной агрокультуры. Микробиологический способ защиты растений от болезней основан на природном явлении антагонизма бактерий по отношению к фитопатогенам, используя различные механизмы, такие как способность к конкурированию за питательные вещества и пространство, продукция сидерофоров, литических ферментов, антибиотиков и др. (Коряжкина, 2012; Хрусталева, Аллахвердиев, 2016).

Представители рода *Pantoea* связаны с широким спектром растений-хозяев: бактерии способны колонизировать корни растений, его листья и стебли, могут приносить пользу путем биосинтеза фитогормона — индолилуксусной кислоты (ИУК), осуществляют мобилизацию почвенных фосфа-

тов или азотфиксацию (De Maayer et al., 2012). Описаны штаммы *Pantoea*, которые обеспечивают эффективную защиту растений от различных бактериозов и микозов, а также сохранность урожая продовольственных зерновых культур (Smits et al., 2011).

Бактерии рода *Bacillus* населяют ризосферу, филосферу растений, являясь основными эндофитами. Многие штаммы бацилл обладают рядом хозяйственно-ценных свойств: они способны синтезировать биоконтрольные вещества, фитогормоны и витамины, фиксировать азот атмосферы. Важной особенностью бацилл является их высокая конкурентоспособность при колонизации растений и образовании бактериально-растительных ассоциаций. Все вышеперечисленные свойства позволяют отнести бациллы к PGPR-микроорганизмам (Коряжкина, 2012). Установлено, что 40% бацилл, выделенных из внутренних тканей растений, проявляют антагонистическую активность к возбудителям болезней растений, таких как *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus nidulans*, *Bipolaris sorokiniana*. Антагонизм микроорганизмов рода *Bacillus* по отношению ко многим грибам-фитопатогенам объясняется способностью разных видов бацилл синтезировать различные вещества: антибиотики, сидерофоры, токсины, целлюлазы, гемицеллюлазы (Коряжкина, 2012; Khan et al., 2018).

Целью работы явилось изучение механизма биологического контроля и стимуляции роста растений новых PGPR-штаммов *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 для оценки их потенциала при использовании в качестве биоудобрений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили бактериальные штаммы *P. brenneri* AS3 ВКПМ В-12911 и *B. ginsengihumi* M2.11 ВКПМ В-11988, выделенные из почвы Республики Татарстан по признаку максимальной фитазной активности на дифференциальной среде PSM и идентифицированные молекулярно-генетическими методами (Suleimanova et al., 2015; Akhmetova et al., 2015; Сулейманова и соавт., 2017).

Культивирование микроорганизмов проводили на среде LB (г/л): триптон — 1.0; дрожжевой экстракт — 0.5; NaCl — 0.5; pH 8.5. Агаризованная среда LB включала дополнительно 2% агара. Бактерии культивировали в термостате при температуре 37°C и в термостате-шейкере фирмы “IKA®KS 4000” (Германия) при 37°C и интенсивности качания 200 об./мин. Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре “Bio-Rad” (США) при длине волны 590 нм.

Определение способности к продукции аммиака (NH₃), синильной кислоты — цианидов (HCN) и целлюлолитической активности штаммами *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 исследовали по методу Сю и Ким (Ху, Kim, 2014).

Протеолитическую активность определяли на среде с молочным агаром Эйкмана (1 и 2% молока) путем внесения 5 мкл инокулята. После 72 ч инкубации при 37°C, чашку заливали 15% ТХУ на 15 мин при комнатной температуре и оценивали зоны просветления вокруг бактериальных колоний, означающие расщепление белков молока (Шепелин, Дятлов, 2017).

Фосфат-мобилизующую способность определяли на агаризованной среде NBRIP, содержащей нерастворимый фосфат кальция Ca₃(PO₄)₂ в качестве единственного источника фосфора. Бактерии инкубировали на чашках Петри в течение 3 сут при 37°C, затем оценивали зоны просветления (растворения нерастворимого фосфата) вокруг бактериальной колонии. Среда NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (г/л dH₂O): глюкоза — 10.0; Ca₃(PO₄)₂ — 5.0; MgCl₂ · 6H₂O — 5.0; MgSO₄ · 7 H₂O — 0.25; KCl — 2.0; (NH₄)₂SO₄ — 0.1; агар — 2; pH 6.8–7.0.

Количественное определение содержания свободных фосфатов определяли калориметрически с помощью молибдата аммония. Метод основан на способности неорганических фосфатов в кислой среде образовывать с молибдатом аммония соединение желтого цвета — фосфорно-молибденовокислый аммоний (Горшкова и соавт., 2015). В две опытные пробирки вносили по 100 мкл культуральной жидкости штаммов бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11, выращенные на жидкой среде NBRIP. В качестве контроля использовали стерильную питательную среду NBRIP. Во все пробирки вносили по 750 мкл свежеприготовленного реагента ААМ (10 мМ гептамолибдат аммония, раствор 5 н H₂SO₄ и ацетон в соотношении 1 : 1 : 2). Затем в пробирки добавляли по 50 мкл 1 М лимонной кислоты. Пробирки центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об./мин. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре “iMark™ Bio-Rad” (США) в сравнении с плотностью дистиллированной воды при длине волны излучения λ = 355 нм в 1 см кювете. Концентрацию свободных фосфатов определяли по калибровочному графику стандартного раствора фосфорнокислого калия, молярная концентрация фосфатов в котором составляла 5 мкмоль/мл, готовили серию разведений. При внесении штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 в питательную среду, концентрация фосфатов в среде составляла около 100 мкмоль/мл. Это значение взято за исходный показатель для оценки активности штамма.

Фитат-мобилизующую способность определяли на агаризованной среде PSM, содержащей нерас-

творимый фитат кальция в качестве единственного источника фосфора. PSM (Phytase Screening Medium) (г/л dH₂O): CaCl₂ – 2; NH₄NO₃ – 5; KCl – 0.5; MgSO₄ · 7H₂O – 0.5; FeSO₄ · 7H₂O – 0.01; MnSO₄ · H₂O – 0.01; глюкоза – 20; фитат натрия – 4; агар – 2; pH 6.8–7.0. Фитат-гидролизующую способность оценивали после инкубации в течение 3 сут при 37°C по наличию зон просветления вокруг бактериальной колонии.

Способность штаммов к фиксации атмосферного азота определяли на селективной питательной среде Эшби, не содержащей источника азота, поэтому только бактерии, обладающие способностью фиксировать азот из атмосферы, образовывали колонии на данной среде (Концевая, 2017).

Синтез сидерофоров определяли на дифференциальной среде с хромазулолом S (агаризованная CAS среда) (Payne et al., 1994). Для посева бактерии *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 на CAS среду использовали 12-часовой инокулят, выращенный на среде LB при 37°C и 200 об./мин. Выращенный инокулят центрифугировали при 6 тыс. об./мин в течение 2 мин, осажденные клетки трижды промывали минимальной средой M9. На CAS среду посев проводили путем внесения 5 мкл суспензии промытых клеток в среде M9. В качестве контрольного штамма использовали *Salmonella typhimurium*, который образует сидерофоры (Muller et al., 2017). Плотность клеток опытного и контрольного штамма (ОП₆₀₀) составляла 0.1.

Способность штаммов к биосинтезу сидерофоров катехолового ряда определяли на минимальной солевой среде M9 в объеме 20 мл с добавлением 2,2-бипиридила (3.36 мкл) по методу Арноу (Payne et al., 1994). Метод Арноу позволяет детектировать формирование сидерофоров катехолового типа по их способности связывать гидроксильные группы с металлом (Na₂MoO₄), в результате чего образуется розовая окраска. Количество продуцируемых сидерофоров определяли с помощью калибровочной кривой по 2,3-дигидроксибензойной кислоте (2,3-DHBA), растворенной в спирте.

Определение продукции ИУК тестировали по модифицированному методу Брик (Bric et al., 1991). Концентрацию ИУК в супернатанте определяли с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием раствора синтетической ИУК с шагом 20 мкг/мл.

Для определения фунгицидной активности штаммов использовали метод лунок Petatan-Sagahon (Petatan-Sagahon et al., 2011). В качестве тест-организмов в работе использовали следующие штаммы микромицетов: *Fusarium solani*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*. Данные штаммы микромицетов выделены из пораженных клубней картофеля в отделе сельскохозяйственной биотехнологии ГНУ Татарский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии и идентифицированы нами

ранее с помощью анализа последовательностей 5.8S рРНК со стандартными праймерами ITS1 и ITS4.

Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Коммерциализация биоудобрений на основе бактерий ограничена в связи со сложностью использования лабораторных штаммов в полевых условиях из-за ряда факторов, таких как физико-химические свойства почвы, взаимодействие с другими ризосферными организмами, экологических факторов. Важной стратегией для преодоления этих ограничений является использование нативных микроорганизмов, адаптированных к климатическим условиям региона. Многие биотические и абиотические факторы оказывают влияние на рост бактерий и ограничивают их использование в качестве биоудобрений (Martins et al., 2018). Мы проводили изучение влияния абиотических факторов (температуры, pH и солености) на рост штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11. Штамм *P. brenneri* AS3 показал оптимальный рост при температурах в диапазоне 26–28°C и pH 6.0–7.0. Оптимальными условиями для роста штамма *B. ginsengihumi* M2.11 явились температура 26–37°C при значениях pH 7.0 и 8.0. Данные свидетельствуют, что штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 являются мезофильными микроорганизмами. Концентрация соли в среде для культивирования штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 в диапазоне от 0 до 1000 мМ не имела значительного влияния на рост штаммов, что указывает на их галотолерантность.

К свойствам PGPR, которые усиливают рост растений и подавляют развитие фитопатогенов, относится биосинтез биологически активных соединений. Например, выделение аммиака оказывает разрушительное воздействие на клеточные стенки микромицетов (Minaxi et al., 2012). Цианиды обладают высокой проникающей способностью и ингибируют ферменты дыхательной цепи микромицетов (Хан, 2011). Бактериальные ферменты, целлюлазы и протеазы, ингибируют развитие фитопатогенных грибов, благодаря гидролизу компонентов их клеточной стенки (Kavamura et al., 2013). Мы изучали способность штаммов к продукции этих соединений.

Исследуемые штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 способны к продукции внеклеточных протеаз, на что указывали зоны просветления (гидролиз казеина) вокруг колоний на молочном агаре (рис. 1а). Наличие зон просветления вокруг бактериальных колоний на среде CYEA с КМ-

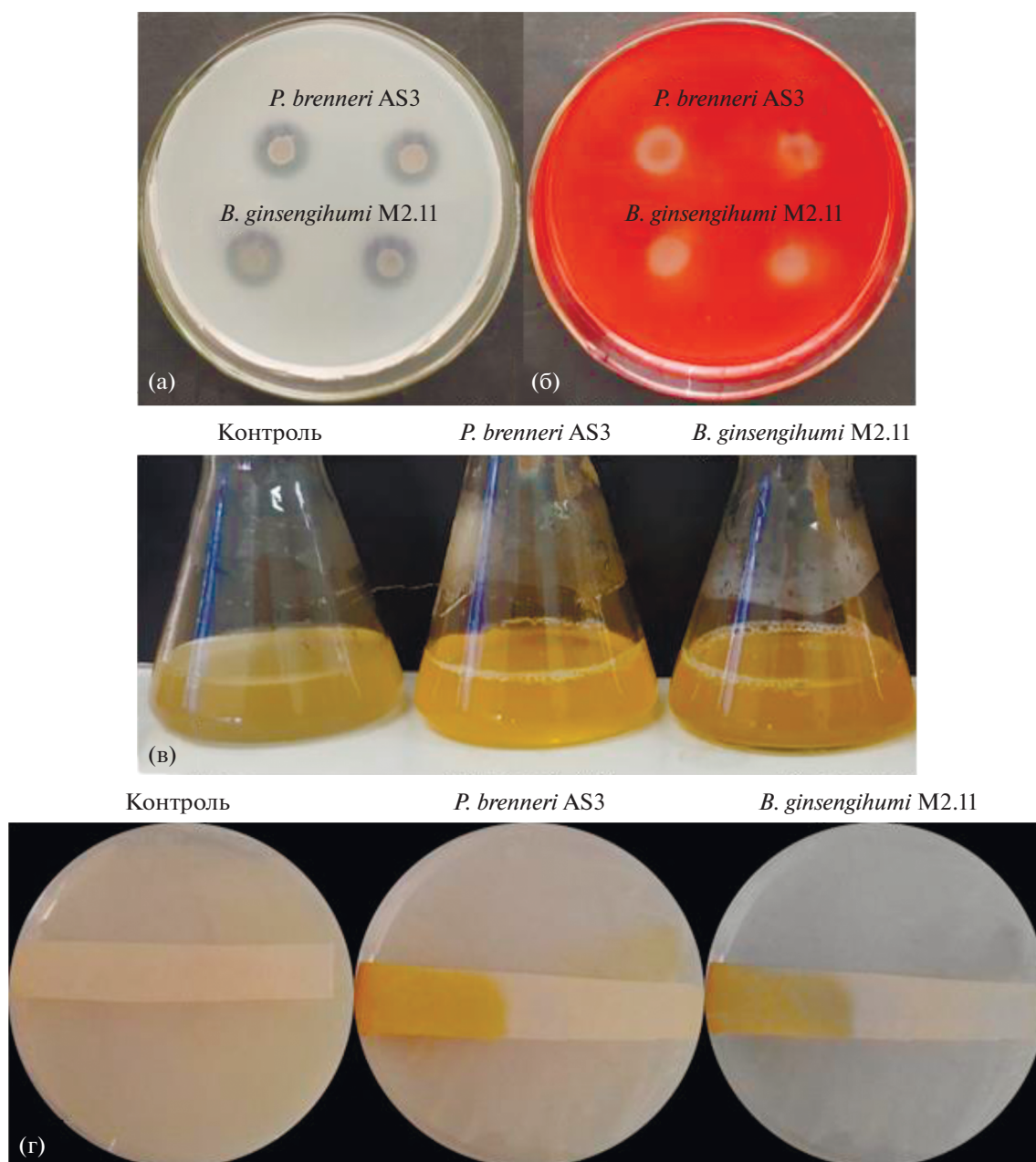


Рис. 1. Физиолого-биохимические свойства штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11: а — зоны гидролиза казеина; б — целлюлазная активность; в — продукция аммиака (NH_3); г — продукция синильной кислоты (HCN).

целлюлозой свидетельствовало о продукции штаммами внеклеточных целлюлаз (рис. 1б). При росте штаммов на пептонной воде после добавления реагента Несслера произошло изменение цвета инокулята до ярко-желтого, что указывало на продукцию аммиака в процессе культивирования бактерий (рис. 1в). Культивирование штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 на среде TSA привело к изменению цвета фильтровальной бумаги, предварительно смоченной пикриновой кислотой, что свидетельствовало о способности штаммов синтезировать синильную кислоту (HCN)

(рис. 1г). Таким образом, при исследовании биохимических свойств штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 нами установлена способность к синтезу аммиака (NH_3) и цианидов (HCN), протеолитическая и целлюлазная активности, которые могут играть важную роль при защите растений от фитопатогенных микромицетов.

Способность штаммов *P. breunneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 к разложению соединений фосфора и фиксации атмосферного азота. Фосфор является лимитирующим фактором в питании растений. Не

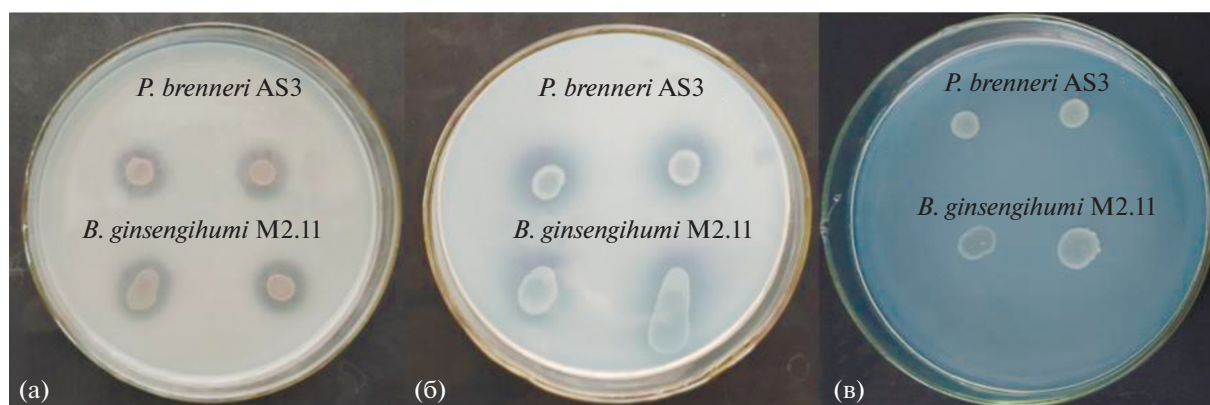


Рис. 2. Фосфат-мобилизующая (а) и фитат-гидролизующая (б) активности и фиксация атмосферного азота (в) штаммами *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11.

более 3–5% от вносимого с химическими удобрениями фосфора используется растениями, это явление носит название “фосфорный парадокс”. Почвенные микроорганизмы способны растворять фосфаты из нерастворимых неорганических и органических фосфат-соединений и способствуют росту растений за счет увеличения биодоступности фосфора (Bhattacharya, 2019). Способность к высвобождению фосфатов из нерастворимых фосфорных соединений лежит в основе создания инновационных агробиотехнологий, поскольку повышение уровня усвояемости минерального питания и внесение биоудобрений способствует снижению колонизации корней растений фитопатогенными грибами.

Способность штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 к разложению труднодоступных почвенных соединений фосфора исследовали на среде NBRIP с нерастворимым фосфатом кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и среде PSM с нерастворимым фитатом кальция в качестве единственного источника фосфора. Оба штамма способны расти и образовывать выраженные зоны гидролиза на этих средах (рис. 2а, 2б). По нашим данным исследуемые штаммы обладают фосфат-мобилизующей активностью, позволяющей использовать в качестве источника фосфора неорганические и органические почвенные фосфаты.

Определяли концентрацию свободных фосфатов в среде при культивировании штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11. Через 48 ч культивирования штамма *P. brenneri* AS3 концентрация свободного и доступного для вовлечения в питание растений фосфата составляла 18050 ± 900 мкг/мл. Через 94 ч культивирования при 37°C концентрация свободных фосфатов достигала максимума ($42\,743 \pm 2130$ мкг/мл), у *B. ginsengihumi* M2.11 — 55020 ± 2700 мкг/мл, что свидетельствует о 6-кратном увеличении концентрации свободных фосфатов в среде при росте штамма бактерий *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11, по сравнению с кон-

тролем (100 мкмоль/мл, 7200 мкг/мл). Известно, что фосфатрастворяющий штамм бактерий *Pseudomonas* sp. 181a (Патент RU 2451069), используемый для защиты растений от болезней, вызываемых грибами рода *Fusarium* и повышения урожайности, обладает высокими фосфат-мобилизующими свойствами: переводит в раствор до 2620 мкг/мл фосфата, что более чем в 6 раз ниже исследуемых нами штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11. Максимальная концентрация высвобождающегося фосфора штаммом *B. megaterium* составляла 483 ± 50 мкг/мл (Prochownik et al., 2018), штаммом *P. agglomerans* lma2 — 1061.49 мкг/мл (Silini-Cherif, et al., 2012), что существенно ниже полученных нами показателей.

Изучали способность исследуемых штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 к фиксации атмосферного азота с помощью дифференциальной питательной среды Эшби. При культивировании на питательной среде без источника азота, штаммы формировали колонии на 12 ч роста, что говорит об их способности к использованию молекулярного азота (рис. 2в). Сформированные колонии были с ровными краями, гладкие, плоские, блестящие, непигментированные. Способность фиксировать азот бактериями рода *Bacillus* и *Pantoea* также выявлена другими исследователями (Dutkiewicz et al., 2016).

Таким образом, способность исследуемых почвенных штаммов к разложению соединений фосфора и фиксации атмосферного азота значима для улучшения питания растений сельскохозяйственных культур. Увеличение концентрации свободных фосфатов в среде не менее чем в 6 раз за 94 ч культивирования является важным фактором при использовании этих штаммов в качестве стимуляторов роста растений.

Биосинтез сидерофоров. Железо является важным питательным компонентом, в почве оно находится в нерастворимой трехвалентной форме (Fe^{3+}). Сиде-

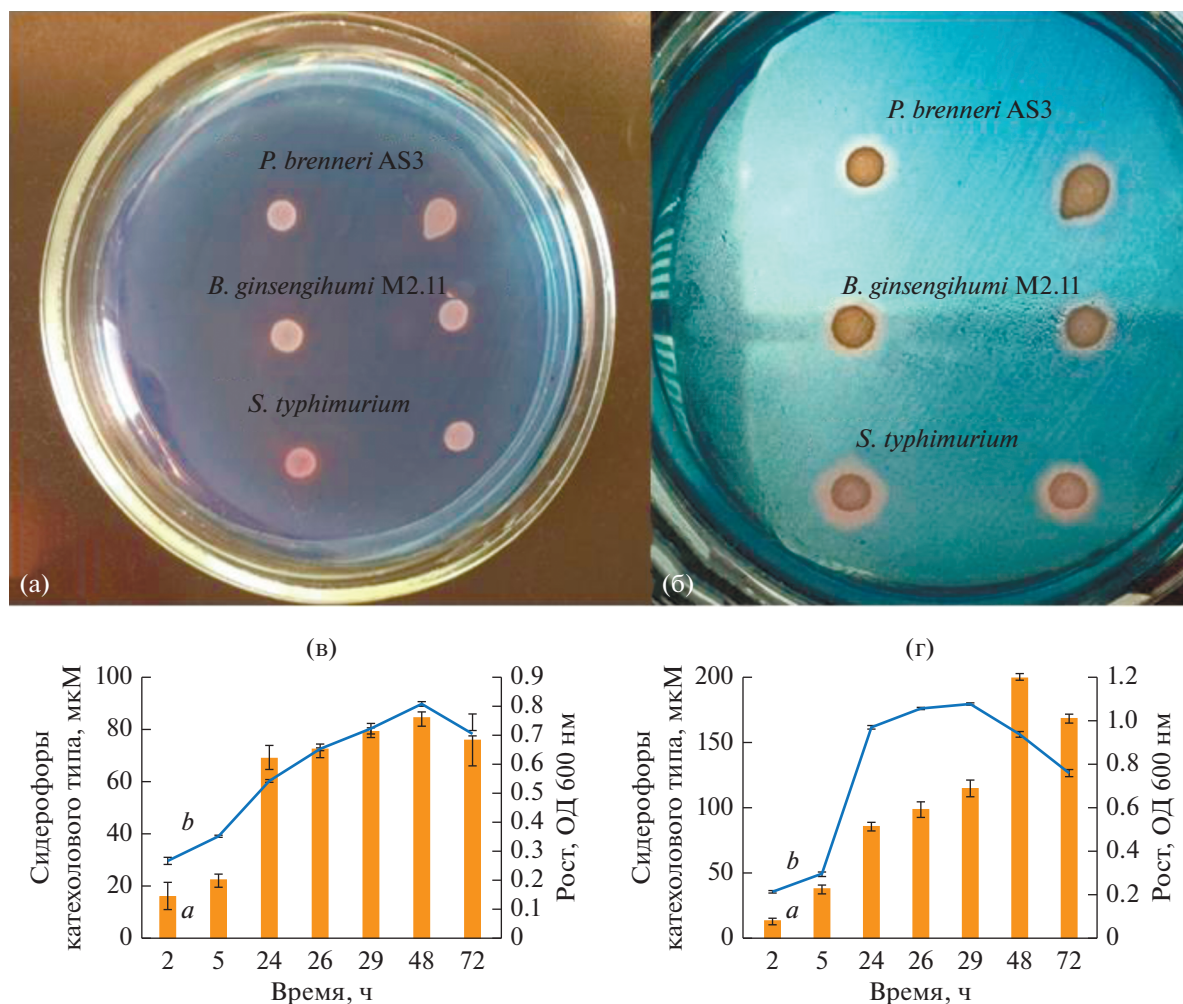


Рис. 3. Синтез сидерофоров на дифференциальной CAS-среде на 12 ч (а) и 72 ч (б) роста; динамика биосинтеза сидерофоров и роста штаммов *P. brenneri* AS3 (в) и *B. ginsengihumi* M2.11 (г).

сидерофоров — низкомолекулярные редокс-активные соединения, которые восстанавливают Fe^{3+} до Fe^{2+} . Связывание железа сидерофорами приводит к ограничению роста фитопатогенных организмов. Важная роль сидерофоров в антагонистических взаимоотношениях бактерий с почвенными фитопатогенами и в стимуляции роста растений показана при инокуляции растений штаммами, продуцирующими сидерофоры; отмечено супрессирующее действие сидерофоров на фитопатогены и стимулирующее — на рост растений (Kramer et al., 2019).

Определяли способность штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 к синтезу сидерофоров на дифференциальной CAS-среде с хромозулом *S. typhimurium*. Формирование зоны просветления (0.7 см) на CAS-агаре происходило через 12 ч инкубации при 37°C (рис. 3а). Максимальную зону просветления (2.0 см) наблюдали на третьи сутки инкубации (рис. 3б). Синий цвет среды обусловлен формиро-

ванием комплекса красителя с железом (Fe^{3+}), который разрушается при восстановлении сидерофорами железа до двухвалентной формы, что приводит к изменению цвета среды.

Известно, что представители родов *Pantoea* и *Bacillus* синтезируют сидерофоры катехолового типа — энтеробактин и бацилбактин соответственно (Cornelis, 2010). Мы определяли продукцию бактериями сидерофоров катехолового ряда методом Арноу на жидкой среде М9, основанном на образовании комплекса металла с гидроксильной группой сидерофора. Сидерофоры катехолового типа в концентрации 22 ± 5 μM обнаружены на 5 ч культивирования штамма *P. brenneri* AS3 (рис. 3в). Штамм *B. ginsengihumi* M2.11 на 5 ч культивирования продуцировал 38 ± 6 μM сидерофора (рис. 3г). Максимальная продукция сидерофоров обнаружена у *B. ginsengihumi* M2.11 в количестве 198 ± 8 μM на 48 ч культивирования. Максимум продукции сидерофоров штаммом *P. brenneri* AS3

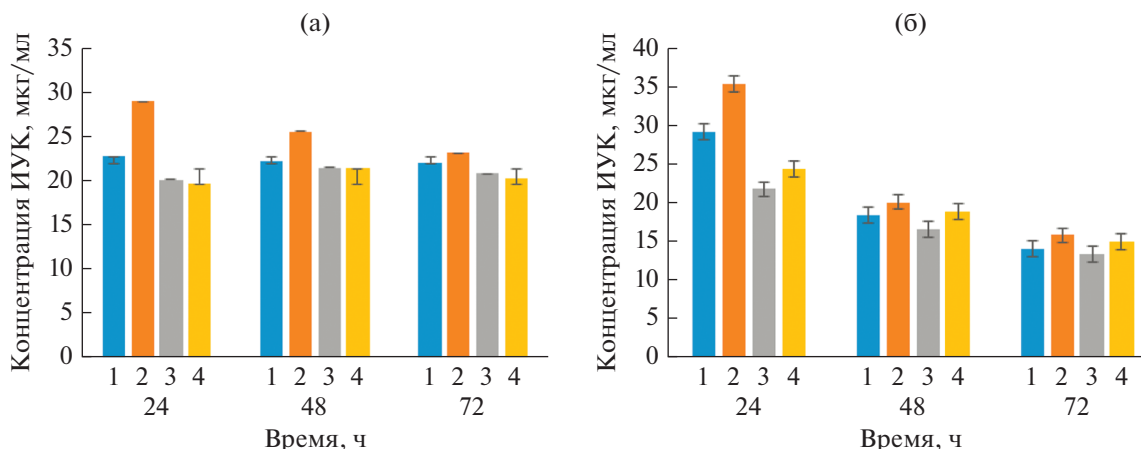


Рис. 4. Биосинтез ИУК штаммами *P. brenneri* AS3 (а) и *B. ginsengihumi* M2.11 (б).

так же пришлось на 48 ч культивирования и составил 84 ± 7 мкМ, т.е. вдвое меньше, чем у *B. ginsengihumi* M2.11. В момент максимального накопления сидерофоров плотность клеток (OD_{590}) составляла 0.809 у штамма *P. brenneri* AS3 и 0.733 у *B. ginsengihumi* M2.11. По данным литературы известно, что концентрация сидерофоров штамма *B. megaterium* достигала максимального уровня через 24 ч, когда бактерии находились в стационарной фазе, и составляла 140 мкМ (Kavamura et al., 2013). Штаммы *B. subtilis* и *P. alii* синтезировали на 24 ч роста по 60 мкМ (Carlos et al., 2019), а штамм *Bacillus* sp. STJP продуцировал 80 мкМ сидерофор (Prakash, Arora 2019), что существенно меньше по сравнению с исследуемыми нами штаммами.

Таким образом, по сравнению с другими представителями родов *Pantoea* и *Bacillus*, нами установлен высокий уровень продукции сидерофоров катехолового типа штаммами *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11, что важно для использования этих микроорганизмов в качестве биоудобрений для решения проблем, связанных с недостатком железа в питании растений.

Биосинтез индолилуксусной кислоты. Ауксин индолил-3-уксусная кислота (ИУК) способствует росту и развитию растений посредством стимуляции деления клеток, роста и дифференцировки растения, увеличения объема корня, площади его поверхности и диаметра. ИУК является одним из естественных ауксинов, предшественником которой является аминокислота L-триптофан. Показано, что некоторые бактерии из рода *Pantoea* и *Bacillus* способны синтезировать ИУК, например, *P. agglomerans* lma2, *P. ananas* (Walterson et al., 2015), *B. subtilis* (Mt3b) и *Bacillus* sp. (Chagas et al., 2015). Поскольку естественной средой обитания штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 является почва, мы исследовали способность этих штаммов синтезировать фитогормон ИУК.

ИУК-продуцирующая активность PGPR варьирует в зависимости от вида и контролируется условиями культивирования и стадией роста (Acuna et al., 2011). Для оптимизации условий синтеза ИУК использовали различные среды (LB, dLB — разбавленная в 10 раз LB) и с разными значениями pH в диапазоне от 5.0 до 7.0. Динамика биосинтеза ИУК представлена на рис. 4. Оптимальной средой для биосинтеза ИУК являлась среда dLB с pH 7. *B. ginsengihumi* M2.11 синтезировал ИУК в количестве 34 ± 3 мкг/мл на 24 ч культивирования, затем количество ИУК в среде снижалось (рис. 4а). Штамм *P. brenneri* AS3 синтезировал 29 ± 2 мкг/мл ИУК на 24 ч культивирования (рис. 4б). Бактерии, способные синтезировать ИУК более 13 мкг/л, рассматриваются как PGPR (ростстимулирующие ризобактерии) (Barazani, Friedman, 2000). Исходя из этого, исследуемые штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 можно отнести к PGPR-бактериям. Известно, что *B. cereus* (So3II) и *B. subtilis* (Mt3b) продемонстрировали высокий выход ИУК — 35.8 и 36.6 мкг/мл соответственно (Wagi, Ahmed, 2019). Штамм *Bacillus* sp. STJP продуцировал 30.59 мкг/мл ИУК (Prakash, Arora, 2019), что коррелирует с полученными нами данными.

Таким образом, продукция исследуемыми штаммами фитогормона — индолил-3-уксусной кислоты может способствовать стимуляции роста растений за счет развития их корневой системы.

Фунгицидная активность штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 исследована на агаризованной среде LB. Установлено, что изучаемые нами штаммы обладали способностью к ингибированию роста микромицетов (рис. 5). Максимальная ингибирующая способность проявлялась по отношению к *Fusarium solani* — возбудителю корневой гнили и трахеомикозного увядания (Kosmidis, Denning, 2017): рост гриба в присутствии *P. brenneri* AS3 ингибировался на 90%, в

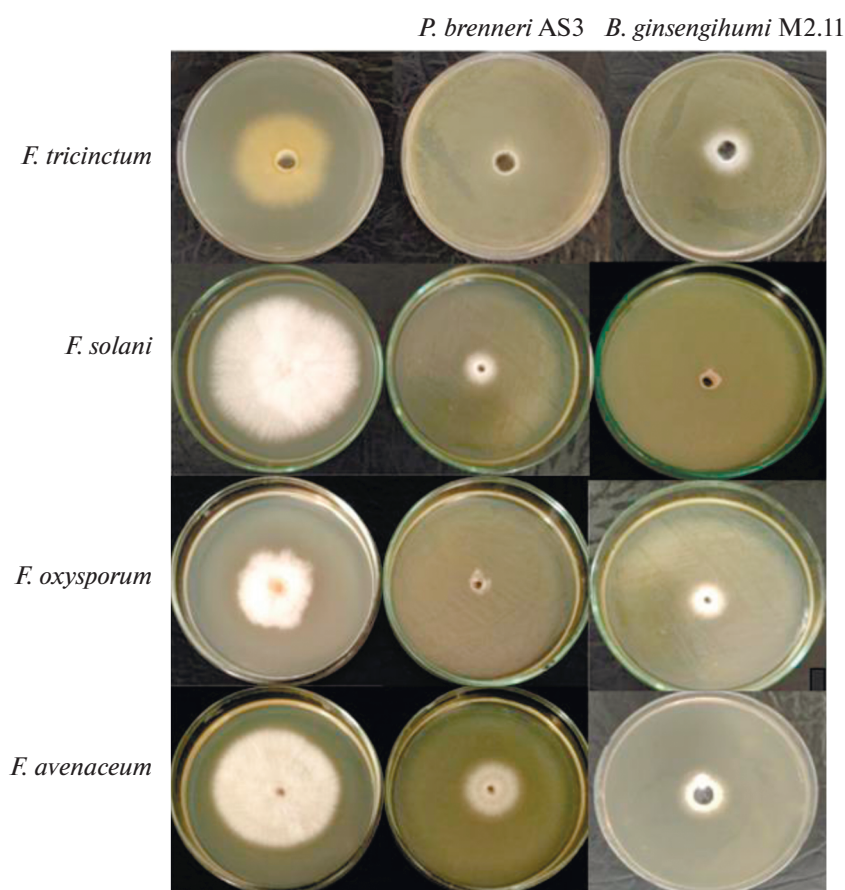


Рис. 5. Антагонистические свойства штаммов *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 по отношению к фитопатогенным микромицетам рода *Fusarium*.

присутствии *B. ginsengihumi* M2.11 — на 93%. Высокий ингибирующий эффект (от 63 до 87%) исследуемые бактерии проявляли по отношению ко всем исследуемым представителям рода *Fusarium* — *F. tricinctum*, поражающего колос зерновых культур, *F. oxysporum*, вызывающего вилт и увядание,

F. avenaceum, вызывающего фузариоз зерна (табл. 1) (Kosmidis, Denning, 2017).

Таким образом, бактериальные изоляты *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 проявляют антимикробное действие по отношению к микромицетам-фитопатогенам рода *Fusarium*. Ингибирование

Таблица 1. Ингибирование роста мицелия микромицетов рода *Fusarium* штаммами *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11

Вид микромицетов	Заболевание	Ингибирование роста мицелия штаммом <i>P. brenneri</i> AS3, %		Ингибирование роста мицелия штаммом <i>B. ginsengihumi</i> M2.11, %	
		5 сут	10 сут	5 сут	10 сут
<i>F. tricinctum</i>	Фузариоз колоса зерновых культур	80 ± 3	86 ± 3	75 ± 3	80 ± 3
<i>F. solani</i>	Корневая гниль	85 ± 4	90 ± 3	87 ± 4	93 ± 4
<i>F. oxysporum</i>	Фузариоз колоса, корневая гниль	78 ± 2	87 ± 2	81 ± 3	90 ± 4
<i>F. avenaceum</i>	Фузариоз зерна	58 ± 2	63 ± 2	62 ± 3	70 ± 3

роста фитопатогенов рода *Fusarium* представителями рода *Pantoea* и *Bacillus* описано многими авторами (Liu et al., 2013; Khan et al., 2018, Хадиева и соавт., 2018).

Потребность сельского хозяйства в средствах защиты растений увеличивается с каждым годом, и проблема совершенствования технологии биологической защиты растений представляется чрезвычайно актуальной. Грамотное применение бактериальных препаратов на основе ростостимулирующих ризобактерий, как элемента экологического земледелия в технологиях выращивания сельскохозяйственных культур, позволяет существенно снизить химическую нагрузку на экосистемы вследствие уменьшения количеств применяемых минеральных удобрений и химических средств защиты растений, приводит к повышению урожайности и улучшению качества экологически чистой сельскохозяйственной продукции (Martins et al., 2018).

Исследуемые штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 обладают множественными положительными эффектами, способными повлиять на рост и жизнедеятельность растений. Штаммы обладают целлюлазной и протеазной активностью что играет важную роль в разложении органического вещества для питания растений. Оба штамма выделяют ионы аммония и синильной кислоты, что способствует росту растений и подавляет развитие фитопатогенов, благодаря выделению в ризосферу ионов водорода и повышению кислотности почвы (Xu, 2014). Штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 имеют способность к разложению фосфатов и фитатов, фиксации молекулярного азота, продукции сидерофоров и ИУК, что, в свою очередь, качественно улучшает питание растение макро- и микроэлементами и предотвращает хелатирование почвы. Выявлена высокая (до 93% ингибирования) фунгицидная активность исследуемых штаммов. Таким образом, обладая множественными полезными для растений характеристиками, штаммы *P. brenneri* AS3 и *B. ginsengihumi* M2.11 могут быть использованы в качестве объектов для создания технологий биоудобрений и стимуляторов роста растений. Полученные нами результаты полезны для определения стратегий использования этой группы бактерий, обладающих способностью продуцировать целый ряд метаболитов, которые стимулируют рост растений и уменьшают воздействие патогенных микроорганизмов, в качестве агентов биологического контроля.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-38-90208.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горшкова О.М., Горецкая А.Г., Корешкова Т.Н., Краснушкин А.В., Марголина И.Л., Потапов А.А., Працкина Е.М., Шкиль А.Н. Методы лабораторных и полевых исследований / Под ред. Слипенчука М.В. М.: Географический факультет МГУ, 2015. 220 с.
- Концевая И.И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов. г. Гомель. Полиграф. Министерство образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины, 2017. 44 с.
- Коряжкина М. Ф. Особенности взаимодействия *Bacillus atrophaeus* В-9918 с растениями и фитопатогенными грибами. Дис. ... канд. биол. наук. 14.03.2012. Саратов: ИБФРМ РАН, 2012. 158 с.
- Сулейманова А.Д., Иткина Д.Л., Шарипова М.Р. Штамм бактерий *Pantoea brenneri*, обладающий фосфатмобилизующей и фунгицидной активностью. Патент РФ № 2654595. Заявка № 2017130448 от 28.08.2017.
- Дунайцев И.А., Клыкова М.В., Кондрашенко Т.Н., Сомов А.Н., Старшов А.А., Аитов Р.С., Дятлов И.А. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a с фунгицидными свойствами. Патент РФ № 2451069. Заявка № 2010143691/10 от 27.10.2010.
- Хадиева Г.Ф., Лутфуллин М.Т., Мочалова Н.К., Ленина О.А., Шарипова М.Р., Марданова А.М. Новые штаммы *Bacillus subtilis* как перспективные пробиотики // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 356–365.
- Khadieva G.F., Lutfullin M.T., Mochalova N.K., Lenina O.A., Sharipova M.R., Mardanova A.M. New *Bacillus subtilis* strains as promising probiotics // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 463–470.
- Хан В.В. Закономерности взаимодействия организма с веществами раздражающего, пульмотоксического и общеядовитого действия. Учебно-методическое пособие для студентов V курсов лечебного, педиатрического, IV курса стоматологического факультетов. Краснодар, 2011.
- Хрусталева Г.А., Аллавердиев С.Р. Способ ингибирования активности бактерий *Salmonella enteritidis* в почве // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 3. С. 413.
- Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеробактерий. М.: Династия, 2017. 232 с.
- Acuna J.J., Jorquera M.A., Martinez O.A., Menezes-Blackburn D., Fernandez M.T., Marschner P., Greiner R., Mora M.L.

- Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals // J. Soil Sci. Plant Nutrit. 2011. V. 11. P. 1–12.
- Akhmetova A.A., Suleimanova A.D., Toymentseva A.A., Balaban N.P., Iljukhina D.L., Sharipova M.R. Heterologous expression of *Bacillus ginsengihumi* phytase gene // Research J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 2015. V. 6. P. 117–122.
- Barazani O., Friedman J. Effect of exogenously applied l-tryptophan on allelochemical activity of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) // J. Chem. Ecol. 2000. V. 26. P. 343–349.
- Bhattacharya A. Changing environmental condition and phosphorus-use efficiency in plants // Changing Climate and Resource Use Efficiency in Plants / Ed. Bhattacharya A. London: Elsevier, Academic Press, 2019. V. 5. P. 241–305.
- Bric J.M., Bostock R.M., Silverstone S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57. P. 535–538.
- Carlos M.H.F., Vilas-Boas A., Sousa C.A., Soares M.V.M., Soares E.V. Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions // AMB Express. 2019. V. 9. Art. 78. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0796-3>
- Chagas A.F. Oliveira A.G., Oliveira L.A., Santos G.R., Chagas L.F.B., Lopes A.L. Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus* isolated from different soils // Bulgar. J. Agric. Sci. 2015. V. 21. P. 282–287.
- Cornelis P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. P. 1637–1645.
- De Maayer P., Aliyu H., Vikram S., Blom J., Duffy B., Cowan D.A., Smits T.H.M., Venter S.N., Coutinho T.A. Phylogenomic, pangenomic, pathogenomic and evolutionary genomic insights into the agronomically relevant enterobacteria *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 17–55.
- Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M.K., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects // Ann. Agric. Environ. Med. 2016. V. 23. P. 206–222.
- Kavamura V.N., Santos S.N., da Silva J.L., Parma M.M., Avila L.A., Visconti A., Zucchi T.D., Taketani R.G., Andreote F.D., de Melo I.S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought // Microbiol. Res. 2013. V. 168. P. 183–191.
- Khan N., Martinez-Hidalgo P., Ice A., Maymon M., Humm A., Nejat N., Sanders R., Kaplan D. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 23–63.
- Kosmidis C.D., Denning W. Opportunistic and Systemic Fungi // Infectious Diseases (Fourth Edition). 2017. V. 2. P. 1681–1709.
- Kramer J., Ozkaya O., Kummerli R. Bacterial siderophores in community and host interactions // Nature Rev. Microbiol. 2019. V. 18. P. 152–163.
- Liu W., Chen Z., Zhang T., Lu C. Application of *Pantoea agglomerans* strain Z01 to control *Fusarium* wilt and its effect on the quality parameters of rockets // Ann. Microbiol. 2013. V. 64. P. 1443–1446.
- Martins V.M., Paula M.M., Takita M.A., De Souza A.A. Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough? // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 1099.
- Minaxi L.N., Yadav R.C., Saxena J. Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semiarid deserts // Appl. Soil Ecol. 2012. V. 59. P. 124–135.
- Muller A., Schader C., Scialabba N.E., Bruggemann J., Isensee A., Erb K., Smith P., Klocke P., Leiber F., Stolze M., Niggli U. Strategies for feeding the world more sustainably with organic agriculture // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 1290–1304.
- Norovsuren J., Boykova I.V., Savich V.I., Zenova G.M. Ecological functions of soil actinomycetes of Mongolia // Proc. 21th ISTRO Conference, Paris, France. 2018. P. 357–358.
- Payne M. Detection, isolation, and characterization of siderophores // Methods Enzymol. 1994. V. 235. P. 329–344.
- Petatan-Sagahon I., Anducho-Reyes M.A., Silva-Rojas H.V., Arana-Cuenca A., Tellez-Jurado A., Cardenas-Alvarez I.O., Mercado-Flores Y. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 5522–5537.
- Prakash J., Arora N.K. Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. // 3 Biotech. 2019. V. 9. P. 126. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1660-5>
- Prochownik E., Dobrowolska-Iwanek J. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species // Molecules. 2018. V. 23. Art. 2897.
- Silini-Cherif H., Silini A., Ghoul M., Yadav S. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a Rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2 // Pakistan J. Biol. Sci. 2012. V. 15. P. 267–276.
- Smits T.H.M., Rezzonico F., Kamber T., Blom J., Goesmann A., Ishimaru C.A., Frey J.E., Stockwell V.O., Duffy B. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1 // PLoS One. 2011. V. 6. e22247.
- Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1 // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 6790–6799.
- Veliz E.A., Martinez-Hidalgo P., Hirsch A.M. Chitinase producing bacteria and their role in biocontrol // AIMS Microbiol. 2017. V. 3. P. 689–705.
- Wagi S., Ahmed A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA // Peer J. 2019. V. 23. e7258.
- Walterson A.M., Stavrinides J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the *Enterobacteriaceae* // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39. P. 968–984.
- Xu S.J., Kim B.S. Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil // Mycobiol. 2014. V. 42. P. 158–166.

***Pantoea brenneri* AS3 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 as Potential Biocontrol and Plant Growth-Promoting Agents**

D. L. Itkina^{1,*}, A. D. Suleimanova¹, and M. R. Sharipova¹

¹*Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420008 Russia*

**e-mail: laia9301@mail.ru*

Received July 19, 2020; revised October 10, 2020; accepted November 11, 2020

Abstract—The mechanisms of biocontrol action of the strains *Pantoea brenneri* AS3 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 were investigated. The ability of the strains to release ammonium and cyanide ions was established, as well as their cellulase and protease activity and ability to fix nitrogen and to mobilize soil phosphates and phytoates. The strains were able to synthesize siderophores, with their maximum production observed 48 h of cultivation reaching $198 \pm 8 \mu\text{M}$ in *B. ginsengihumi* strain M2.11 and $84 \pm 7 \mu\text{M}$ in *P. brenneri* strain AS3. The bacteria produced a phytohormone, indoleacetic acid (IAA), with the yields of 34 ± 3 and $29 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ for *B. ginsengihumi* M2.11 and *P. brenneri* AS3, respectively, after 24 h of growth. It was found that both strains had fungicidal activity against plant pathogens of the genus *Fusarium*: the growth of different *Fusarium* species was inhibited by more than 90% in the presence of *P. brenneri* AS3 or *B. ginsengihumi* M2.11. It was concluded that the strains *P. brenneri* AS3 and *B. ginsengihumi* M2.11, which possess multiple characteristics useful to plants, may be used as objects for creating biofertilizers and plant growth stimulators.

Keywords: *Pantoea*, *Bacillus*, biological activity, siderophores, IAA, fungicidal activity

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ШТАММ *LACTOBACILLUS FERMENTUM* 39:
БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА,
АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2021 г. И. В. Соловьева^а, Н. А. Новикова^а, А. Г. Точилина^{а, *}, И. В. Белова^а, А. Ю. Кашников^а,
Т. А. Сашина^а, В. А. Жиров^а, С. Б. Молодцова^а

^аФедеральное бюджетное учреждение науки Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, 603950 Россия

*e-mail: lab-lb@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.05.2020 г.

После доработки 16.07.2020 г.

Принята к публикации 05.08.2020 г.

Lactobacillus fermentum 39 является известным пробиотическим штаммом и широко используется для производства фармакопейных препаратов-пробиотиков, биологически активных добавок к пище и продуктов, обогащенных пробиотическими микроорганизмами. В ходе работы с использованием трансмиссионной электронной микроскопии изучена морфология клеток, подробно проанализированы биохимические свойства штамма и штаммовые особенности метаболизма сахаров, проведено полногеномное секвенирование, охарактеризован кластер генов, отвечающих за синтез экзополисахарида. Установлено, что клетки *Lactobacillus fermentum* 39 способны адсорбировать на себе ротавирусные частицы, что позволяет научно обосновать новый аспект применения пробиотиков, включающих данный штамм, при острых гастроэнтеритах, вызванных ротавирусами человека.

Ключевые слова: *Lactobacillus fermentum*, пробиотические штаммы, ротавирусы человека

DOI: 10.31857/S0026365621020142

В настоящее время пробиотические бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* признаны в качестве вакцинных адъювантов и терапевтических средств для лечения острого вирусного гастроэнтерита у детей (Majamaa et al., 1995; Isolauri, 2003; Lei et al., 2016). С начала 2000-х годов вопросу лечения и профилактики острых кишечных инфекций (ОКИ) вирусной этиологии с использованием пробиотических бактерий, в частности, бактерий рода *Lactobacillus*, уделялось много внимания (Ahmadi et al., 2015). Среди основных механизмов ингибирующего действия лактобацилл выделяют иммуностимулирующий эффект, приводящий к усилению иммунного ответа: индукции интерлейкинов, активации макрофагов, натуральных киллеров и Т-хелперов и стимуляции выработки иммуноглобулинов, в частности, иммуноглобулина А (IgA) (Arena et al., 2018). К другому механизму противовирусного действия пробиотиков относят продукцию активных метаболитов — пероксида водорода, лактата, бактериоцинов и бактерицидных субстратов, короткоцепочечных жирных кислот, которые понижают pH среды, предотвращают адгезию вирусных частиц на поверхности энтероцитов за счет изменения свойств их рецепторов и обладают прямым противовирусным действием

(Salminen et al., 1998; Ермоленко и соавт., 2003; Botic et al., 2007; Sunmola et al., 2019). Есть данные о том, что выраженным противовирусным действием обладают экзополисахариды лактобацилл, представляющие собой гомо- или гетерополисахариды различного химического состава, имеющие штаммовую специфичность (Kim et al., 2018).

В ряде исследований показан противовирусный эффект пробиотических бактерий, обусловленный механическим связыванием вирусных частиц бактериальными клетками. В работе Н.Г. Шелковой и соавт. описан эффект адсорбции вирионов ротавируса на поверхности клеток и жгутиках *E. coli* M-17 (Шелковая и соавт., 1991). Изучению механизма адсорбции отводится важная роль в ряде исследований, рассматривающих взаимодействие бактерий рода *Lactobacillus* с вирусами, принадлежащими к различным семействам. Штаммы видов *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* способны адсорбировать частицы вируса везикулярного стоматита (сем. *Rabdoviridae*), *L. reuteri* и *L. casei* — вирус Коксаки А (сем. *Picornaviridae*) и энтеровирус 71 (сем. *Picornaviridae*), представители вида *L. plantarum* — вирус Коксаки В4 (сем. *Picornaviridae*) и норовирусы человека (сем. *Caliciviridae*) (Botic et al., 2007; Ang

et al., 2016; Lei et al., 2016; Arena et al., 2018). Механизм взаимодействия бактериальных клеток и вирусных частиц большинство исследователей трактует как физическую адсорбцию, которая осуществляется за счет неспецифических ван-дерваальсовых сил. В то же время в отдельных работах показано, что данное явление носит специфический характер, например, отдельные штаммы рода *Lactobacillus* способны улавливать частицы вируса иммунодефицита человека (сем. *Retroviridae*) путем распознавания богатых маннозой участков вирусного гликопротеина gp120 (Botic et al., 2007). Во всех исследованиях показано, что способность к адсорбции вирионов является штаммовой характеристикой (Botic et al., 2007; Lei et al., 2016).

В связи с этим исследование подробно охарактеризованных пробиотических штаммов рода *Lactobacillus* на наличие противовирусных свойств, в частности, изучение их прямого физического взаимодействия с вирусными частицами, представляется актуальной научной и практически значимой задачей.

Цель работы — изучение генетических особенностей, ключевых фенотипических свойств и характера взаимодействия с ротавирусом человека производственного пробиотического штамма *Lactobacillus fermentum* 39.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования — штамм *Lactobacillus fermentum* 39 из Государственной коллекции лактобацилл ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, зарегистрирован в коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского назначения как *Lactobacillus fermentum* 1-20 (ГКПМ № 790039). Этот штамм давно известен и широко используется в промышленной микробиологии для производства пробиотиков. *Lactobacillus fermentum* 39 был выделен из фекалий здорового человека на кафедре микробиологии Тартуского государственного университета (Эстония), где в результате изучения биологических свойств была установлена его принадлежность к виду *L. fermentum*. Далее в 1967 г. штамм был передан в Нижегородский (тогда Горьковский) НИИЭМ, в 1969 году был разработан лабораторный регламент производства сухого пробиотического препарата “Лактобактерин”, где *L. fermentum* 39 использован в качестве штамма-продуцента. На данный момент *L. fermentum* 39 входит в перечень штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, используемых в производстве лактосодержащих пробиотиков в Российской Федерации, что регламентировано Общей фармакопейной статьей ОФС.1.7.1.0006.15, где дана подробная характеристика штамма (2015).

Культивирование штамма *L. fermentum* 39. Для восстановления и рассева штаммов бактерий рода *Lactobacillus* после вскрытия ампулы лиофильную массу заливали 1 мл среды MPC-1 (*Lactobacillus* MRS broth, “HiMedia”, Индия), переносили в стерильную пробирку и инкубировали при 37°C в течение 24 ч (I генерация штамма). На вторые сутки 0.5 мл I генерации пересевали на MPC-1 и инкубировали при 37°C 24 ч (II генерация штамма). Далее II генерацию штамма раститровывали в стерильном физиологическом растворе (pH 7.0); с отдельных разведений (10^{-4} – 10^{-7}) проводили высевы по 0.05 мл на плотную среду MPC-4 (*Lactobacillus* MRS agar, “HiMedia”, Индия) и инкубировали 48 ч при 37°C в анаэробных условиях с использованием газогенерирующих пакетов GasPak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator (“Becton Dickinson”, США).

Идентификация штамма с использованием MALDI TOF масс-спектрометрии. Идентификацию осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex (“Bruker Daltonics”, Германия), оснащенного модифицированным твердотельным лазером. Все измерения осуществляли в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Внешнюю калибровку проводили с помощью бактериального тест-стандарта (“Bruker Daltonics”, Германия), в качестве матрицы использовали α -циано-4-гидрокси-коричную кислоту (α -CHCA) (“Bruker Daltonics”, Германия).

Пробоподготовку выполняли методом прямого нанесения по стандартному протоколу, представленному в руководстве пользователя. Идентификацию, запись, обработку и анализ масс-спектров проводили с помощью программно-аппаратного комплекса BioTyper (“Bruker Daltonics”, Германия). О достоверности идентификации судили по значению коэффициента совпадения (Score values): 2.000–3.000 — идентификация до вида, 1.999–1.700 — идентификация до рода, 1.699–0 — идентификация не прошла), а также по значению категорий: А — достоверная идентификация до вида, В — достоверная идентификация до рода, С — недостаточный результат.

Изучение биохимических свойств штамма. Биохимические свойства штамма подтверждали с использованием тест-системы API 50CHL (“Bio-Merieux”, Франция).

Полногеномное секвенирование и аннотирование генома. Для проведения полногеномного секвенирования геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (“QIAGEN”, Германия), фрагментацию производили с использованием системы ультразвуковой фрагментации Covaris E210 (“Applied Biosystems”, США) согласно инструкции производителя. Очистку смеси и отбор фрагментов 200–700 п.н. проводили при помощи магнит-

ных частиц Agencourt AMPure beads (“Beckman Coulter”, США) и буфера NEBNext Sizing Buffer (“New England Biolabs”, США). Подготовку библиотек осуществляли с помощью набора TrueSeq (“Illumina Inc.”, США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq (“Illumina Inc.”, США). Исходные прочтения были обработаны утилитой Trimmomatic со стандартными параметрами для Illumina. Затем обработанные прочтения использовали для сборки генома *de novo* при помощи программ Spades, MIRA 4.0, Newbler 2.6.

Аннотацию генома производили с помощью утилиты Prokka v. 1.11 (Seemann, 2014), геномного сервера RAST (Rapid annotations using subsystems technology (<http://rast.nmpdr.org>) и BASys (Bacterial annotation system (<https://www.basys.ca>)). Изучение CRISPR-кассеты, поиск детерминант антибиотикорезистентности и патогенности проводили с использованием программных продуктов, представленных на сайте Центра геномной эпидемиологии (www.cge.cbs.dk): программ ResFinder 2.0, Pathogen Finder и CrisprFinder (Zankari et al., 2012; Cosentino et al., 2013; Grissa et al., 2017).

Подготовка суспензии вирионов. Для изучения взаимодействия лактобактерий с ротавирусами готовили концентрированную суспензию ротавирионов, полученных из образцов фекалий детей, госпитализированных в Нижегородскую инфекционную больницу с острой кишечной инфекцией. Ротавирусы вида *Rotavirus A* выявляли с использованием коммерческих ПЦР-тест-систем “АмплиСенс Rotavirus-EPh” и “АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL” (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), согласно инструкции по применению. Образцы фекалий, положительные на содержание ротавируса, разводили стерильным физиологическим раствором для получения 10%-ной суспензии, которую затем осветляли центрифугированием при 7000 об./мин в течение 30 мин. Для получения концентрированного препарата ротавирионов 0.8 мл осветленной суспензии наслаивали на “подушку” 30%-ной сахарозы в TN-буфере (0.02 М Трис, 1 М NaCl; pH 7.4) объемом 400 мкл, центрифугировали на микро-ультрацентрифуге Sorvall MX150 с ротором S140-AT (“Thermo Scientific”, США) в центрифужных пробирках объемом 2 см³ в течение 90 мин при 43000 об./мин и 4°C (Баррет и соавт., 1988). После ультрацентрифугирования осадок растворяли в 50 мкл дистиллированной воды. Наличие ротавирусов контролировали методом трансмиссионной электронной микроскопии при увеличении $\times 20000$. При идентификации ротавирионов основывались на специфической структурной организации вириона размером 75 нм, напоминающего колесо с короткими спицами и хорошо различимым ободом (rota – колесо) (Estes, Kapikian, 2007).

Подготовка бактериальной культуры. Штамм *Lactobacillus fermentum* 39 выращивали на среде Lactobacillus MRS Broth M369 (“HiMedia”, Индия), в течение 18 ч при $37 \pm 1^\circ\text{C}$, осаждали центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в буфере по Хеннелю (pH 6.0–6.1), доводя концентрацию клеток до 10^9 КОЕ/мл. Содержание и целостность клеток оценивали методом трансмиссионной электронной микроскопии при увеличении $\times 5000$.

Трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ) осуществляли на электронном микроскопе HT 7700 (“Hitachi”, Япония) при увеличениях 5000–20000. Препараты готовили стандартным методом “микрокапли” с применением электронно-микроскопических сеток с ячейками 400 меш и парлодиевой пленки-подложки. В качестве контрастера использовали 3% раствор фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК); pH 6.8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация штамма. При расसेве штамма *L. fermentum* 39 на плотную питательную среду МРС-4 наблюдали белые блестящие выпуклые колонии с ровными краями, от 0.5 до 3 мм в диаметре. При помощи MALDI TOF масс-спектрометрии культура идентифицирована как *Lactobacillus fermentum*, значения Score values составили от 2.0 до 2.217 (категория A), что говорит о достоверной идентификации.

Биохимические свойства штамма. Установлено, что биохимический профиль *L. fermentum* 39 соответствует заявленному в ОФС.1.7.1.0006.15. Тест-система API 50CHL содержит расширенный перечень из 49 субстратов, позволивший установить особенности метаболизма штамма *L. fermentum* 39, способность к гидролизу гентиобиозы, тагатазы, туранозы и арбутина. Для более чем 90% штаммов этого вида такие свойства не характерны, что позволяет считать их отличительной меткой данного штамма.

Результаты полногеномного секвенирования. В ходе проведения полногеномного секвенирования штамма была произведена сборка генома *de novo*, собрано 55 контигов со средним покрытием 250. Общая длина всех контигов составила 1829655 н.о., состав пар Г + Ц в ДНК – 51.6%. В процессе аннотации и анализа генома было определено 1683 последовательности, кодирующие белки, 51 последовательность tРНК, 13 – рРНК и 1 CRISPR-локус. Драфт генома депонирован в международной базе данных GenBank под номером LBDG00000000. Полученные характеристики генома сопоставимы с данными научной литературы, например, геном пробиотического штамма *Lactobacillus fermentum* 47-7, выделенного из кишечника младенца, имеет размер 1.83 Мб, состоит из 1636 проте-

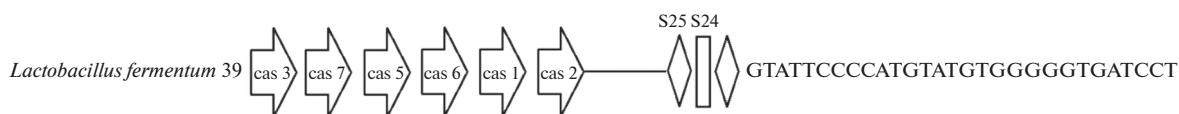


Рис. 1. Структурная организация CRISPR-локуса *L. fermentum* 39. Стрелками обозначены соответствующие Cas-белки, ромбами обозначены повторы, прямоугольниками — уникальные спейсеры.

ин-кодирующих генов, содержит 15 рРНК, 57 тРНК и 4 некодирующих РНК (Konuyane et al., 2019). Полногеномная последовательность штамма была проанализирована на наличие детерминант антибиотикорезистентности, патогенности и вирулентности. По данным сервиса PathogenFinder штамм охарактеризован как непатогенный для человека (score = 0.168), детерминант вирулентности и антибиотикорезистентности выявлено не было.

Способность к утилизации спектра сахаров традиционно лежит в основе фенотипической идентификации лактобацилл, и гены метаболизма сахаров являются одним из наиболее изученных кластеров их генома. В связи с этим был проведен детальный анализ сегмента генома, отвечающего за транспорт и утилизацию сахаров. Установлено, что микроорганизм обладает всем необходимым комплексом ферментов пентозофосфатного пути и ферментами, обеспечивающими транспорт и метаболизм сахаров. В геноме детерминированы опероны метаболизма и транспорта лактозы, арабинозы, сахарозы, галактозы, трегалозы и маннозы.

С использованием инструмента KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) из пакета RAST установлено, что пентозофосфатный путь исследуемого микроорганизма не имеет особенностей. Вариант метаболического кода штамма согласно RAST — 5.1991, что указывает на невозможность осуществления гликолиза за счет отсутствия ключевого фермента этого пути — фосфофруктокиназы. Полученные результаты соответствуют данным научной литературы и отражают особенности метаболизма облигатно гетероферментативных лактобацилл группы С (Hammes, Hertel, 1992).

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) — механизм, защищающий клетку от “генетической агрессии” и предотвращающий проникновение в клетку бактериофагов и плазмид (Равин, Шестаков, 2013). С целью поиска штаммоспецифичных особенностей был проанализирован CRISPR-локус штамма, содержащий высоко консервативные белки (Cas-белки) и короткие палиндромные повторы, разделенные спейсерами.

Установлено, что данный оперон находится в пределах 43 контига (NCBI: NZ_LBDG01000018.1), в его структуру входит комплекс cas-белков и 25 повторов, длиной 29 нуклеотидов, которые разделяют 24 уникальных спейсера (рис. 1).

Необходимо отметить, что данные о структуре данного региона и полиморфных спейсеров лежат в основе CRISPR-типирования микроорганизмов (Horvath et al., 2009; Платонов и соавт., 2013). При анализе организации оперона и представленности Cas-белков (наличие CAS3 белка) выявлено, что система CRISPR/Cas данного штамма относится к I типу (Makarova et al., 2015). При исследовании палиндромного повтора с использованием BLAST установлено, что его последовательность аналогична последовательности повтора CRISPR—Cas системы штаммов *L. fermentum* CECT 5716 и *L. fermentum* IFO 3956. В ходе анализа последовательности спейсеров в базе данных GenBank гомологичных последовательностей не было выявлено. Последовательности неидентифицированных спейсеров также можно рассматривать как возможные “метки штамма”.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Изучаемый нами штамм таксономически относится к семейству *Lactobacteriaceae*, роду *Lactobacterium*, является представителем вида *L. fermentum* — облигатных гетероферментативных лактобактерий группы С. Морфологически лактобактерии представляют собой грамположительные палочки размером 4–15 × 0.5–0.6 мкм, встречаются изогнутые и булавовидные формы (коринеформы), также короткие коккобактерии. Они, как правило, неподвижны, спор и капсул не образуют (The Firmicutes, 2009).

Как видно на электронных микрофотографиях клетки из свежесывращенной культуры (24 ч культивирования) *L. fermentum* 39 (рис. 2а) представляют собой толстые короткие палочки размером 0.56–0.7 × 1.8–2.0 мкм. Клетки способны производить экзополисахарид, который формирует вокруг тела клетки чехол и экспортируется в окружающую среду (рис. 2б). Со временем клетки увеличиваются, достигая размера 0.8–1.0 × 3.5–4.0 мкм, и принимают форму удлинённых палочек; экзополисахарид уплотняется, формируя слой толщиной 0.2–0.5 мкм. Клетки в “старой” культуре (3–10 сут культивирования) могут достигать размера 1.2 × 4.5 мкм, окружающий клетки массивный слизистый чехол в ряде случаев способен слущиваться с их поверхности (рис. 2в).

Полученные данные подтверждаются данными научной литературы, где указано, что штаммы *L. fermentum* способны продуцировать экзополисахарид (ЭПС) (Dan et al., 2009; Castro-Bravo et al.,

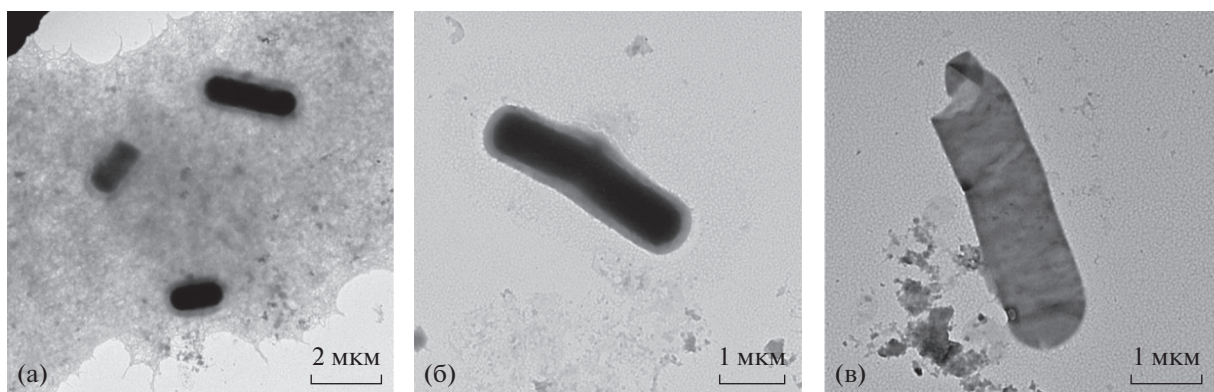


Рис. 2. Электронные микрофотографии *L. fermentum* 39.

2018; Oleksy, Klewicka, 2018), причем молекулы ЭПС у бактерий данного рода, в отличие от бактерий семейств *Streptococcus* и *Staphylococcus*, не имеют ковалентной связи с поверхностью клетки, что обуславливает его слущивание (Kang et al., 2015).

Ряд исследователей рассматривает наличие ЭПС как механизм адаптации, позволяющий данному микроорганизму приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды, в частности, реализовывать механизм адгезии, эффективно колонизировать и персистировать в ЖКТ (Badel et al., 2011; Хусаинов, 2014). Кроме того, образование экзополисахаридного матрикса позволяет предотвращать инфицирование культуры фагами, ЭПС служит резервным источником углерода при дефиците питательных веществ (Badel et al., 2011).

По мнению ряда исследователей для вида *L. fermentum* характерен синтез гомополисахаридов, в частности, α -глюкана (декстрана), по другим данным микроорганизмы этого вида продуцируют гетерополисахариды, включающие глюкозу и галактозу и состоящие из остатков α -D-глюкозо-1-P, β -D-глюкозо-1-P и α -D-галактозо-1-P (Dan et al., 2009; Хусаинов, 2014; Castro-Bravo et al., 2018; Oleksy, Klewicka, 2018).

Кластер генов синтеза экзополисахаридов у изучаемого штамма находится в пределах 20 контига (NCBI: LBDG01000035.1) и представлен совокупностью детерминант (рис. 3).

Анализ *eps* кластера *Lactobacillus fermentum* 39 позволил предположить, что штамм способен продуцировать гетерополисахарид с помощью реализации внутриклеточного механизма синтеза—перенос фосфатных групп на молекулу глюкозы и сборку “повторяющихся единиц” (repeating units) из глюкозы и галактозы посредством ферментов EpsE и EpsF, формирование из полученных единиц молекулы полисахарида во внеклеточном пространстве и регуляцию длины его цепи с помощью комплекса ферментов — EpsD, EpsC, EpsB.

Антивирусная активность штамма. С целью изучения активности штамма *Lactobacillus fermentum* 39 против ротавируса готовили суспензию клеток в буфере по Хенелю (pH 6.0–6.1) с концентрацией 10^9 КОЕ/мл. На рис. 4а представлена типичная для лактобактерий морфология клеток *Lactobacillus fermentum* 39. Также использовали водную суспензию ротавирионов, относительное содержание которых в препарате оценивали методом электронной микроскопии, показавшей наличие 10–15 вирионов на 1 мкм^2 пленки-подложки. В препарате были сделаны единичные находки бактериофагов с длинным несократительным хвостовым отростком (*Siphoviridae*), что, однако, не мешало решению поставленной задачи.

На рис. 4б видны вирионы ротавируса, имеющие характерную структурную организацию — напоминающие колесо с короткими спицами и хорошо различимым ободом (rota — колесо). На фото наблюдается смешанный контраст: контрастер окрашивает не только подложку, на которой расположен вирус, но и проникает внутрь вируса.

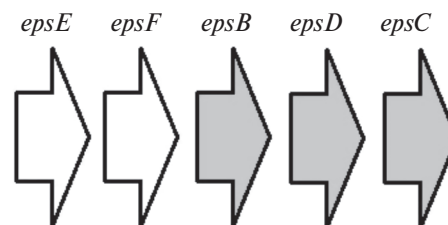


Рис. 3. Организация кластера синтеза экзополисахарида в геноме штамма *Lactobacillus fermentum* 39. EpsE — уденилкарпил-фосфат галактосефосфотрансфераза (EC 2.7.8.6) Wu68_08600; EpsF — гликозил-трансфераза (EC.2.4.1) Wu68_08595; EpsB — марганец-зависимая протеин-тирозин фосфатаза (EC 3.1.3.48) Wu68_08610; EpsD — тирозин-протеин киназа (EC 2.7.10.2) Wu68_08615; EpsC — тирозин-протеин трансмембранный модулятор Wu68_08620.

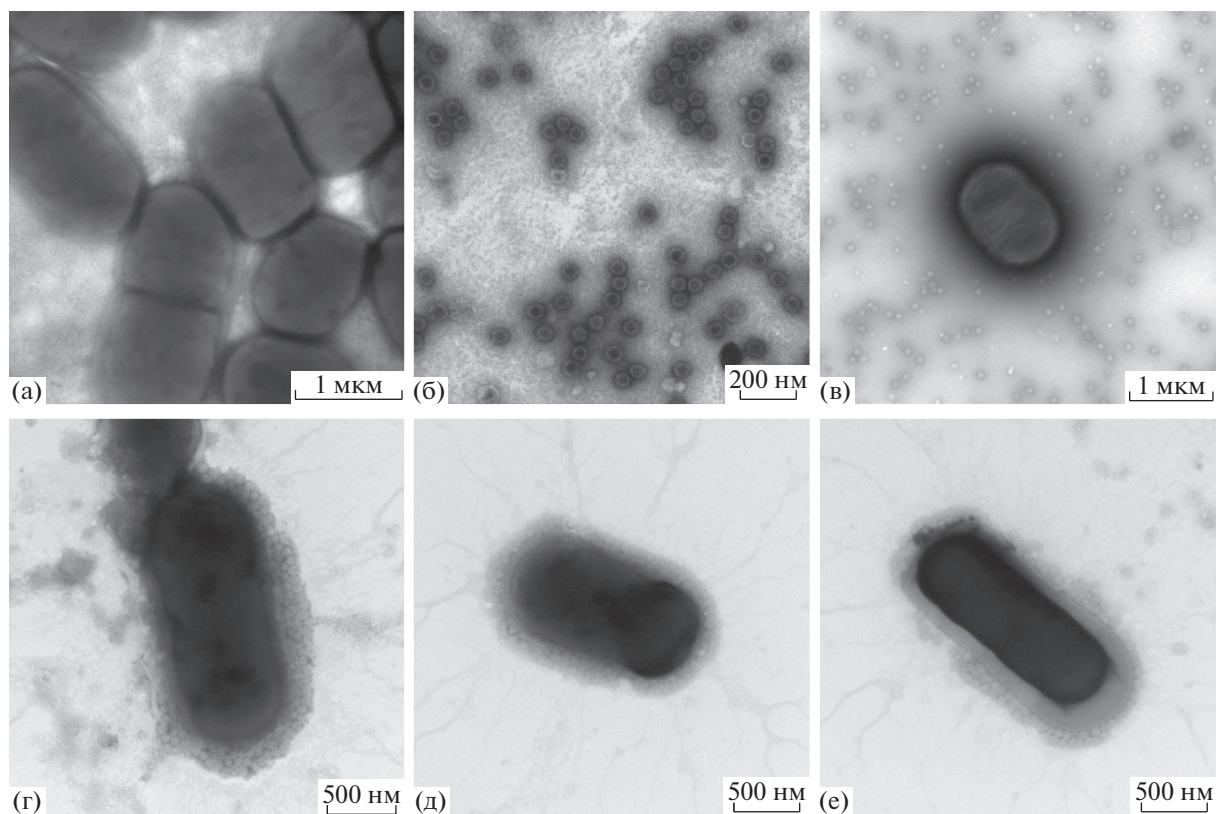


Рис. 4. Электронные микрофотографии взаимодействия *L. fermentum* 39 с вирионами ротавируса.

Подготовленные препараты клеток *Lactobacillus fermentum* 39 и ротавирионов смешивали в соотношении 1 : 1, конечный объем 100 мкл (рис. 4в). Затем смесь инкубировали в течение 10 мин при температуре 36.6°C и центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в дистиллированной воде, с использованием метода “микрокапли” готовили электронно-микроскопические препараты и просматривали в электронный микроскоп при увеличении $\times 5000$ и $\times 20000$, как осадок, так и супернатант.

В препаратах супернатанта ротавирионы обнаружены не были. Кроме этого, перед экспериментом препарат ротавируса проверяли на способность вирионов к самостоятельному осаждению в условиях центрифугирования при 10000 об./мин в течение 10 мин. Контроль осадка показал отсутствие ротавирионов.

В препаратах осадков, полученных из смеси лактобактерий и ротавирионов, на поверхности клеток лактобактерий внутри экзополисахарида наблюдались многослойные образования, состоящие из округлых структур разной формы и размера (рис. 4г–4е). При этом основную массу структур составляли округлые частицы размером ~ 75 нм с четко очерченным краем. Наличие экзополисахарида не позволило установить ультратонкую

организацию этих частиц, чтобы убедительно утверждать их принадлежность к ротавирионам. Однако отсутствие ротавирионов в супернатанте центрифугированной смеси, их неспособность самостоятельно оседать при 10000 об./мин и наличие вирусоподобных частиц в составе экзополисахаридного матрикса лактобактерий свидетельствуют о способности штамма *Lactobacillus fermentum* 39 неспецифически адсорбировать на своей поверхности ротавирионы.

Эффект адгезии вирусных частиц на поверхности бактериальных клеток, поверхности экзополисахарида и жгутиках бактерий — представителей нормофлоры кишечника человека отмечали и ранее (Гостева, 1984; Шелковая и соавт., 1991). Согласно данным научной литературы экзополисахарид бактерий играет важную роль в адгезии вирусов на поверхности бактериальной клетки, обеспечивая ультраструктурные взаимодействия с ротавирусами, хотя точный механизм этого процесса пока неизвестен. Сам эффект адгезии рассматривается как штаммоспецифичный признак и присущ не всем представителям рода *Lactobacillus* (Botic et al., 2007; Lei et al., 2016).

Эффект адгезии вирионов на поверхности клеток *L. fermentum* 39 можно расценивать как фактическое подтверждение важной биологиче-

ской роли пробиотических бактерий в защите кишечника от инфицирования патогенными вирусами, штамм может выступать в роли естественного и высоко эффективного сорбента, связывая большое число вирусных частиц и обеспечивая их исключение из пула свободных вирионов, способных к инфицированию здоровых клеток слизистой кишечника.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вирусология. Методы: Пер. с англ. / Баррет Т., Берд П., Клегг Дж., Гулд Э. и др. Под ред. Мейхи Б. М.: Мир, 1988. 344 с.
- Гостева В.В. Взаимодействие бактерий, вирусов и эукариотических клеток в условиях смешанной инфекции (электронно-микроскопическое исследование). Дис. ... канд. биол. н. Москва, 1984. 153 с.
- Ермоленко Е.И., Суворов А.Н., Фураева В.А. Противовирусный эффект *in vitro* метаболитов, выделяемых культурами энтерококка и лактобацилл // Материалы VI Российского съезда врачей инфекционистов, 2003. С. 371.
- Общая фармакопейная статья Лактосодержащие пробиотики. ОФС.1.7.1.0006.15. МЗ РФ. 2015. 10 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-1-0006-15-laktosoderzhashhie-probiotiki>. Дата обращения 25.04.2019.
- Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis* // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2013. № 2. С. 3–12.
- Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentsovskaya S.V., Anisimov A.P. Molecular typing of *Yersinia pestis* // Mol. Genet. Microbiol. Virol. 2013. V. 28. P. 41–51.
- Равин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. С. 972–984.
- Ravin N.V., Shestakov S.V. The genome of prokaryotes // Russ. J. Gen.: Applied Research. 2013. V. 17. P. 972–984.
- Хусаинов И.А. Современные представления о биосинтезе бактериальных экзополисахаридов // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 5. С. 167–172.
- Шелковая Н.Г., Купчинский Л.Г., Знаменский В.А., Бондаренко В.М. Электронно-микроскопическое изучение взаимодействия бактериальной кишечной микрофлоры и вирионов ротавируса // ЖМЭИ. 1991. № 9. С. 18–21.
- Ahmadi E., Alizadeh-Navaei R., Rezai M.S. Efficacy of probiotic use in acute rotavirus diarrhea in children: A systematic review and meta-analysis // Caspian J. Intern. Med. 2015. V. 6. P. 187–195.
- Ang L.Y., Too H.K., Tan E.L., Chow T.K., Shek L.P., Tham E.H., Alonso S. Antiviral activity of *Lactobacillus reuteri* protectis against Coxsackievirus A and Enterovirus 71 infection in human skeletal muscle and colon cell lines // Virol. J. 2016. V. 13. P. 111. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0567-6>
- Arena M.P., Elmastour F., Sane F., Drider D., Fiocco D., Spano G., Hober D. Inhibition of Coxsackievirus B4 by *Lactobacillus plantarum* // Microbiol. Res. 2018. V. 210. P. 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.03.008>
- Badel S., Bernardi T., Michaud P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides // Biotechnol. Adv. 2011. V. 29. P. 54–66.
- Botić T., Klingberg T.D., Weingart H., Cencic A. A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria // Int. J. Food Microbiol. 2007. V. 115. P. 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.044>
- Castro-Bravo N., Wells J.M., Margolles A., Ruas-Madiedo P. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 2426. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426>
- Cosentino S., Voldby L.M., Moller A.F., Lund O. Pathogen-Finder – distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data // PLoS One. 2013. V. 8. e77302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077302>
- Dan T., Fukuda K., Sugai-Bannai M., Takakuwa N., Motoshima H., Urashima T. Characterization and expression analysis of the exopolysaccharide gene cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603 // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009. V. 73. P. 2656–2664.
- Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses // Fields Virology / Eds. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. P. 1917–1973.
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats // Nucl. Acids Res. 2017. V. 35. P. 52–57.
- Hammes W.P., Hertel C. The genus of *Lactobacillus* and *Carnobacterium* // The Prokaryotes / Eds. Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. Edn. 2. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. V. 4.
- Horvath Ph., Coûté-Monvoisin A.C., Romero D.A., Boyavala P., Fremaux Ch., Barrangou R. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes // Int. J. Food Microbiol. 2009. V. 131. P. 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.030>
- Isolauri E. Probiotics for infectious diarrhea // Gut. 2003. V. 52. P. 436–437.
- Kang H., Gilbert C., Badeaux F., Atlan D., LaPointe G. A tyrosine phosphorylation switch controls the interaction between the transmembrane modulator protein Wzd and the tyrosine kinase Wze of *Lactobacillus rhamnosus* // BMC Microbiol. 2015. V. 15. P. 40. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0371-2>

- Kim K., Lee G., Thanh H.D., Kim J.H., Konkitt M., Yoon S., Park M., Yang S., Park E., Kim W. Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response // J. Dairy Sci. 2018. V. 101. P. 5702–5712. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14151>
- Konyanee A., Yotpanya P., Panya M., Engchanil C., Suebwongsa N., Namwat W., Thaw H., Faksri K., Sankuntaw N., Lulitanond V. Genome sequence of *Lactobacillus fermentum* 47-7, a good *in vitro* probiotic strain isolated from a healthy Thai infant // Microbiol. Res. Announc. 2019. V. 8. e01014-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01014-19>
- Lei S., Ramesh A., Twitchell E., Wen K., Bui T., Weiss M., Yang X., Kocher J., Li G., Giri-Rachman E., Trang N.V., Jiang X., Ryan E.P., Yuan L. High protective efficacy of probiotics and rice bran against human norovirus infection and diarrhea in gnotobiotic pigs // Front. Microbiol. 2016. P. 1699. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01699>
- Majamaa H., Isolauri E., Saxelin M., Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 1995. V. 3. P. 333–338.
- Makarova K.S., Wolf H., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems // Nat. Rev. Microbiol. 2015. P. 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Oleksy M., Klewicka E. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2018. V. 58. P. 450–462. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1187112>
- Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J.H., Franck A., Gibson G.R., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M., Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function // Br. J. Nutr. 1998. V. 80. P. S147–S171.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sunmola A.A., Ogbole O.O., Faleye T.O.C., Adetoye A., Adeniji J.A., Ayele F.A. Antiviral potentials of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus amylovorus*, and *Enterococcus hirae* against selected *Enterovirus* // Folia Microbiol. 2019. V. 64. P. 257–264. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0648-6>
- The Firmicutes // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. 2nd edn. New York: Springer, 2009. V. 3. 1450 p.
- Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., Aarestrup F.M., Larsen M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes // J. Antimicrob. Chemother. 2012. V. 67. P. 2640–2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>

The Probiotic Strain *Lactobacillus fermentum* 39: Biochemical Properties, Genomic Features, and Antiviral Activity

I. V. Soloveva¹, N. A. Novikova¹, A. G. Tochilina¹,*, I. V. Belova¹, A. Yu. Kashnikov¹,
T. A. Sashina¹, V. A. Zhirnov¹, and S. B. Molodtsova¹

¹Academician Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
Nizhny Novgorod, 603950 Russia

*e-mail: lab-lb@yandex.ru

Received May 26, 2020; revised July 16, 2020; accepted August 5, 2020

Abstract—*Lactobacillus fermentum* 39 is a well-known probiotic strain, which is widely used for production of pharmacopoeial probiotic preparations, dietary supplements, and foodstuffs enriched with probiotic microorganisms. In the course of analysis by transmission electron microscopy, the cell morphology was studied, biochemical properties of the strain and strain-specific characteristics of sugar metabolism were thoroughly analyzed, its full genome was sequenced, and the cluster of genes responsible for exopolysaccharide synthesis was characterized. The cells of *Lactobacillus fermentum* 39 were shown to be capable of adsorbing rotavirus particles, which allows us to substantiate a new aspect of application of probiotics, including this strain, in acute gastroenteritis caused by human rotaviruses.

Keywords: *Lactobacillus fermentum*, probiotic strains, human rotaviruses

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МИКОЦИНОТИПИРОВАНИЕ ВИДОВ *CYBERLINDNERA*

© 2021 г. В. И. Голубев*

Всероссийская коллекция микроорганизмов,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, 142290 Россия

*e-mail: wig.zum@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.08.2020 г.

После доработки 14.09.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

Виды *Cyberlindnera* по чувствительности к микоцинам *Wickerhamomyces anomalus* распадаются на две группы, одна из которых включает гетероталлические виды с шляповидными аскоспорами, а другая — гомоталлические виды с сатурновидными аскоспорами. Типовой штамм вида, носители его синонимов и анаморф имеют идентичные реакции к микоцинам.

Ключевые слова: филогения, таксономия, микоцины, аскоспоры

DOI: 10.31857/S0026365621010067

Наименование рода *Cyberlindnera* (Kurtzman et al.) Minter (Minter, 2009) предложено взамен названия *Lindnera*, поскольку последнее уже было использовано. Предложение рода *Lindnera* (Kurtzman et al., 2008) полностью основано на результатах секвенирования четырех-пяти генов и включает виды, принадлежавшие ранее к родам *Pichia* Hansen и *Williopsis* Zender. Согласно результатам этого филогенетического анализа род *Lindnera* (= *Cyberlindnera*) распадается на две группы и, в целом, он весьма гетерогенен по многим фенотипическим признакам, в том числе таким, которые обычно используют на уровне рода, например, морфология аскоспор.

На таксономическую гетерогенность родов дрожжей могут указывать и результаты микоцинотипирования, поскольку виды монофилетических таксонов имеют, как правило, сходные реакции к микоцинам (киллер-токсинам), действие которых таксоноспецифично, коррелируя со многими цитологическими и хемотаксономическими признаками (Голубев, 2012).

В настоящей работе микоцинотипирование осуществлено применительно к роду *Cyberlindnera* с использованием микоциногенных штаммов *Wickerhamomyces anomalus* (Голубев, 2015).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все использованные в работе штаммы дрожжей (табл. 1) поддерживаются во Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru>), вследствие чего аббревиатура, ВКМ Y-, перед номерами штаммов не приводится.

Тестирование чувствительности штаммов дрожжей к микоцинам *W. anomalus* проводили на глюкозо-пептонном агаре (глюкоза — 5; пептон — 2.5; дрожжевой экстракт — 2; агар — 20; г/л) с цитрат-фосфатным буфером (pH 4.5) и 3% NaCl. На поверхность ее наносили 0.05 мл суспензии (~10⁵ клеток/мл) обследуемых 2–3-суточных культур *Cyberlindnera*, выращенных на сусло-агаре, тщательно растирали шпателем и затем штрихом наносили обильный инокулюм микоциногенных штаммов. Засеянные чашки инкубировали при комнатной температуре до появления роста газона. При формировании вокруг культур *Wickerhamomyces* зон подавления роста шириной несколько мм, обследуемые штаммы регистрировали как чувствительные, если она не превышала 1–2 мм — относили к слабо чувствительным, а при отсутствии ингибирования роста — к нечувствительным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди обследованных 53 штаммов *W. anomalus* согласно внутривидовому и внутриродовому спектрам действия выявлено три группы с пятью подгруппами (Голубев, 2015). Члены подгруппы I-1 (10 штаммов) не обладали микоциногенной активностью, а подгруппы I-2 (пять штаммов) слабо ингибировали рост лишь единичных видов *Wickerhamomyces*. Все эти 15 штаммов не действовали на исследованные штаммы протестированных видов *Cyberlindnera*.

Остальные культуры *W. anomalus* проявляли антифунгальную активность против *Cyberlindnera*

Таблица 1. Типы чувствительности видов *Cyberlindnera* и филогенетически им родственных *Candida* spp. к микоцинам штаммов *Wickerhamomyces anomalus*

Виды, штаммы	Группы микоциногенных штаммов <i>W. anomalus</i>							
	II-3			III-4			III-5	
	2512 2513	150 152	148 153 ^T	154 ^T	160	170 ^T	147 174 1086 1905–1907 2037–2041	140–145 149, 151 155, 159 161–163 171 175, 177 1087 1431
<i>Cyb. bimundalis</i> 1407 ^T , 1408	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freyschussii</i> 1454 ^T , 2421	+	C	+	+	+	+	+	+
<i>Cyb. rhodanensis</i> 277, 1604 ^T (<i>Endomycopsis balearica</i>)	+	C	+	+	+	+	+	+
<i>Cyb. fabianii</i> 1405, 1406, 1450 ^T , 2557	C	C	C	+	+	+	+	+
<i>C. maritima</i> 2593 ^T	C	C	C	+	+	+	+	+
<i>C. vartiovaarae</i> 2625 ^T	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>Cyb. americana</i> 1409 ^T	–	–	C	+	+	+	+	+
<i>Cyb. veronae</i> 2163 ^A	–	–	C	+	+	+	+	+
<i>Cyb. petersonii</i> 1410 ^T	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>Cyb. sargentensis</i> 2087 ^T	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>Cyb. jadinii</i> 74 ^T (<i>C. arborea</i>), 768 ^T (<i>Torulopsis utilis</i> var. <i>major</i>), 1456 ^T (<i>C. guilliermodii</i> var. <i>nitratophila</i>), 1668, 2316, 2437	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>Cyb. mrakii</i> 173 ^T	–	–	–	–	–	+	–	–
<i>Cyb. saturnus</i> 1403 ^T (<i>Hansenula coprophila</i>), 2551 ^T (<i>H. beijerinckii</i>), 2552 ^{NT}	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cyb. suaveolens</i> 2990 ^T	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cyb. subsufficiens</i> 2220 ^T	–	–	–	–	–	–	–	–

Подчеркнуты гетероталлические виды *Cyberlindnera* с шляповидными аскоспорами, остальные — гомоталлические с сатурновидными аскоспорами. T — типовой, NT — неотиповой, A — авторский штамм вида или носителя синонима. “+” — чувствительные, “C” — слабо чувствительные, “–” — нечувствительные.

spp., значительно различаясь между собой диапазонами действия (табл. 1). Из них штаммы III-ей группы *W. anomalus* имели более широкий спектр ингибируемых ими видов *Cyberlindnera*, чем II-ой. Рецептором одного из фунгицидных микоцинов 5-ой подгруппы с молекулярной массой свыше 100 кДа служит β-1,6-D-глюкан (Farkas et al., 2012).

Подгруппы же, сформированные согласно спектрам внутри рода *Wickerhamomyces*, при тестировании *Cyberlindnera* spp. дополнительно обнаруживали неоднородность, незначительно отличаясь друг от друга по отдельным видам. Здесь необходимо подчеркнуть, что типовые штаммы видов, типовые штаммы носителей их синонимов и типовые штаммы анаморф идентичны по чувствительности к микоцинам, т.е. микоцитотипиро-

вание подтверждает как синонимику, так и телеоморф-анаморфные взаимосвязи *Cyberlindnera* spp.

Результаты микоцинотипирования конгруэнтны с данными филогенетического анализа: согласно им *Cyberlindnera* также распадается на две группы видов, бывшие ранее членами, соответственно, родов *Pichia* и *Williopsis*, а также их анаморфами в роде *Candida* Berkhout. Первые почти все оказались чувствительны к микоцинам III-ей и многие к микоцинам II-ой группы *W. anomalus*, тогда как вторые были устойчивы (табл. 1). Исключение составляет *Cyb. sargentensis*, чувствительный, в отличие от всех остальных бывших видов *Williopsis*, к микоцинам подгруппы III-4, а также *Cyb. mrakii*, чувствительный к микоцину одного из штаммов той же подгруппы.

Внимательное рассмотрение выявляемых при микоцинотипировании двух групп внутри рода *Cyberlindnera* обнаруживает, что они различаются также и по системам полового размножения: первая включает гетероталлические виды, а вторая гомоталлические (табл. 1), что, по-видимому, обусловлено их разной экологией (Дьяков, 1999). Гетероталлические виды ассоциированы преимущественно с насекомыми, а гомоталлические обычно обнаруживаются в гидроморфных почвах (Вустин, Бабьева, 1981).

Более того, указанные группы видов имеют еще и разную форму аскоспор: шляповидные у бывших *Pichia* и сатурновидные у бывших *Williopsis*. Поскольку для функционирования как систем полового размножения, так и формирования аскоспор (Neiman, 2005) задействовано большое количество генов, то данные характеристики *a priori* обладают весьма значительным таксономическим весом, применимыми для дефиниции таксонов не ниже родового уровня.

Таким образом, выявляемые как при филогенетическом анализе, так и при микоцинотипировании внутри *Cyberlindnera* группы видов следует, очевидно, рассматривать как самостоятельные роды.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вустин М.М., Бабьева И.П. Природные местообитания дрожжей родов *Williopsis* и *Zygowilliopsis* // Микробиология. 1981. Т. 50. С. 718–722.
- Голубев В.И. Микоцинотипирование // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46. № 1. С. 3–13.
- Голубев В.И. Внутривидовая и внутриродовая антагонистическая активность *Wickerhamomyces anomalus* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 212–215.
- Golubev W.I. Intraspecific and intrageneric antagonistic activity of *Wickerhamomyces anomalus* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 190–193.
- Дьяков Ю.Т. Системы размножения грибов и их эволюция // Микология и фитопатология. 1999. Т. 33. № 3. С. 137–149.
- Farkas Z., Marki-Zay J., Kucsera J., Vagvolgyi Cs., Golubev W.I., Pfeiffer I. Characterization two different toxins of *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) VKM Y-159 // Acta Biol. Hungarica. 2012. V. 63. P. 277–287.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J., Basehoar-Powers E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. // FEMS Yeast Res. 2008. V. 8. P. 939–954.
- Minter D.W. *Cyberlindnera*, a replacement name for *Lindnera* Kurtzman et al. nom. illegit. // Mycotaxon. 2009. V. 110. P. 473–476.
- Neiman A.M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005. V. 69. P. 565–584.

Mycocinotyping of *Cyberlindnera* Species

W. I. Golubev*

All-Russian Collection of Microorganisms, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: wig.zym@yandex.ru

Received August 4, 2020; revised September 14, 2020; accepted September 29, 2020

Abstract—According to their sensitivity to *Wickerhamomyces anomalus* mycocins, *Cyberlindnera* spp. may be subdivided into two groups, one comprising heterothallic species with hat-shaped ascospores and another containing homothallic ones with Saturn-shaped ascospores. Type strain of a species, its synonyms and anamorphs have identical reactions to mycocins.

Keywords: phylogeny, taxonomy, mycocins, ascospores

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ
МИКРОБИОМА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2021 г. А. С. Дмитриева^{а, *}, И. А. Максимова^а, А. В. Качалкин^{а, b}, А. В. Марков^{а, c}

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

^bИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290 Россия

^cПалеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, Москва, 117997 Россия

*e-mail: dmnastya89@mail.ru

Поступила в редакцию 16.09.2020 г.

После доработки 03.10.2020 г.

Принята к публикации 15.10.2020 г.

Плодовые мушки *Drosophila melanogaster* — важный модельный объект для изучения многоплановых взаимодействий между многоклеточным организмом и его микробиомом. Характер этих взаимодействий во многом определяется закономерными изменениями численности и состава компонентов микробиома, происходящими в течение жизни организма-хозяина. Имеющиеся на сегодняшний день данные об изменениях микробиома дрозофил в зависимости от возраста и стадии жизненного цикла насекомого относятся в основном к бактериальной части микробиома, в то время как об аналогичных изменениях не менее важного дрожжевого компонента известно немного. В данной работе изучен количественный и качественный состав дрожжевой составляющей микробиома дрозофил из трех лабораторных линий, различающихся условиями содержания, на четырех возрастных стадиях: у поздних личинок и имаго в возрасте 1, 7 и 14 сут после выхода из куколки. Во всех трех линиях численность дрожжей сходным образом меняется с возрастом насекомых, причем максимальное количество дрожжей характерно для имаго 7-дневного возраста, а минимальное — для имаго 1-дневного возраста. У мух, содержащихся на умеренно неблагоприятных субстратах с добавлением 2 и 4% NaCl, численность и видовое разнообразие дрожжей на всех четырех стадиях выше, чем у мух, содержащихся на стандартном (благоприятном) кормовом субстрате. Результаты свидетельствуют о непостоянстве дрожжевой составляющей микробиома дрозофил и его закономерных изменениях с возрастом насекомого, что необходимо учитывать при изучении взаимоотношений между симбиотическими дрожжами и организмом-хозяином.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, симбиотические дрожжи, микробиом, возрастные изменения

DOI: 10.31857/S0026365621020038

Важную роль в жизни большинства многоклеточных организмов играет микробиом — сообщество разнообразных микроорганизмов (прокариот, протистов, грибов), связанных с организмом-хозяином и друг с другом сложной сетью взаимодействий, которые могут варьировать от антагонистических до мутуалистических. Компоненты микробиома могут передаваться от родителей к потомкам и влиять на различные аспекты физиологии, онтогенеза и поведения организмов-хозяев, а также на их адаптацию к меняющимся условиям среды (McFall-Ngai, 2002; Zilber-Rosenberg, 2008; Rosenberg, 2007; Dmitrieva et al., 2019). Поэтому в рамках набирающей популярность “хологеномной теории эволюции” предлагается считать базовой единицей отбора не отдельный организм, а “холобионт” (Margulis, Fester, 1991) или “аутоценоз” (Савинов, 2012), то есть систему, включающую макроорганизм и его микробиом (Zilber-Rosenberg, Rosenberg, 2008;

Rosenberg et al., 2009; Bordenstein, Theis, 2015). Впрочем, хологеномная теория подвергается критике со стороны других исследователей, подчеркивающих неустойчивость передачи микробиома в ряду поколений, а также нередко наблюдаемую эфемерность и оппортунистический характер взаимоотношений между организмом-хозяином и ассоциированными с ним микробами (Moran, Sloan, 2015).

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* является одним из наиболее популярных модельных объектов для изучения этих взаимоотношений в силу хорошей изученности данного вида и относительной простоты его микробиома, сходного по ряду признаков с микробиомом млекопитающих (Erkosar et al., 2013; Erkosar, Leulier, 2014; Newell et al., 2014; Hoang et al., 2015; Trinder et al., 2017; Douglas, 2018).

Ключевыми компонентами микробиома *D. melanogaster* являются бактерии и дрожжи, переноси-

мые мухами в кишечнике и на поверхности тела. Большинство исследований в настоящее время фокусируется на кишечных бактериях дрозофил (Brummel et al., 2004; Shin et al., 2011; Broderick, Lemaitre, 2012; Erkosar et al., 2013; Yamada et al., 2015; Wong et al., 2016). Между тем дрожжи, по-видимому, составляют не менее важную часть микробиома плодовых мушек (Starmer, 1981; Anagnostou et al., 2010; Becher et al., 2012; Chandler et al., 2012; Hoang et al., 2015). Дрожжи необходимы для нормального развития личинок *D. melanogaster* на природных субстратах (Becher et al., 2012). Разные виды дрожжей по-разному влияют на выживаемость и скорость развития личинок, а личинки проявляют избирательность, предпочитая питаться теми дрожжами, которые положительно влияют на их рост (Starmer, 1981; Anagnostou et al., 2010). Личинки и имаго дрозофил, со своей стороны, влияют на видовой состав дрожжевых сообществ, развивающихся на кормовых субстратах, способствуя размножению определенных видов дрожжей и препятствуя росту мицелиальных грибов (Stamps et al., 2012). Некоторые виды дрожжей выдерживают прохождение через кишечник дрозофил, что позволяет дрозофилам служить эффективными распространителями дрожжей в природных условиях (Reuter et al., 2007; Coluccio et al., 2008; Stamps et al., 2012; Hoang et al., 2015; Günther, Goddard, 2019). Также известно, что видовой состав дрожжевой составляющей микробиома дрозофилид сильно зависит от диеты мух (Chandler et al., 2012). Ранее нами было показано, что изменения дрожжевой составляющей микробиома вносят существенный вклад в наблюдаемую в эволюционных экспериментах адаптацию лабораторных линий *D. melanogaster* к кормовым субстратам с повышенным содержанием NaCl (Панченко и соавт., 2017; Ивницкий и соавт., 2018; Dmitrieva et al., 2019).

Исключительно важным, но слабо изученным аспектом взаимоотношений между микробиомом и организмом-хозяином являются закономерные изменения численности и состава микробиома, происходящие в течение жизни макроорганизма (Nicholson et al., 2012). Такие изменения показаны для кишечных бактерий *D. melanogaster*. Общая численность бактерий в кишечнике личинок постепенно растет, выходя на плато к третьей личиночной стадии, и резко снижается на стадии куколки (Broderick, Lemaitre, 2012). В течение жизни имаго в кишечнике *D. melanogaster* преобладание *Lactobacillus fructivorans* и других лактобацилл может постепенно сменяться преобладанием *Acetobacter pomorum* и других ацетобактерий (Wong et al., 2011; Erkosar et al., 2013). Также показано, что рост численности некоторых групп бактерий, особенно гаммапротеобактерий, происходящий в кишечнике *D. melanogaster* в течение жизни имаго, может приводить к дисфункции ки-

шечника, ускоряя старение и смерть (Clark et al., 2015). В отличие от бактериальной части микробиома *D. melanogaster*, о возрастных изменениях его дрожжевой части известно очень немного. По-видимому, живые дрожжевые клетки могут передаваться от личинки к имаго в ходе метаморфоза, но только при наличии в кишечнике личинки определенных кишечных бактерий (Guilhot et al., 2020). Данных об изменениях дрожжевой части микробиома с возрастом имаго в литературе найти не удалось. Отсутствие детальных данных об изменениях дрожжевой составляющей микробиома дрозофил, связанных с возрастом и стадией жизненного цикла, препятствует адекватному пониманию взаимоотношений дрожжей с насекомым-хозяином.

В данном исследовании мы предприняли попытку частично восполнить этот пробел, охарактеризовав численность и видовой состав дрожжевой части микробиома трех лабораторных линий *D. melanogaster* на четырех возрастных стадиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подопытные линии мух. Изучен состав дрожжевой составляющей микробиома у трех лабораторных линий *D. melanogaster* (линии Н, 2С, 4С), полученных от одной исходной популяции в октябре 2014 г. и содержащихся на разных кормовых субстратах в рамках эволюционного эксперимента, проводимого на кафедре биологической эволюции МГУ (Марков и соавт., 2015; Belkina et al., 2018; Dmitrieva et al., 2019). Исходная популяция была получена в начале сентября 2014 г. от 30 диких особей, пойманных на юго-западе г. Москвы.

Н — контрольная линия, выращиваемая на стандартной благоприятной кормовой среде (60 г дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, 35 г манной крупы, 50 г сахара, 45 г измельченного изюма кипятятся в 1 л воды в течение 4 ч; за 15 мин до окончания кипячения добавляется 8 г агара и по окончании кипячения — 2 г пропионовой кислоты).

2С и 4С — линии, выращиваемые на такой же среде с добавлением 2 и 4% NaCl соответственно.

Популяции содержали в цилиндрических стеклянных банках с кормом диаметром 64 мм и высотой 100 мм, закрытых ватными, обернутыми в марлю, пробками, при естественном освещении и температуре 20–25°C. Объем корма в банке составлял 84 мл. Каждая популяция занимала по три банки. Каждые две недели все имаго, находящиеся в сосуде, обездвигивали углекислым газом и извлекали из сосуда; затем из них случайным образом отбирали 10 самцов и 10 самок, которые помещали в банку со свежим кормом. Также в каждой банке находился цилиндрический пластиковый резервуар объемом 1 мл, заполненный мокрой ватой (поилка). До начала июня 2015 г.

имаго из всех трех банок, относящихся к данной популяции, перемешивались перед каждой пересадкой в свежие банки. Таким образом, население трех сосудов составляло единую популяцию. Начиная с июня 2015 г. тройки линий, составляющие каждую популяцию, содержали отдельно: из каждой банки мухи пересаживали только в одну банку со свежим кормом.

Ранее нами было показано, что мухи из линий 2С и 4С уже спустя год после начала адаптации к соленому кормовому субстрату размножались на таком субстрате эффективнее (оставляли больше потомков), чем мухи из контрольной линии Н (Дмитриева и соавт., 2016). Это различие сохранилось спустя три года после начала эволюционного эксперимента, и было показано, что дрожжевая часть микробиома вносила существенный вклад в наблюдаемую адаптацию дрозофил к соленому субстрату (Дмитриева и соавт., 2016; Панченко и соавт., 2017; Ивницкий и соавт., 2018).

Стадии жизненного цикла. Для каждой из трех линий состав дрожжевой составляющей микробиома оценивали на четырех стадиях жизненного цикла: личинки последней стадии (непосредственно перед окукливанием), молодые имаго в возрасте 1 сут после выхода их куколки, имаго в возрасте 7 сут и имаго в возрасте 14 сут.

Методика проведения эксперимента. Эксперимент проводили в марте–мае 2019 г. Из каждой линии мух случайным образом выбирали “родителей”: 30 самцов и 30 самок. Это делали в конце двухнедельного цикла (см. выше); родители представляли собой молодых имаго в возрасте не более 2–3 сут с момента выхода из куколки. Родителей из каждой линии рассаживали в три банки со свежим кормом, соответствующим данной линии (стандартный корм для линии Н, корм с 2% NaCl для линии 2С, корм с 4% NaCl для линии 4С), по 10 самцов и 10 самок в каждую банку. Таким образом, всего было девять банок с родителями, по три банки на линию. Через 7 сут родителей удаляли из банок. Еще через 5 сут производили отбор личинок для анализа дрожжевой составляющей микробиома. Отбирались личинки последней стадии накануне окукливания (такие личинки покидают кормовой субстрат и выползают на стенки банки). Из каждой линии отбирали по 10 личинок, из которых готовили гомогенат, который затем высевали на пять чашек Петри (см. ниже). Одновременно с личинками из каждой линии отбирали для приготовления гомогената по 10 молодых имаго, вышедших из куколки в течение предшествующих суток. Остальные имаго, тоже вышедшие из куколки в течение предшествующих суток (“фокальная группа” мух с известным нам возрастом), оставались в своих банках. По достижении этими имаго возраста 7 и 14 сут из них отбирали по 10 особей (в каждой из трех ли-

ний) для приготовления гомогената, который высевали на пять чашек Петри. В кормовом субстрате при этом продолжали жить и развиваться личинки, среди которых были как сиблинги, так и потомки мух из “фокальной группы”. Такой дизайн эксперимента был выбран, чтобы сукцессия микроорганизмов в кормовом субстрате развивалась “естественным” для данной линии мух образом. Чтобы к фокальной группе мух известного нам возраста не подмешивались новые мухи, из каждой банки регулярно удаляли появляющиеся на ее стенках куколки.

Таким образом, методика эксперимента была ориентирована на анализ естественной для данной линии мух возрастной динамики дрожжевого микробиома. При этом мы не ставили задачу деления изменений микробиома, обусловленных возрастными изменениями и сменой стадий жизненного цикла самих мух и естественной сукцессией микроорганизмов в кормовом субстрате (подробнее этот вопрос рассмотрен в разделе “Обсуждение”). Не ставилась также и задача деления дрожжей, находящихся на кутикуле и в пищеварительном тракте насекомого (для решения этих задач необходимы дополнительные исследования и другие методические подходы).

Методика приготовления гомогенатов личинок и имаго. Всего было приготовлено 12 гомогенатов (по одному для каждой из четырех возрастных стадий каждой из трех линий мух). Для приготовления гомогената 10 особей (личинок или имаго) помещали для обездвиживания в морозильную камеру с температурой -20°C на 3 мин. Затем из этих насекомых и 0.5 мл стерильной водопроводной воды готовили гомогенат. Для этого в стерильные эппендорфы с водой помещали мух, растирали их стерильным силиконовым пестиком, а затем обрабатывали на вортексе Multi Reax (“Heidolph”, Германия) в режиме 1700 об./мин в течение 10 мин.

Методика оценки состава дрожжевой составляющей микробиома. Состав дрожжевой составляющей микробиома изучали с помощью метода микробиологического посева гомогенатов мух из линий Н, 2С, 4С на плотную питательную среду. Для этого к 100 мкл гомогената (см. выше) добавляли 900 мкл стерильной воды и еще раз обрабатывали на вортексе в течение 3 мин. Аликвоту полученной суспензии объемом 50 мкл с помощью дозатора со стерильным наконечником наносили на поверхность агаризованной питательной среды ГПД следующего состава (г/л): глюкоза — 20, пептон — 10, дрожжевой экстракт — 5, агар — 20. Для подавления роста бактерий в среду перед разливом добавляли хлорамфеникол (1 г/л). Каждый из 12 гомогенатов был нами посеян по методу Дригальского в 5-кратной повторности (по 5 чашек Петри на каждую комбинацию линия/воз-

растная стадия). Чашки с посевами инкубировали в течение 5 сут при комнатной температуре (20–22°C). По прошествии этого времени все выросшие колонии дрожжей были на основании макроморфологических признаков разделены на типы и подсчитаны. В результате для каждого образца была определена общая численность дрожжей в колониеобразующих единицах (КОЕ) в пересчете на одну муху. По два–три штамма из каждого морфотипа колоний было выделено в чистую культуру, а затем на основании культуральных и микроморфологических признаков все полученные культуры были сгруппированы. Видовую идентификацию дрожжевых грибов проводили на основе анализа нуклеотидной последовательности ITS региона рДНК. Выделение ДНК и постановку ПЦР проводили по ранее описанной методике (Глушакова, Качалкин, 2017). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer в ЗАО “Евроген” (Москва). Для секвенирования был использован праймер ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G). Идентификацию дрожжей на основании полученных результатов секвенирования проводили, используя данные генбанка NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базы данных MycoID (www.mycobank.org). Полученные в ходе исследования нуклеотидные последовательности были размещены в генбанке NCBI (MT664162–MT664168).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследованных гомогенатах обнаружено в общей сложности четыре вида дрожжей (рис. 1):

1) *Candida californica* Mrak & McClung ex (Mrak & McClung ex K.W. Anderson & C.E. Skinner, 2006). Вид обнаружен в линии 2С у имаго в возрасте 1 сут и в линии 4С на всех четырех возрастных стадиях;

2) *Pichia membranifaciens* (E.C. Hansen, 1904) E.C. Hansen. Вид обнаружен в линии 2С у имаго в возрасте 7 сут и в линии 4С у имаго в возрасте 1 сут;

3) *Pichia occidentalis* (Kurtzman, Smiley & Johnson, 2008) Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers. Вид обнаружен в линии Н у имаго в возрасте 7 сут, а в двух остальных линиях — на всех четырех возрастных стадиях. В целом можно сказать, что данный вид является доминирующим у изученных линий дрозофил;

4) *Zygosaccharomyces bailii* (Barnett et al., 1983). Вид обнаружен только в линии Н у имаго в возрасте 14 сут.

Численность и видовой состав дрожжевой составляющей микробиома различались у разных линий мух и на разных возрастных стадиях.

Линия Н. В гомогенатах мух, содержащихся на корме без добавления соли, обнаружено наименьшее количество дрожжей (рис. 1а). У личинок и имаго в возрасте 1 сут дрожжи в посевах отсутствуют. При этом в посевах обнаружено большое количество мицелиальных грибов и бактерий, чего не наблюдалось во всех остальных посевах (гомогенатах). Возможно, это говорит об антагонистических отношениях между компонентами микробиома (дрожжи подавляют развитие бактерий и мицелиальных грибов или наоборот).

В посевах гомогената имаго в возрасте 7 сут обнаружено значительно количество дрожжей только одного вида *P. occidentalis*, средняя численность составила 5×10^4 КОЕ на муху.

В гомогенате имаго в возрасте 14 сут дрожжи тоже присутствовали, но в гораздо меньшем количестве — лишь 4.8 КОЕ на муху. Дрожжи в посевах представлены видом *Z. bailii*, который встречен только у этой линии и только на этой возрастной стадии.

Линия 2С. В гомогенатах мух, содержащихся на корме с 2% NaCl, дрожжей обнаружено намного больше, причем на всех четырех возрастных стадиях (рис. 1б). Так, в гомогенате личинок присутствовало много дрожжей вида *P. occidentalis* (1.4×10^5 КОЕ на муху). У имаго в возрасте 1 сут дрожжей значительно меньше (12.4 КОЕ на муху), причем они представлены сразу двумя видами: *P. occidentalis* и *C. californica*. В посевах гомогената имаго в возрасте 7 сут обнаружено значительное количество дрожжей (2.0×10^5 КОЕ на муху) двух видов: *P. occidentalis* и *P. membranifaciens*. В гомогенате имаго в возрасте 14 сут дрожжи тоже присутствовали, но в меньшем количестве (3.7×10^4 КОЕ на муху). Они были представлены лишь одним видом *P. occidentalis*.

Линия 4С. В гомогенатах мух, содержащихся на корме с 4% NaCl, также обнаружено большое количество дрожжей (рис. 1в). У личинок присутствовали виды *C. californica* и *P. membranifaciens*; общая численность дрожжей — 1.1×10^5 КОЕ на муху. У имаго в возрасте 1 сут дрожжей намного меньше (2.5×10^2 КОЕ на муху), однако они принадлежали сразу к трем разным видам (*P. occidentalis*, *P. membranifaciens*, *C. californica*). В посевах гомогената имаго в возрасте 7 сут обнаружено много (2.4×10^5 КОЕ на муху) дрожжей двух видов (*P. occidentalis*, *C. californica*). В гомогенате имаго в возрасте 14 сут дрожжи тоже присутствовали, но в меньшем количестве (2.7×10^3 КОЕ на муху); представлены те же два вида. Видовое разнообразие дрожжей в линии 4С в целом выше, чем в линии 2С: в первой линии на всех четырех возрастных стадиях обнаружено более одного вида дрожжей, тогда как во второй линии на двух из четырех стадий в посевах был обнаружен только один вид дрожжей.

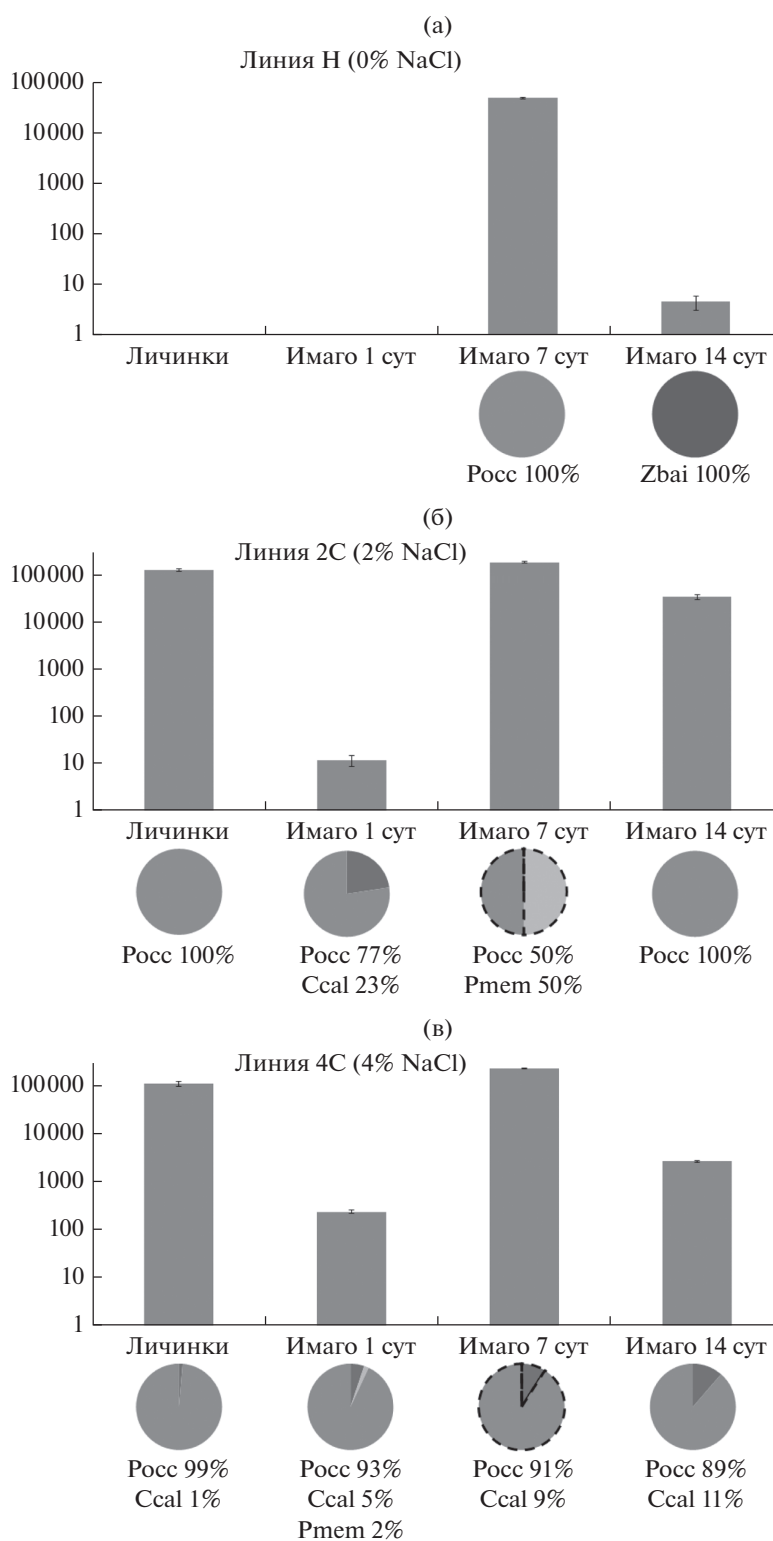


Рис. 1. Численность и видовой состав дрожжевого микробиома мух *Drosophila melanogaster* из трех лабораторных линий (а – Н; б – 2С; в – 4С) на четырех возрастных стадиях (личинки и имаго в возрасте 1, 7 и 14 сут). Показана общая численность дрожжей в КОЕ на одну муху, $\pm$ стандартная ошибка, шкала логарифмическая. Круговые диаграммы показывают видовой состав дрожжей, обнаруженных в посевах: Ccal – *Candida californica*, Pocc – *Pichia occidentalis*, Pmem – *Pichia membranifacies*, Zbai – *Zygosaccharomyces bailii*. В двух случаях (круговые диаграммы, выделенные пунктиром) нам не удалось точно определить относительное обилие обнаруженных видов дрожжей; в этих случаях показано их приблизительное соотношение: в линии 2С у имаго в возрасте 7 сут дрожжи *P. occidentalis* и *P. membranifacies* представлены примерно в равной пропорции, в линии 4С у имаго того же возраста дрожжи *P. occidentalis* и *C. californica* присутствуют в соотношении, близком к 10 : 1.

Таким образом, проведенный анализ показал существенные различия по количественному и видовому составу дрожжей в зависимости как от линии мух, так и от возрастной стадии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Дрожжевая составляющая микробиома различается у дрозофил, содержащихся на разных кормовых субстратах. Проведенный анализ показал, что в линиях 2С и 4С, содержащихся на кормовом субстрате с добавлением 2 и 4% соли, количество колоний дрожжей в посевах больше и их видовое разнообразие было выше, чем в линии Н, содержащейся на корме без добавления соли. Это справедливо для всех четырех рассмотренных возрастных стадий. Набор обнаруженных видов дрожжей тоже различался: вид *P. occidentalis* доминировал у всех трех линий, *Z. bailii* обнаружен только в линии Н, *C. californica* и *P. membranifaciens* — только в линиях 2С и 4С. Эти результаты согласуются с нашими прежними выводами о том, что для линий мух, содержащихся на соленом субстрате, характерна повышенная численность и видовое разнообразие дрожжей (Dmitrieva et al., 2019).

Доминирующий у всех трех исследованных линий вид дрожжей *Pichia occidentalis* характеризуется очень узким ассимиляционным спектром (в качестве единственного источника углерода ассимилирует только глюкозу, этанол, глицерин и молочную кислоту), способен расти на безвитаминных средах, является осмотолерантным видом (выдерживает до 10% NaCl или 5% глюкозы в среде), сбраживает глюкозу, способен к росту при 37°C. Такие физиологические особенности характерны для видов, обитающих в очень специфических локусах, в частности, данный вид, согласно литературным данным, встречается в высокосахаристых плодах и в продуктах их естественного сбраживания, например, винах (Kurtzman et al., 2011). По всей видимости, во все вышеперечисленные субстраты данный вид дрожжей привносится дрозофилами.

Известно, что диета сильно влияет на состав бактериальной составляющей микробиома дрозофил (Broderick, Lemaitre, 2012). В частности, показано, что при переходе мух, содержавшихся на разных диетах, на один и тот же кормовой субстрат, их микробиом становился сходным, а при переносе изогенных популяций с идентичными микробиомами на разные кормовые субстраты состав доминирующих видов бактерий изменяется в зависимости от среды (Chandler et al., 2011). В природных популяциях различных видов дрозофил диета, по-видимому, даже сильнее влияет на состав кишечных бактерий, чем видовая принадлежность мух (Staubach et al., 2013).

О том, как влияет диета на дрожжевую часть микробиома дрозофил, известно немного. По-видимому, как и в случае с бактериями, диета сильнее влияет на состав дрожжей, ассоциированных с дрозофилами, чем видовая принадлежность мух (Chandler et al., 2012). Наши результаты дополняют эти данные, показывая, что повышенное содержание соли в кормовом субстрате, по-видимому, может способствовать росту численности и разнообразия дрожжевого микробиома дрозофил. Возможные причины этого эффекта нуждаются в дополнительных исследованиях.

Дрожжевая составляющая микробиома *D. melanogaster* закономерно меняется в течение жизни насекомого. Во всех трех рассмотренных линиях (Н, 2С, 4С) выявлены сходные тенденции изменения численности дрожжей в зависимости от возрастной стадии. А именно, во всех трех случаях у имаго в возрасте 1 сут наблюдается минимальная численность дрожжей, а у имаго в возрасте 7 сут — максимальная.

Выявленные изменения дрожжевой составляющей микробиома могут быть связаны с двумя факторами. Первый из них — возрастные изменения и смена стадий жизненного цикла самого насекомого. Пищеварительный тракт и поверхность тела личинок и имаго разного возраста могут предоставлять разные условия для выживания и размножения разных видов дрожжей. Поведение мух (в том числе пищевое) тоже может меняться с возрастом, влияя на интенсивность обмена дрожжевыми клетками между субстратом и организмом насекомого. Кроме того, известно, что бактериальная составляющая микробиома дрозофил закономерно меняется с возрастом мухи, а между дрожжами и бактериями, обитающими в кишечнике, вероятно, существует сложная система экологических взаимодействий (Wong et al., 2011; Broderick, Lemaitre, 2012; Clark et al., 2015; Guilhot et al., 2020). Второй фактор — микробиологическая сукцессия на кормовом субстрате, связанная с постепенной утилизацией и переработкой корма личинками и имаго мух и микроорганизмами, с подсыханием корма, с динамикой популяций развивающихся в корме микробов и экологическими взаимодействиями между ними.

В нашем эксперименте кормовой субстрат “старел” вместе с живущими на нем мухами. По-видимому, такая ситуация вполне типична для дрозофил в природных условиях, поскольку дрозофилы, с одной стороны, используют эфемерные кормовые субстраты с быстро меняющимся микробным населением, с другой — склонны проводить большую часть жизни возле кормового субстрата, в котором развиваются их личинки (Broderick, Lemaitre, 2012). Используемый в данной работе подход, таким образом, имитирует реалистичный сценарий взаимодействия между

насекомым, его микробиомом и микробным населением кормового субстрата, но при этом затрудняет раздельный анализ влияния двух названных выше факторов. Для проведения такого анализа необходимы дополнительные исследования.

Тем не менее, полученные результаты позволяют утверждать, что, по крайней мере, одна из выявленных тенденций, а именно низкая численность дрожжевой составляющей микробиома у имаго в возрасте 1 сут, по сравнению с поздними личинками, связана именно с возрастной стадией насекомого, а не с сукцессией микроорганизмов в кормовом субстрате (поскольку личинки и одноклеточные имаго отбирались для анализа одновременно, через 12 сут после начала использования мухами кормового субстрата). Известно, что в процессе метаморфоза у дрозофил происходит резкое обеднение бактериального микробиома, что отчасти связано с усилением синтеза антимикробных пептидов на стадии ранней куколки (Tryselius et al., 1992; Broderick, Lemaitre, 2012; Erkosar et al., 2013). С другой стороны, бактерии все же могут передаваться от личинки к имаго, в частности, путем поедания молодыми мухами собственных фекалий (мекония), содержащих остатки личиночной средней кишки (Broderick, Lemaitre, 2012; Téfit et al., 2018; Guilhot et al., 2020). Дрожжевая составляющая микробиома, по-видимому, тоже может быть частично сохранена в процессе метаморфоза (Guilhot et al., 2020). Однако ее численность, судя по нашим данным, сильно сокращается. Об этом свидетельствует резкое (на 3–4 порядка) уменьшение числа дрожжевых клеток в гомогенатах молодых имаго по сравнению с поздними личинками в линиях 2С и 4С (в линии Н дрожжи не были обнаружены ни у молодых имаго, ни у личинок) (рис. 1).

Причины наблюдаемого во всех трех линиях снижения численности дрожжей у имаго в возрасте 14 сут (по сравнению с семидневными мухами) нуждаются в дополнительном изучении. Они могут быть связаны с возрастными изменениями мух, с динамикой бактериального населения их кишечника, а также со “старением” кормовой среды (подсыханием, истощением питательных веществ в поверхностном слое корма из-за деятельности личинок и микроорганизмов). Интересно, что наиболее выраженное снижение численности дрожжей у 14-дневных мух по сравнению 7-дневными наблюдается в линии Н (примерно на четыре порядка), тогда как в линиях 2С и 4С численность дрожжей у 14-дневных мух снижается лишь на 1–2 порядка (рис. 1). Возможно, это связано с тем, что соль замедляет “старение” кормовой среды, работая как консервант и препятствуя размножению бактерий в большей степени, чем дрожжей.

Особенностью линии Н является отсутствие дрожжей в посевах гомогенатов личинок и моло-

дых имаго (рис. 1а). При этом в обоих случаях в посевах обнаруживается много бактерий (очевидно, устойчивых к присутствующему в среде хлорамфениколу) и мицелиальных грибов, которые в остальных посевах не были зарегистрированы. Возможно, это указывает на конкурентные взаимоотношения между бактериями и мицелиальными грибами с одной стороны и дрожжами — с другой. В связи с этим интересно отметить, что в недавно опубликованной статье, посвященной антагонистической активности некоторых видов дрожжей по отношению к ряду фитопатогенных грибов, было показано, что изоляты дрожжей *P. occidentalis* (вида, доминирующего в изученных нами линиях дрозофил), способны полностью подавлять рост некоторых микромицетов (Choińska et al., 2020). Это позволяет предположить, что дрожжи *P. occidentalis* могут вносить вклад в обнаруженную ранее (Stamps et al., 2012) способность дрозофил контролировать рост мицелиальных грибов в своих питательных субстратах.

В целом результаты показывают, что состав и численность дрожжевой составляющей микробиома дрозофил зависят от кормового субстрата, от возраста мух и, возможно, от “возраста” субстрата. Это обстоятельство необходимо учитывать при изучении симбиотических взаимоотношений дрозофил и дрожжей.

Состав дрожжевой составляющей микробиома меняется со временем даже в одной и той же лабораторной линии. Известно, что состав бактериальной составляющей микробиома лабораторных линий *D. melanogaster* сильно варьирует в разных лабораториях (а иногда и у разных линий в одной и той же лаборатории) даже при использовании одинакового кормового субстрата (Chandler et al., 2011; Broderick, Lemaitre, 2012). По-видимому, это указывает на значительную роль фактора случайности в формировании микробного населения лабораторных линий дрозофил. Наши результаты показывают, что переменчивость свойственна и дрожжевой части микробиома.

Ранее (в ноябре–декабре 2017) мы теми же методами охарактеризовали состав дрожжевой составляющей микробиома у имаго в возрасте 0–5 сут из линий Н и 4С (Dmitrieva et al., 2019). В данной работе мы анализировали те же линии спустя 16–18 месяцев (март–май 2019). Были обнаружены следующие различия. В линии Н в 2017 г. доминировали виды *Z. bailii* и *P. occidentalis*, однако кроме них присутствовали также немногочисленные клетки *P. membranifaciens*. В 2019 г. в этой линии первые два вида по-прежнему присутствовали, однако третий вид не был обнаружен.

В линии 4С в 2017 году были зарегистрированы виды *P. occidentalis* и *C. californica* (присутствующие также и в 2019 году), однако доминирующим был вид *Starmerella bacillaris* (Kroemer, Krumbholz)

F.L. Duarte, A. Fonseca, 2012, который в посевах 2019 г. не был обнаружен. Факт необнаружения дрожжей *S. bacillaris* у мух из линии 4С примечателен, поскольку ранее нами было показано, что эти дрожжи вносят заметный вклад в адаптацию лабораторных линий *D. melanogaster* к соленому корму, повышая эффективность размножения мух на кормовом субстрате с высоким содержанием NaCl (Ивницкий и соавт., 2018; Dmitrieva et al., 2019). То, что этот важный для жизни на соленом корме вид дрожжей в ходе данного исследования обнаружен не был, говорит о том, насколько неустойчивыми и эфемерными могут быть адаптации, происходящие на уровне “холобионта” путем адаптивной модификации микробиома (Марков, Ивницкий, 2016).

Таким образом, исследование показало, что состав дрожжевой части микробиома лабораторных линий *D. melanogaster* пластичен и непостоянен. По-видимому, он зависит и от кормового субстрата, и от стадии жизненного цикла насекомого, и от других факторов, включая физические условия и экологические взаимодействия с другими компонентами микробиома (бактериями, грибами). Это непостоянство и зависимость от множества факторов необходимо учитывать при изучении симбиоза дрозофил и дрожжей и его возможной эволюционной роли.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 19-34-90141 и 18-04-00915).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глушакова А.М., Качалкин А.В. Эндофитные дрожжи в сочных плодах *Malus domestica* и *Pyrus communis* в условиях антропогенизации // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 114–122.
- Glushakova A.M., Kachalkin A.V. Endophytic yeasts in *Malus domestica* and *Pyrus communis* fruits under anthropogenic impact // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 128–135.
- Дмитриева А.С., Ивницкий С.Б., Марков А.В. Адаптация *Drosophila melanogaster* к неблагоприятному кормовому субстрату сопровождается расширением трофической ниши // Журн. общей биологии. 2016. Т. 77. С. 249–261.
- Dmitrieva A.S., Ivitsky S.B., Markov A.V. Adaptation of *Drosophila melanogaster* to unfavorable feed substrate is accompanied by expansion of trophic niche // Biology Bull. Rev. 2017. V. 7. P. 369–379.
- Ивницкий С.Б., Максимова И.А., Панченко П.Л., Дмитриева А.С., Качалкин А.В., Корнилова М.Б., Перфильева К.С., Марков А.В. Роль микробиома в адаптации *Drosophila melanogaster* к кормовому субстрату с повышенной концентрацией NaCl // Журн. общей биологии. 2018. Т. 79. С. 393–403.
- Ivitsky S.B., Maximova I.A., Panchenko P.L., Dmitrieva A.S., Kachalkin A.V., Kornilova M.B., Perfilieva K.S., Markov A.V. Microbiome affects the adaptation of *Drosophila melanogaster* to a high NaCl concentration // Biology Bull. Rev. 2019. V. 9. P. 465–474.
- Марков А.В., Ивницкий С.Б., Корнилова М.Б., Наймарк Е.Б., Широкова Н.Г., Перфильева К.С. Материнский эффект маскирует адаптацию к неблагоприятным условиям и затрудняет дивергенцию у *Drosophila melanogaster* // Журн. общ. биологии. 2015. Т. 76. С. 429–437.
- Markov A.V., Ivitsky S.B., Kornilova M.B., Naimark E.B., Shirokova N.G., Perfilieva K.S. Maternal effect obscures adaptation to adverse environments and hinders divergence in *Drosophila melanogaster* // Biology Bull. Rev. 2016. V. 6. P. 429–435.
- Марков А.В., Ивницкий С.Б. Эволюционная роль фенотипической пластичности // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2016. № 4. С. 3–11.
- Markov A.V., Ivitsky S.B. Evolutionary role of phenotypic plasticity // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2016. V. 71. № 4. P. 185–192.
- Панченко П.Л., Корнилова М.Б., Перфильева К.С., Марков А.В. Симбиотическая микробиота вносит вклад в адаптацию *Drosophila melanogaster* к неблагоприятной кормовой среде // Известия РАН. Сер. биол. 2017. Т. 44. С. 341–351.
- Panchenko P.L., Kornilova M.B., Perfilieva K.S., Markov A.V. Contribution of symbiotic microbiota to adaptation of *Drosophila melanogaster* to an unfavorable growth medium // Biology Bulletin. 2017. V. 44. P. 345–354. <https://doi.org/10.1134/s1062359017040100>
- Савинов А.Б. Аутоценоз и деоценоз как симбиотические системы и биологические категории // Журн. общей биологии. 2012. Т. 73. С. 284–301.
- Anagnostou C., Dorsch M., Rohlf M. Influence of dietary yeasts on *Drosophila melanogaster* life-history traits // Entomol. Exp. Appl. 2010. V. 136. P. 1–11.
- Becher P.G., Flick G., Rozpedowska E., Schmidt A., Hagman A., Lebreton S., Larsson M.C., Hansson B.S., Piškur J., Bengtsson M. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development // Functional Ecology. 2012. V. 26. P. 822–828.
- Belkina E.G., Naimark E.B., Gorshkova A.A., Markov A.V. Does adaptation to different diets result in assortative mating? Ambiguous results from experiments on *Drosophila* // J. Evolution Biol. 2018. V. 31. P. 1803–1814.
- Bordenstein S.R., Theis K.R. Host biology in light of the microbiota: ten principles of holobionts and hologenomes // PLoS Biol. 2015. V. 13. e1002226.
- Broderick N.A., Lemaitre B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster* // Gut Microbes. 2012. V. 3. P. 307–321.

- Brummel T., Ching A., Seroude L., Simon A.F., Benzer S. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 12974–12979.
- Chandler J.A., Eisen J.A., Kopp A. Yeast communities of diverse *Drosophila* species: comparison of two symbiont groups in the same hosts // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 7327–7336.
- Chandler J.A., Lang J.M., Bhatnagar S., Eisen J.A., Kopp A. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host–microbe model system // PLoS Genet. 2011. V. 7. P. e1002272.
- Choińska R., Piasecka-Jóźwiak K., Chabłowska B., Dumka J., Łukaszewicz A. Biocontrol ability and volatile organic compounds production as a putative mode of action of yeast strains isolated from organic grapes and rye grains // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 1135–1146.
- Clark R.I., Salazar A., Yamada R., Fitz-Gibbon S., Morselli M., Alcaraz J., Rana A., Rera M., Pellegrini M., Ja W.W., Walker D.W. Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality // Cell Reports. 2015. V. 12. P. 1656–1667.
- Coluccio A.E., Rodriguez R.K., Kernan M.J., Neiman A.M. The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila* // PLoS One. 2008. V. 3. e2873.
- Dmitrieva A.S., Ivitsky S.B., Maksimova I.A., Panchenko P.L., Kachalkin A.V., Markov A.V. Symbiotic yeasts affect adaptation of *Drosophila melanogaster* to food substrate with high NaCl concentration // PLoS One. 2019. V. 14. e0224811.
- Douglas A.E. The *Drosophila* model for microbiome research // Lab. Animal. 2018. V. 47. P. 157–164.
- Erkosar B., Leulier F. Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: novel insights from the *Drosophila* model // FEBS Lett. 2014. V. 588. P. 4250–4257.
- Erkosar B., Storelli G., Defaye A., Leulier F. Host-intestinal microbiota mutualism: “learning on the fly” // Cell Host Microbe. 2013. V. 13. P. 8–14.
- Guilhot R., Rombaut A., Xuéreb A., Howell K., Fellous S. Bacterial influence on the maintenance of symbiotic yeast through *Drosophila* metamorphosis // bioRxiv. Preprint posted June 01, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.31.126185>
- Günther C.S., Goddard M.R. Do yeasts and *Drosophila* interact just by chance? // Fungal Ecology. 2019. V. 38. P. 37–43.
- Hoang D., Kopp A., Chandler J.A. Interactions between *Drosophila* and its natural yeast symbionts – Is *Saccharomyces cerevisiae* a good model for studying the fly–yeast relationship? // Peer J. 2015. V. 3. e1116.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (eds.) The Yeasts, a Taxonomic Study. 5th edn. Elsevier, 2011. 2080 p.
- Margulis L., Fester R. Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis. Boston: MIT Press, 1991. 470 p.
- McFall-Ngai M.J. Unseen forces: the influence of bacteria on animal development // Dev. Biol. 2002. V. 242. P. 1–14.
- Moran N.A., Sloan D.B. The hologenome concept: helpful or hollow? // PLoS Biol. 2015. V. 13. e1002311.
- Newell P.D., Chaston J.M., Wang Y., Winans N.J., Sannino D.R., Wong A.C.-N., Dobson A.J., Kagle J., Douglas A.E. In vivo function and comparative genomic analyses of the *Drosophila* gut microbiota identify candidate symbiosis factors // Front. Microbiol. 2014. V. 4. P. 576.
- Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions // Science. 2012. V. 336. P. 1262–1267.
- Reuter M., Bell G., Greig D. Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector // Curr. Biol. 2007. V. 17. P. R81–R83.
- Rosenberg E., Koren O., Reshef L., Efrony R., Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. P. 355–362.
- Rosenberg E., Sharon G., Zilber-Rosenberg I. The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework // Environ. Microbiol. 2009. V. 11. P. 2959–2962.
- Shin S.C., Kim S.H., You H., Kim B., Kim A.C., Lee K.A., Yoon J.H., Ryu J.H., Lee W.J. *Drosophila* microbiota modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling // Science. 2011. V. 334. P. 670–674.
- Stamps J.A., Yang L.H., Morales V.M., Boundy-Mills K.L. *Drosophila* regulate yeast density and increase yeast community similarity in a natural substrate // PLoS One. 2012. V. 7. P. e42238.
- Starmer W.T. A comparison of *Drosophila* habitats according to the physiological attributes of the associated yeast communities // Evolution. 1981. V. 35. P. 38–52.
- Staubach F., Baines J.F., Künzel S., Bik E.M., Petrov D.A. Host species and environmental effects on bacterial communities associated with *Drosophila* in the laboratory and in the natural environment // PLoS One. 2013. V. 8. e70749.
- Téfit M.A., Gillet B., Joncour P., Hughes S., Leulier F. Stable association of a *Drosophila*-derived microbiota with its animal partner and the nutritional environment throughout a fly population’s life cycle // J. Insect Physiol. 2018. V. 106. P. 2–12.
- Trinder M., Daisley B.A., Dube J.S., Reid G. *Drosophila melanogaster* as a high-throughput model for host–microbiota interactions // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Article 751.
- Tryselius Y., Samakovlis C., Kimbrell D.A., Hultmark D. CecC, a cecropin gene expressed during metamorphosis in *Drosophila* pupae // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. P. 395–399.
- Wong C.N.A., Ng P., Douglas A.E. Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster* // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 1889–1900.
- Wong C.N.A., Vanhove A.S., Watnick P.I. The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: lessons from *Drosophila melanogaster* // Dis. Model. Mech. 2016. V. 9. P. 271–281.
- Yamada R., Deshpande S.A., Bruce K.D., Mak E.M., Ja W.W. Microbes promote amino acid harvest to rescue undernutrition in *Drosophila* // Cell Rep. 2015. V. 10. P. 865–872.
- Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32. P. 723–735.

Age-Related Changes in the Yeast Component of the *Drosophila melanogaster* Microbiome

A. S. Dmitrieva^{1,*}, I. A. Maksimova¹, A. V. Kachalkin^{1,2}, and A. V. Markov^{1,3}

¹Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

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

³Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: dmnastya89@mail.ru

Received September 9, 2020; revised October 3, 2020; accepted October 15, 2020

Abstract—*Drosophila melanogaster* fruit flies are an important model for studying the multifaceted interactions between a multicellular organism and its microbiome. The nature of these interactions is largely determined by the regular changes in abundance and composition of the microbiome that occur during the host's life. The currently available data on age- and life cycle stage-related changes in the *Drosophila* microbiome relate mainly to its bacterial component, while little is known about such changes in the equally important yeast component. The present work describes the quantitative and qualitative composition of the yeast component of the *D. melanogaster* microbiome in three laboratory lines, reared under different conditions, at four developmental stages: late larvae and adults aged 1, 7, and 14 days after eclosion. In all three lines, the total yeast abundance changed similarly with the age of insects, with the highest and lowest yeast counts in 7- and 1-day adults, respectively. In the fly lines reared on moderately unfavorable substrates supplemented with 2 and 4% NaCl, the abundance and species diversity of yeasts at all four developmental stages was higher than in the flies reared on a standard (favorable) food substrate. Our results indicate the inconstancy of the yeast component of the *D. melanogaster* microbiome and its regular changes with the insect's age, which must be taken into account when studying the relationships between symbiotic yeasts and their hosts.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, symbiotic yeast, microbiome, age-related changes

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ МЕТАНОГЕНЕЗА В ОСАДКАХ ТЕРМОКАРСТОВЫХ И ПОЛИГЕНЕТИЧЕСКИХ ЯМАЛЬСКИХ ОЗЕР

© 2021 г. А. Ю. Каллистова^а, *, В. В. Кадников^а, А. С. Саввичев^а, И. И. Русанов^а,
Ю. А. Дворников^б, М. О. Лейбман^с, А. В. Хомутов^с, Н. В. Равин^а, Н. В. Пименов^а

^аФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^бДепартамент ландшафтного проектирования и устойчивых экосистем, Аграрно-технологический институт,
РУДН, Москва, 117198 Россия

^сИнститут криосферы Земли, ФИЦ Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень, 625000 Россия

*e-mail: kallistoanna@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2020 г.

После доработки 24.11.2020 г.

Принята к публикации 25.11.2020 г.

Проведено сравнительное исследование разнообразия метаногенов и потенциальной активности различных путей метаногенеза в осадках молодых термокарстовых и зрелых полигенетических ямальских озер. Важную роль в образовании метана в термокарстовых озерах играл гидрогенотрофный метаногенез; также выявлены ацетокластический и метилотрофный пути метаногенеза. В полигенетическом озере с содержанием растворенного органического вещества, наиболее близком к термокарстовым озерам, метаногенез протекал более интенсивно, и относительная доля метаногенов, особенно ацетокластических, была выше, чем в термокарстовых озерах; предполагается активность метил-редуцирующих метаногенов. В осадках всех озер выявлены метаногены родов *Methanothrix*, *Methanoregula* и представители семейства *Methanomassiliicoccaceae*. Также детектированы метанооксиляющие бактерии (*Methylobacter*, “*Candidatus* Methyloimabilis”) и археи (“*Ca. Methanoperedens*”).

Ключевые слова: вечная мерзлота, термокарстовые озера, метан, метаногенез, метаноокисление

DOI: 10.31857/S0026365621020075

Вечная мерзлота является одним из крупнейших наземных пулов углерода (Ciais et al., 2013; Saunio et al., 2016; Oliva, Fritz, 2018). Важным следствием таяния вечной мерзлоты в условиях глобального потепления считается высвобождение захороненного в ней органического вещества и рост эмиссии парниковых газов из северных широт (Ciais et al., 2013). В результате вытаявания высокольдистых многолетнемерзлых пород происходит образование просадочных форм рельефа и формирование термокарстовых озер (Общее мерзлотоведение, 1978). Термокарстовые озера составляют значимую часть арктической пресноводной системы и обуславливают специфику тундровых и лесотундровых ландшафтов (Кравцова, 2009). Многие термокарстовые озера характеризуются высокими скоростями эмиссии метана, и в них предполагается дальнейшее увеличение интенсивности метаногенеза за счет современных микробных процессов разложения постепенно оттаивающего органического вещества вечной мерзлоты (Walter et al., 2007; Heslop et al., 2015; Martinez-Cruz et al., 2015; Vonk et al., 2015; Wik et al., 2016;

Townsend-Small et al., 2017; Serikova et al., 2019, Zabelina et al., 2020). В настоящее время ведутся интенсивные исследования цикла метана в термокарстовых озерах Аляски и Канады, где выявлены ацетокластический, гидрогенотрофный и метилотрофный пути метаногенеза, идентифицированы различные представители метаногенных архей (Negandhi et al., 2013; Vonk et al., 2015; Matheus Carnevali et al., 2015, 2018; Townsend-Small et al., 2017; de Jong et al., 2018; in’t Zandt et al., 2020). При этом процесс метаногенеза в молодых термокарстовых озерах редко рассматривают в сравнении с процессом метаногенеза в зрелых полигенетических озерах, расположенных в том же географическом регионе. Арктические полигенетические озера находятся под таким же влиянием современных климатических изменений, но в отличие от молодых термокарстовых озер, в них работает “зрелое” микробное сообщество, которое включает в себя все функциональные группы микроорганизмов, необходимые для минерализации органического вещества до непосредственных субстратов метаногенеза.

Таблица 1. Содержание органического вещества, концентрация метана и относительное обилие микроорганизмов цикла метана в осадках термокарстовых и полигенетических ямальских озер

Озера	Глубина, см	С-РОВ, мг/л	CH ₄ , мкмоль/дм ³	Метаногены	Метанотрофы
				% от общего числа последовательностей 16S рРНК	
Полигенетические					
LK-003	0–3	14	594	27.5	4.3
	3–7*	22	978	34.8	2.6
	7–12	28	986	31.8	3.0
LK-004	0–4	9	10.8	4.6	5.4
	4–9*	7	132	13.1	2.4
	9–15	6	407	8.4	0.9
Термокарстовые					
LK-002	0–4	38	93.7	2.7	4.3
	4–9*	30	235	16.1	1.7
	9–14	18	376	18.2	2.5
LK-010	0–3	32	32.8	2.1	5.4
	3–6*	26	291	5.9	4.6
	6–12	Н.д.	365	12.5	1.6

* Образцы осадков, использованные для инкубационных экспериментов с добавлением субстратов метаногенеза. Н.д. — нет данных.

Целью настоящей работы являлось сравнение осадков термокарстовых и полигенетических арктических озер по таксономическому составу и относительной доле метаногенов *in situ* и их потенциальной активности на субстратах, обеспечивающих ацетокластический, гидрогенотрофный, метилотрофный и метил-редуцирующий пути метаногенеза. Эта работа является первым сообщением о путях метаногенеза в осадках термокарстовых озер России.

Объектом исследования служили осадки 4-х озер, расположенных в зоне сплошного распространения вечной мерзлоты (Центральный Ямал). Два из них (LK-002 и LK-010) являлись типичными мелководными (1.2 и 2 м соответственно) термокарстовыми озерами, другие два (LK-003, LK-004) — глубоководными (10.6 и 11.5 м) “зрелыми” полигенетическими озерами. Водная толща всех озер была аэробной; осадки слабо-окисленными. Физико-химические характеристики водной толщи и осадков, а также данные по интенсивностям микробных процессов и составу сообществ, представлены в другой нашей публикации (Savvichev et al., в печати). Содержание углерода в растворенном органическом веществе (С-РОВ) иловой воды осадков определяли на анализаторе Shimadzu TOC-Vcph (Япония). Содержание метана определяли методом фазово-равновесной дегазации (McAuliffe, 1971). Состав микробных сообществ определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования переменных участков V3–V4 гена 16S рРНК. Использовали набор уни-

версальных праймеров 341F и 806R (Yu et al., 2005). Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование, анализ фрагментов гена 16S рРНК, кластеризацию последовательностей в оперативные таксономические единицы (ОТЕ), удаление химерных последовательностей и таксономическую идентификацию ОТЕ проводили по методикам, описанным в Savvichev et al. (в печати). Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами SRR11972844–SRP266728 и доступны через BioProject PRJNA636944. Образцы, отобранные со средней глубины слоя осадков (табл. 1) инкубировали с добавлением субстратов, обеспечивающих ацетокластический (ацетат), гидрогенотрофный (H₂/CO₂; формиат), метилотрофный (триметил-амин, ТМА; метанол, MeOH; диметилсульфоксид, ДМСО) и метил-редуцирующий (ТМА + H₂; MeOH + H₂; ДМСО + H₂) пути метаногенеза. Готовили суспензии придонной воды и осадков (1 : 1, по объему); придонную воду предварительно кипятили и остужали до комнатной температуры в токе аргона. Инкубацию проводили при 10°C; подробная методика инкубации описана в Kallistova et al. (2020). Количество образованного метана рассчитывали на 1 г сух. веса (СВ) суспензии (вода + осадок); СВ определяли высушиванием образца до постоянного веса при 105°C.

Содержание С-РОВ в осадках термокарстовых озер было выше, чем в осадках полигенетических озер (табл. 1). Вероятно, органическое вещество по-

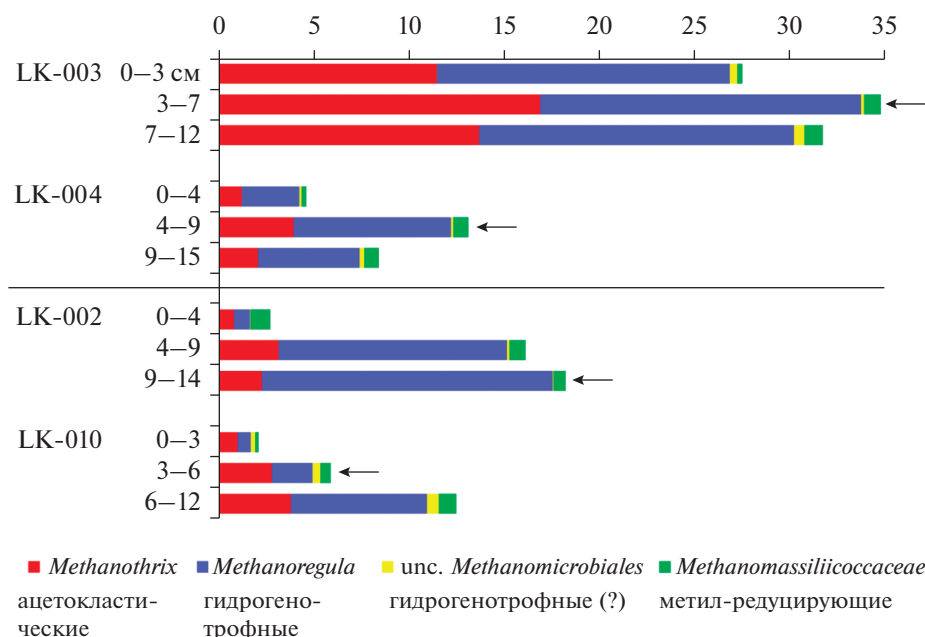


Рис. 1. Разнообразие и относительная доля метаногенов в осадках термокарстовых (LK-002, LK-010) и полигенетических (LK-003, LK-004) озер. Стрелками отмечен слой осадков, образцы из которого использовали для постановки инкубационных экспериментов с добавлением субстратов метаногенеза.

ступает в эти озера, в том числе и при оттаивании вечной мерзлоты. Однако часть этого органического вещества, очевидно, находится в недоступной для метаногенов форме, на что в совокупности указывают данные по концентрации метана (табл. 1), относительной доле и разнообразию метаногенов (табл. 1, рис. 1), эндогенной (контроль без добавления субстратов метаногенеза) и потенциальной метаногенной активности осадков озер на разных субстратах метаногенеза (рис. 2). Сравнение результатов анализа полигенетического оз. LK-003, в котором содержание С-РОВ было наиболее близко по значениям к термокарстовым озерам LK-002 и LK-010, показывает, что в оз. LK-003 образуется больше метана, относительная доля метаногенов выше и метаногенез протекает более интенсивно (табл. 1, рис. 2). Полигенетическое оз. LK-003 отличается от термокарстовых озер в первую очередь более высоким относительным обилием ацетокластических метаногенов рода *Methanotherix* (рис. 1), что указывает на присутствие в составе органического вещества осадков свободного ацетата. Вероятно в “зрелом” полигенетическом озере уже сформировалось сбалансированное микробное сообщество, обеспечивающее метаногенов основными субстратами роста. Об избытке в осадках этого озера эндогенных субстратов метаногенеза также свидетельствует интенсивное образование метана в контроле (рис. 2). На фоне высокого эндогенного метаногенеза невозможно четко выделить влияние внесения субстратов гидрогено-трофного, ацетокластического и метилотрофного

метаногенеза. При этом наиболее потенциально активным в этом озере оказался метил-редуцирующий метаногенез (рис. 2). Напротив, в полигенетическом оз. LK-004 с минимальным содержанием РОВ (в среднем в ~4 раза ниже, чем в термокарстовых озерах) эндогенный метаногенез минимален, а относительное обилие метаногенов разных групп близко к таковому в термокарстовых озерах (рис. 1, 2).

В молодых термокарстовых озерах при избытке органического вещества, наблюдается недостаток непосредственных субстратов метаногенеза. Возможно, растворенный углерод находится в трудноусвояемой форме в виде сложных соединений растительного происхождения (Покровский и соавт., 2012), а в микробном сообществе термокарстовых озер отсутствуют или находятся в низкой численности микроорганизмы, его разлагающие. Это, однако, не исключает того, что со временем микробное сообщество термокарстовых озер обогатится требуемыми организмами из окружающих почв, и тогда скорость образования и количество метана значительно увеличатся. В целом, для обоих термокарстовых озер был характерен более интенсивный гидрогенотрофный метаногенез (на H_2/CO_2 и формиате) в первые 2 нед. с начала инкубации. Начиная с 3 нед. инкубации, происходила активация ацетокластического и метилотрофного путей метаногенеза. Вероятно, в силу доступности субстрата именно гидрогенотрофные метаногены были активны в осадках *in situ*, поэтому в инкубационных экспериментах они начинали

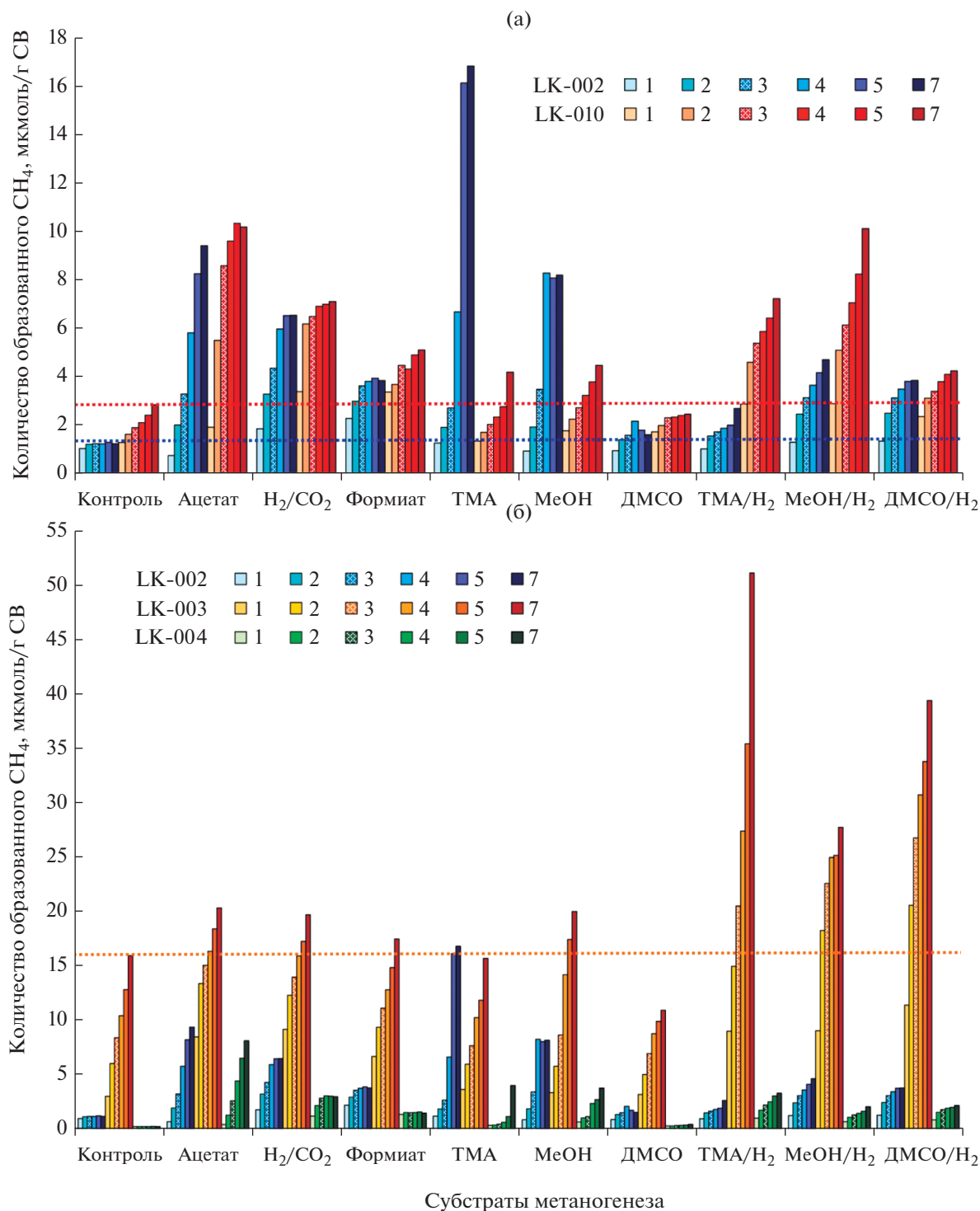


Рис. 2. Образование метана при инкубации осадков с различными субстратами метаногенеза: сравнительная динамика образования метана в термокарстовых озерах LK-002 и LK-010 (а), сравнительная динамика образования метана в термокарстовых (LK-002) и полигенетических (LK-003 и LK-004) озерах (б). Цифры в легенде обозначают продолжительность инкубации (нед.); горизонтальными пунктирными линиями обозначены максимальные количества образованного метана в эндогенных контролях (без добавления субстрата) в соответствующих озерах.

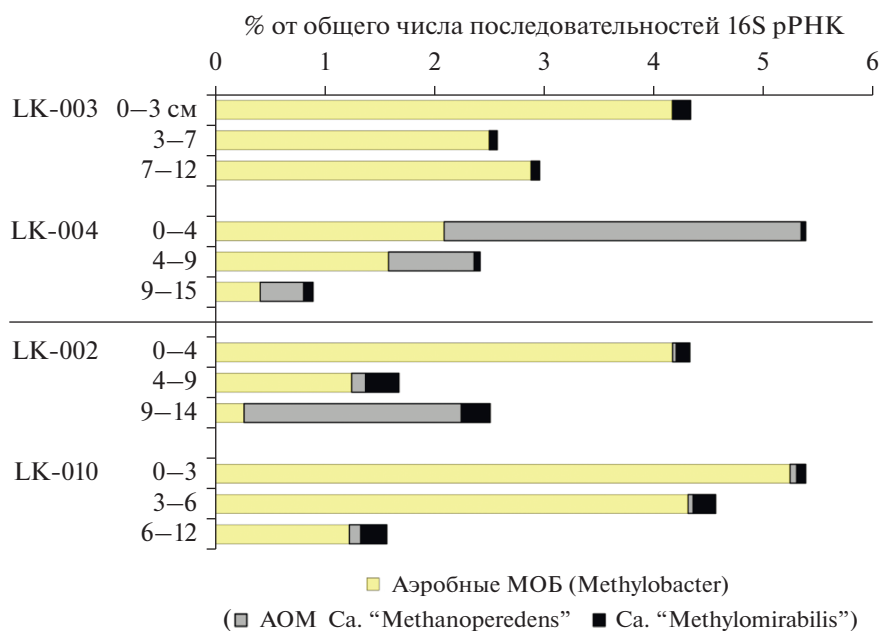


Рис. 3. Разнообразие и относительная доля метанотрофов в осадках термокарстовых (LK-002, LK-010) и полигенетических (LK-003, LK-004) озер. МОБ — аэробные метанооксиляющие бактерии, АОМ — анаэробные метанооксиляющие микроорганизмы.

работать первыми, без существенной лаг-фазы. Для остальных метаногенов при добавлении субстрата требовалось время для накопления и достижения ими максимальной активности (рис. 2).

Метаногенные популяции осадков термокарстовых и полигенетических озер были близки по таксономическому составу; различалось только относительное обилие различных таксонов. Во всех озерах детектированы представители, осуществляющие гидрогенотрофный (*Methanoregula*) и ацетокластический (*Methanothrix*) метаногенез (рис. 1). Секвенирование фрагментов гена 16S рРНК не выявило в осадках озер представителей метилотрофных метаногенов. Однако результаты инкубационного эксперимента с добавлением ТМА и MeOH (рис. 2) указывают на наличие метилотрофного пути метаногенеза в термокарстовом озере LK-002. Следует отметить, что во всех озерах детектированы некультивируемые представители класса *Thermoplasmata* (до 32% от общего количества последовательностей 16S рРНК). Часть из этих последовательностей (около 1%) может быть отнесена к представителям семейства *Methanomassiliicoccaceae*, среди которых выявлены метил-редуцирующие метаногены (Dridi et al., 2012). Также обнаружены единичные последовательности (макс. 0.03%) метил-редуцирующих представителей порядка *Methanofastidiosales* (на рис. 1 не показаны). Метил-редуцирующий метаногенез может быть предположен на основании результатов инкубационного эксперимента в полигенетическом оз. LK-003 (рис. 2).

Важно отметить, что количество метана в осадках может быть тем ниже, чем сильнее метаноокисление. Осадки озер, однако, были близки между собой в отношении суммарного обилия метанотрофов (табл. 1). Верхний слой осадков всех озер был слабо окисленным, и, одновременно с метаногенезом, в нем происходило метаноокисление, причем как аэробное, так и анаэробное. В осадках термокарстовых и полигенетических озер обнаружены аэробные метанотрофы рода *Methylobacter*, традиционно детектируемые в пресных бореальных озерах (He et al., 2012; Crevecoeur et al., 2017; Martinez-Cruz et al., 2017; Rissanen et al., 2018 и др.). Также выявлены анаэробные метанотрофы: нитрит-зависимые бактерии "*Ca. Methylobacter*" (NC10) и нитрат-зависимые археи "*Ca. Methanoperedens*" (ANME-2d) (рис. 3). Подробное описание метаноокисления в озерах приведено в другой публикации (Savvichev et al., в печати).

Таким образом, в молодых термокарстовых озерах содержание РОВ выше, чем в полигенетических; часть РОВ при этом, вероятно, находится в недоступной для метаногенов форме. Важную роль в образовании метана играет гидрогенотрофный путь метаногенеза. В полигенетических озерах метаногенез тем интенсивнее, чем выше содержание РОВ. В озере с минимальным содержанием РОВ (в среднем в 4 раза ниже, чем в термокарстовых озерах) эндогенный метаногенез минимален, а относительное обилие метаногенов разных групп близко к таковому в термокарсто-

вых озерах. Напротив, в полигенетическом озере с более высоким содержанием РОВ (в среднем в 1.3 раза ниже, чем в термокарстовых озерах) эндогенный метаногенез и относительная доля метаногенов, особенно ацетокластических, выше, чем в термокарстовых озерах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-10201), работа И.И. Русанова финансировалась Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание ФИЦ Биотехнологии РАН). Экспедиция на Центральный Ямал организована при поддержке Российского центра освоения Арктики.

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

- Кравцова В.И. Распространение термокарстовых озер в России // Вестн. Моск. ун-та. Сер. география. 2009. № 3. С. 33–42.
- Общее мерзлотоведение / Под ред. Кудрявцева В.А. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1978. 463 с.
- Покровский О.С., Широкова Л.С., Кирпотин С.Н. Микробиологические факторы, контролирующие цикл углерода в термокарстовых водных объектах Западной Сибири // Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. 2012. № 3(19). С. 199–217.
- Ciais P., Sabine C., Bala G., Bopp L., Brovkin V., Canadell J., Chhabra A., DeFries R., Galloway J., Heimann M., Jones C., Le Quéré C., Myneni R.B., Piao S., Thornton P. Carbon and other biogeochemical cycles // Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change / Eds. Stocker T.F., Qin D., Plattner G.-K., Tignor M., Allen S.K., Boschung J., Nauels A., Xia Y., Bex V., Midgley P.M. Cambridge: Cambridge University Press, UK, 2013. P. 465–570.
- Crevecoeur S., Vincent W.F., Comte J., Matveev A., Lovejoy C. Diversity and potential activity of methanotrophs in high methane-emitting permafrost thaw ponds // PLoS One. 2017. V. 12. e0188223.
- de Jong A.E.E., in't Zandt M.H., Meisel O.H., Jetten M.S.M., Dean J.F., Rasigraf O., Welte C.U. Increases in temperature and nutrient availability positively affect methane-cycling microorganisms in Arctic thermokarst lake sediments // Environ. Microbiol. 2018. V. 20. P. 4314–4327.
- Dridi B., Fardeau M.-L., Ollivier B., Raoult D., Drancourt M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1902–1907.
- He R., Wooller M.J., Pohlman J.W., Quensen J., Tiedje J.M., Leigh M.B. Shifts in identity and activity of methanotrophs in arctic lake sediments in response to temperature changes // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 4715–4723.
- Heslop J.K., Walter Anthony K.M., Sepulveda-Jauregui A., Martinez-Cruz K., Bondurant A., Grosse G., Jones M.C. Thermokarst lake methanogenesis along a complete talik profile // Biogeosci. 2015. V. 12. P. 4317–4331.
- in't Zandt M.H., Frank J., Yilmaz P., Cremers G., Jetten M.S.M., Welte C.U. Long-term enriched methanogenic communities from thermokarst lake sediments show species-specific responses to warming // FEMS Microbes. 2020. xtaa008. <https://doi.org/10.1093/femsme/xtaa008>
- Kallistova A., Merkel A., Kanapatskiy T., Boltanskaya Yu., Tarnovetskii I., Perevalova A., Kevbrin V., Samylin O., Pimenov N. Methanogenesis in the Lake Elton saline aquatic system // Extremophiles. 2020. V. 24. P. 657–672.
- Martinez-Cruz K., Sepulveda-Jauregui A., Anthony K.W., Thalasso F. Geographic and seasonal variation of dissolved methane and aerobic methane oxidation in Alaskan lakes // Biogeosci. 2015. V. 12. P. 4595–4606.
- Martinez-Cruz K., Leewis M.C., Herriott I.C., Sepulveda-Jauregui A., Anthony K.W., Thalasso F., Leigh M.B. Anaerobic oxidation of methane by aerobic methanotrophs in sub-Arctic lake sediments // Sci. Total Environ. 2017. V. 607–608. P. 23–31.
- Matheus Carnevali P.B., Rohrsen M., Williams M.R., Michaud A.B., Adams H., Berisford D., Love G.D., Priscu J.C., Rassuchine O., Hand K.P., Murray A.E. Methane sources in arctic thermokarst lake sediments on the North Slope of Alaska // Geobiology. 2015. V. 13. P. 181–197.
- Matheus Carnevali P.B., Herbold C.W., Hand K.P., Priscu J.C., Murray A.E. Distinct microbial assemblage structure and archaeal diversity in sediments of Arctic thermokarst lakes differing in methane sources // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1192. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01192>
- McAuliffe C.C. GC determination of solutes by multiple phase equilibration // Chem. Technol. 1971. V. 1. P. 46–51.
- Negandhi K., Laurion I., Lovejoy C. Bacterial communities and greenhouse gas emissions of shallow ponds in the High Arctic // Polar Biol. 2014. V. 37. P. 1669–1683.
- Oliva M., Fritz M. Permafrost degradation on a warmer Earth: Challenges and perspectives // Curr. Opin. Environ. Sci. Health. 2018. V. 5. P. 14–18.
- Rissanen A.J., Saarenheimo J., Tirola M., Peura S., Aalto S.L., Karvinen A., Nykänen H. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate methanotrophy in aerobic and anaerobic layers of boreal lake waters // Aquat. Microb. Ecol. 2018. V. 81. P. 257–276.
- Savvichev A., Rusanov I., Dvornikov Y., Kadnikov V., Kallistova A., Veslopolova E., Chetverova A., Leibman M., Sigalevich P., Pimenov N., Ravin N., Khomutov A. The water column of the Yamal tundra lakes as a microbial filter preventing methane emission // Biogeosci. Discuss. 2020. В печати. <https://doi.org/10.5194/bg-2020-317>
- Saunois M., Bousquet P., Poulter B., Peregon A., Ciais P., Canadell J.G., Dlugokencky E.J., Etiope G., Bastviken D., Houweling S., Janssens-Maenhout G., Tubiello F.N., Castaldi S., Jackson R.B., Alexe M., Arora V.K., Beerling D.J., Berga-

- maschi P., Blake D.R., Brailsford G., Brovkin V., Bruhwiler L., Crevoisier C., Crill P., Covey K., Curry C., Frankenberg C., Gedney N., Höglund-Isaksson L., Ishizawa M., Ito A., Joos F., Kim H.-S., Kleinen T., Krummel P., Lamarque J.-F., Langenfelds R., Locatelli R., Machida T., Maksyutov S., McDonald K.C., Marshall J., Melton J.R., Morino I., Naik V., O'Doherty S., Parmentier F.-J.W., Patra P.K., Peng C., Peng S., Peters G.P., Pison I., Prigent C., Prinn R., Ramonet M., Riley W.J., Saito M., Santini M., Schroeder R., Simpson I.J., Spahni R., Steele P., Takizawa A., Thornton B.F., Tian H., Tohjima Y., Viovy N., Voulgarakis A., van Weele M., van der Werf G.R., Weiss R., Wiedinmyer C., Wilton D.J., Wiltshire A., Worthy D., Wunch D., Xu X., Yoshida Y., Zhang B., Zhang Z., Zhu Q. The global methane budget 2000–2012 // *Earth. Syst. Sci. Data*. 2016. V. 8. P. 697–751.
- Serikova S., Pokrovsky O.S., Laudon H., Krickov I.V., Lim A.G., Manasyrov R.M., Karlsson J. High carbon emissions from thermokarst lakes of Western Siberia // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. 1552.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09592-1>
- Townsend-Small A., Åkerström F., Arp C.D., Hinkel K.M. Spatial and temporal variation in methane concentrations, fluxes, and sources in lakes in Arctic Alaska // *J. Geophys. Res: Biogeosci.* 2017. V. 122. P. 2966–2981.
- Vonk J.E., Tank S.E., Bowden W.B., Laurion I., Vincent W.F., Alekseychik P., Amyot M., Billet M.F., Canário J., Cory R.M., Deshpande B.N., Helbig M., Jammet M., Karlsson J., Larouche J., MacMillan G., Rautio M., Walter Anthony K.M., Wickland K.P. Reviews and syntheses: Effects of permafrost thaw on Arctic aquatic ecosystems // *Biogeosci.* 2015. V. 12. P. 7129–7167.
- Walter K.M., Smith L.C., Chapin F.S. Methane bubbling from northern lakes: present and future contributions to the global methane budget // *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2007. V. 365. P. 1657–1676.
- Wik M., Varner R.K., Anthony K.W., MacIntyre S., Bastviken D. Climate-sensitive northern lakes and ponds are critical components of methane release // *Nat. Geosci.* 2016. V. 9. P. 99–105.
- Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 89. P. 670–679.
- Zabelina S.A., Shirokova L.S., Klimov S.I., Chupakov A.V., Lim A.G., Polishchuk Y.M., Polishchuk V.Y., Bogdanov A.N., Muratov I.N., Guerin F., Karlsson J., Pokrovsky O.S. Carbon emission from thermokarst lakes in NE European tundra // *Limnol. Oceanogr.* 2020.
<https://doi.org/10.1002/lno.11560>

Comparative Study of Methanogenic Pathways in the Sediments of Thermokarst and Polygenetic Yamal Lakes

A. Yu. Kallistova^{1,*}, V. V. Kadnikov¹, A. S. Savichev¹, I. I. Rusanov¹, Yu. A. Dvornikov²,
M. O. Leibman³, A. V. Khomutov³, N. V. Ravin¹, and N. V. Pimenov¹

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

²Department of Landscape Design and Sustainable Ecosystems, Agrarian-Technological Institute, RUDN University, Moscow, 117198 Russia

³Earth Cryosphere Institute, Tyumen Scientific Centre SB RAS, Tyumen, 625000 Russia

*e-mail: kallistoanna@mail.ru

Received November 11, 2020; revised November 24, 2020; accepted November 25, 2020

Abstract—Comparative study of methanogen diversity and potential activity of different methanogenic pathways in the sediments of young thermokarst and mature polygenetic Yamal lakes was carried out. The hydrogenotrophic pathway of methanogenesis played an important role in methane formation in thermokarst lakes. The acetoclastic and methylotrophic pathways were also revealed there. In a polygenetic lake with a dissolved organic matter content closest to that of the thermokarst lakes, methanogenesis proceeded more intensively, and the relative abundance of methanogens, especially acetoclastic ones, was higher than in thermokarst lakes. The activity of methyl-reducing methanogens was also assumed there. Methanogens of the genera *Methanotrix* and *Methanoregula*, as well as representatives of the family *Methanomassiliicoccaceae* were identified in the sediments of all lakes. Methane-oxidizing bacteria (*Methylobacter*, *Candidatus* “Methylomirabilis”) and archaea (*Ca.* “Methanoperedens”) were also detected.

Keywords: permafrost, thermokarst lakes, methane, methanogenesis, methane oxidation

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

DESULFOVIBRIO ИЗ МИКРОБИОТЫ ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВОМ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА СВЯЗЫВАЮТ ЖЕЛЕЗО В МАЛОРАСТВОРИМЫЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ СУЛЬФИДЫ

© 2021 г. О. П. Иккерт^а, М. В. Иванов^а, А. Ухова^а, В. С. Зюсман^а,
Л. Б. Глухова^а, М. Р. Авакян^а, О. В. Карначук^{а, *}

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

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

Поступила в редакцию 16.11.2020 г.

После доработки 21.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Одной из групп бактерий, присутствующих в кишечнике детей с расстройством аутистического спектра (РАС) в повышенном количестве, являются сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) рода *Desulfovibrio*. До настоящего времени, высокая концентрация *Desulfovibrio* у индивидуумов с РАС была показана только молекулярными методами. Культивируемые формы, выделенные из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) аутистов, до сих пор отсутствовали. Возможным механизмом влияния СРБ является переведение железа в бионедоступные формы сульфидов, вызывая его дефицит в организме. В этом исследовании мы выделили две чистые культуры *Desulfovibrio* из фекалий детей с диагностированным РАС. В экспериментах *Desulfovibrio desulfuricans* AY5 образовывал кристаллические сульфиды железа — грейгит и пирит, содержащие железо в бионедоступной форме.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии, расстройства аутистического спектра, *Desulfovibrio*, биоминерализация железа, грейгит, пирит

DOI: 10.31857/S0026365621020051

Исследования последних лет свидетельствуют о существовании оси кишечник—мозг и вовлеченности микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в этиологию расстройств аутистического спектра (РАС) у детей (обзор см. Bezawada et al., 2020). Последние исследования показали эффективность трансплантации фекальной микробиоты в терапии РАС (Kang et al., 2020). Одной из групп бактерий, повышенную численность которых обнаруживают у детей с РАС, являются сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) рода *Desulfovibrio* (Finegold, 2011; Finegold et al., 2012; De Angelis et al., 2013; Weston et al., 2015; Liu et al., 2019). Более того, была отмечена корреляция между численностью *Desulfovibrio* и интенсивностью проявлений РАС (Tomova et al., 2015). Современные биоинформатические исследования показали связь численности *Desulfovibrio* в кишечнике с биополярными нарушениями у детей (Cheng et al., 2020). Однако возможные механизмы, связывающие численность этой группы с патофизиологией, остаются неясными. В качестве гипотез рассматривают токсичное действие образуемого бактериями сероводорода, образование липополисахаридов и возможное участие в вос-

палительных процессах (Weston et al., 2015). Мы предполагаем, что одним из возможных механизмов влияния СРБ может быть иммобилизация железа в бионедоступные формы. Недостаток железа является одной из известных характеристик пациентов с РАС. Повышенное содержание СРБ, включая *Desulfovibrio*, может приводить к биоминерализации железа в форме сульфидов в ЖКТ.

Эксперименты, направленные на прояснение возможной связи СРБ с патофизиологией РАС, затруднены отсутствием чистых культур. Нам не известны сообщения о культивируемых формах СРБ, выделенных из фекалий пациентов с РАС. В этом исследовании мы впервые выделили чистые культуры *Desulfovibrio* из микробиоты кишечника детей с РАС и оценили их способность выводить железо из раствора путем осаждения в малорастворимые сульфиды.

Для получения накопительных культур сульфидогенов были использованы фекалии детей возрастной группы от 7 до 13 лет с диагностированным РАС. При получении накопительных культур сульфидогенов использовали среду Видделя—Бака (WB) с лактатом в качестве донора электронов и добавлением растворов микроэле-

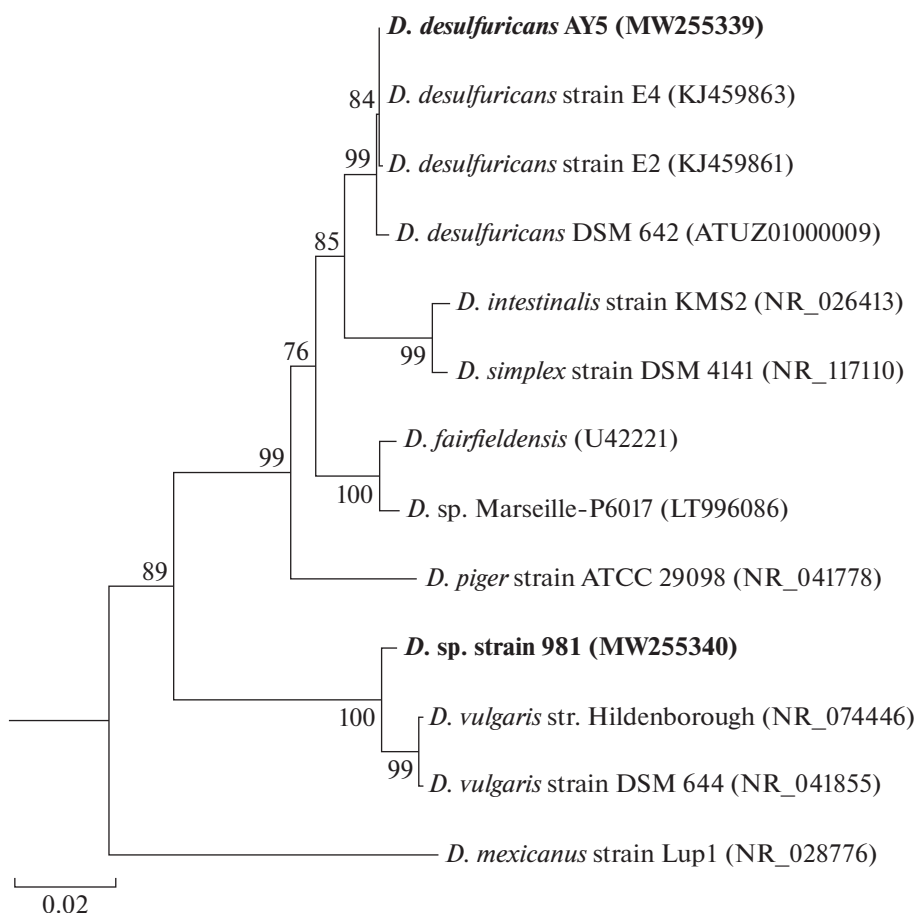


Рис. 1. Дерево, показывающее филогенетическое положение штаммов AY5 и 981 на основе анализа последовательностей гена 16S рНК, определенное методом Neighbor-Joining. Бутстреппы рассчитаны из 1000 итераций. Дерево построено с использованием MEGA X.

ментов, витаминов, селената-вольфрамата, сульфида натрия в качестве восстановителя (Widdel, Bak, 1992) и модифицированную добавление элементного железа (Карначук и соавт., 2006; Karnachuk et al., 2019). Инкубацию проводили в анаэробных условиях при температуре 37°C. Накопительные культуры, активно восстанавливающие сульфат, отбирали для получения колоний на агаризованной (1.5%) среде. После выделения колоний окончательную очистку культур проводили методом десятикратных разведений. В результате были выделены два морфологически однородных изолята, обозначенные штамм AY5 и штамм 981. Для определения филогенетического положения изолятов амплифицировали ген 16S рНК с праймерами 27F-1492R. Выделение ДНК и условия амплификации аналогичны описанным ранее (Frank et al., 2016). Филогенетический анализ последовательности гена 16S рНК показал, что оба штамма относятся к роду *Desulfovibrio* (рис. 1). Ближайшим валидно описанным родственником штамма AY5 является типовой штамм *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 642, сход-

ство последовательностей гена 16S рНК с которым составляло 99.72%. Штамм 981 был близок к другому модельному сульфатредуктору, *Desulfovibrio vulgaris*, со сходством последовательностей 99.02%.

Эксперименты по изучению иммобилизации железа *D. desulfuricans* AY5 были проведены в периодической культуре в сыровоточных бутылках объемом 250 мл с использованием той же среды, что и для выделения чистых культур, и дополнительным внесением двухвалентного железа в концентрации 100 мг/л. Инкубировали пробы в течение 8, 24 и 32 сут при оптимальной температуре роста 37°C, после чего образованный осадок осаждали центрифугированием и проводили дифракционный анализ как описано ранее (Ikkert et al., 2103). В осадке, образованном штаммом AY5, обнаружили кристаллические сульфиды железа, грейгит (Fe_3S_4) и пирит (FeS_2) (рис. 2). Грейгит образовывался уже на 8-е сут, в то время как пирит обнаруживали только после 32 сут культивирования. Обе кристаллические фазы иммобилизуют желе-

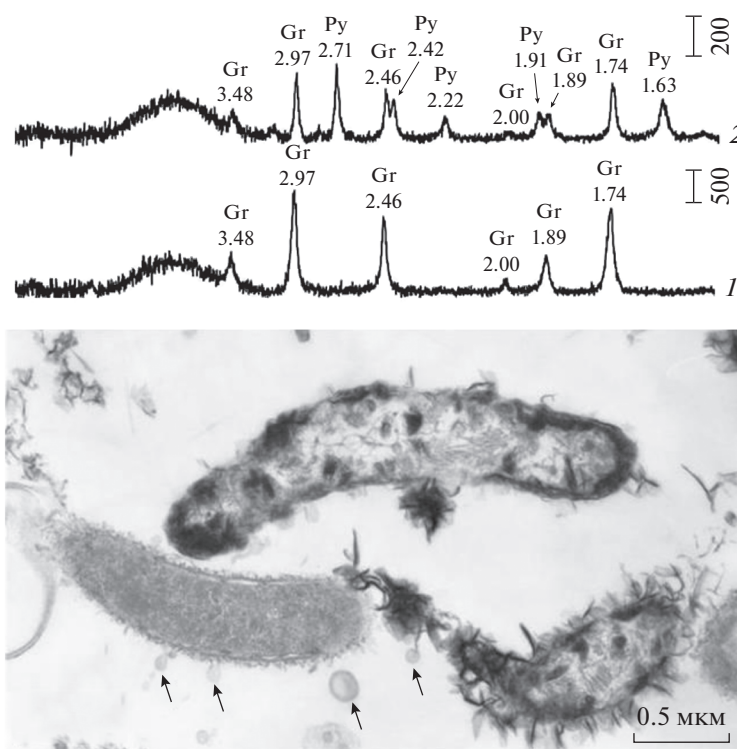


Рис. 2. Вверху: дифрактограммы осадка из эксперимента по биоминерализации железа штаммом *D. desulfuricans* AY5. Обозначения: 1 – инкубация в течение 24 сут; 2 – инкубация в течение 32 сут; Gr – грейгит, Fe_3S_4 ; Py – пирит, FeS_2 . Внизу: трансмиссионная электронная микрофотография ультратонких срезов клеток штамма AY5 с электронно-плотными кристаллами (предположительно, сульфида железа) на клеточной стенке и везикулах (показаны стрелками).

зо из раствора и с трудом подвержены ре-окислению. Исследование штамма AY5 показало присутствие микровезикул на клеточной стенке, которые могут выполнять роль дополнительных сайтов нуклеации микрокристаллов сульфидов (рис. 2). Дефицит железа является известной характеристикой аутистов (Yanagimoto et al., 2020). Выведение железа из раствора за счет связывания в трудно окисляемые кристаллические формы, хорошо известно для природных экосистем, например, осадков морей. Реакции образования кристаллических сульфидов железа могут происходить и в ЖКТ индивидуумов с РАС, аналогично тому, как это происходит в природе. Кроме того, микрокристаллы грейгита обладают магнитными свойствами и могут влиять на биологические структуры через образование магнитных полей. По последним данным магнитные поля ферромагнитных минералов оказывают влияние на ионные каналы в мембране и вызывают изменение структуры, функций и морфологии клеток (обзор см. Svobodova et al., 2019).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-34-70051.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Родители детей, чьи фекалии были использованы для выделения СРБ, осведомлены о цели экспериментов и не возражают против проведения исследований, о чем имеется письменное согласие. Комитет по этике Томского государственного университета рассмотрел и утвердил проведение исследования (протокол № 38).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: О.П. Иккерт – эксперименты по биоминерализации, дифракционный анализ; М.В. Иванов – эксперименты по биоминерализации; А. Ухова – выделение и изучение чистой культуры; В.С. Зюсман – изучение чистой культуры; Л.Б. Глухова – выделение и амплификация ДНК; М.Р. Авакян – филогенетический анализ; О.В. Карначук – планирование экспериментов, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Карначук О.В., Пименов Н.В., Юсупов С.К., Франк Ю.А., Пухакка Я.А., Иванов М.В. Распределение, разнообразие и активность сульфатредуцирующих бактерий в водной толще озера Гёк-гёль, Азербайджан // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 101–109.

- Karnachuk O.V., Pimenov N.V., Yusupov S.K., Frank Y.A., Puhakka J.A., Ivanov M.V. Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan // *Microbiology (Moscow)*. 2006. V. 75. P. 82–89.
- Bezawada N., Phang T.H., Hold G.L., Hansen R. Autism spectrum disorder and the gut microbiota in children: a systematic review // *Ann. Nutr. Metab.* 2020. V. 76. P. 16–29.
- Cheng S., Han B., Ding M., Wen Y., Ma M., Zhang L., Qi X., Cheng B., Li P., Kafle O.P., Liang X., Liu L., Du Y., Zhao Y., Zhang F. Identifying psychiatric disorder-associated gut microbiota using microbiota-related gene set enrichment analysis // *Brief. Bioinform.* 2020. V. 21. P. 1016–1022.
- De Angelis M., Piccolo M., Vannini L., Siragusa S., De Giacomo A., Serrazanetti D.I., Cristofori F., Guerzoni M.E., Gobbetti M., Francavilla R. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified // *PLoS One*. 2013. V. 8. e76993.
- Finegold S.M. *Desulfovibrio* species are potentially important in regressive autism // *Med. Hypotheses*. 2011. V. 77. P. 270–274.
- Finegold S.M., Downes J., Summanen P.H. Microbiology of regressive autism // *Anaerobe*. 2012. V. 18. P. 260–262.
- Frank Y., Banks D., Avakian M., Antsiferov D., Kadychagov P., Karnachuk O. *Firmicutes* is an important component of microbial communities in water-injected and pristine oil reservoirs, Western Siberia, Russia // *Geomicrobiol. J.* 2016. V. 33. P. 387–400.
- Ikkert O.P., Gerasimchuk A.L., Bukhtiyarova P.A., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V. Characterization of precipitates formed by H₂S-producing, Cu-resistant *Firmicutes* isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P. 1221–1234.
- Kang D.-W., Adams J.B., Vargason T., Santiago M., Hahn J., Krajmalnik-Brown R. Distinct fecal and plasma metabolites in children with autism spectrum disorders and their modulation after microbiota transfer therapy // *mSphere*. 2020. V. 5. e00314–20.
- Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 1947–1959.
- Liu F., Li J., Wu F., Zheng H., Peng Q., Zhou H. Altered composition and function of intestinal microbiota in autism spectrum disorders: a systematic review // *Transl. Psychiatry*. 2019. V. 9. P. 1–43.
- Svobodova H., Kosnáč D., Tanila H., Wagner A., Trnka M., Vitovič P., Hlinkova J., Vavrinsky E., Ehrlich H., Polák Š., Kopani M. Iron-oxide minerals in the human tissues // *Bio-metals*. 2020. V. 33. P. 1–13.
- Tomova A., Husarova V., Lakatosova S., Bakos J., Vlkova B., Babinska K., Ostatnikova D. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia // *Physiol. Behav.* 2015. V. 138. P. 179–187.
- Weston B., Fogal B., Cook D., Dhurjati P. An agent-based modeling framework for evaluating hypotheses on risks for developing autism: Effects of the gut microbial environment // *Med. Hypotheses*. 2015. V. 84. P. 395–401.
- Widdel F.F., Bak R. Gram negative mesophilic sulfate reducing bacteria // *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* / Eds. Balows A. et al. Berlin: Springer, 1992. P. 3352–3378.
- Yanagimoto Y., Ishizaki Y., Kaneko K. Iron deficiency anemia, stunted growth, and developmental delay due to avoidant/restrictive food intake disorder by restricted eating in autism spectrum disorder // *Biopsychosoc. Med.* 2020. V. 14. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s13030-020-00182-y>

A *Desulfovibrio* Isolate from the Microbiome of Children with Autistic Spectrum Disorders Immobilizes Iron in Poorly Soluble Crystalline Sulfides

O. P. Ikkert¹, M. V. Ivanov¹, A. Ukhova¹, V. S. Zuysman¹, L. B. Glukhova¹,
M. R. Avakyan¹, and O. V. Karnachuk^{1, *}

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

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

Received November 16, 2020; revised November 21, 2020; accepted November 30, 2020

Abstract—Sulfate-reducing bacteria (SRB) of the genus *Desulfovibrio* are one of the groups occurring in elevated numbers in the gut of children with autistic spectrum disorders (ASD). Until now, high abundance of *Desulfovibrio* in individuals with RAS has been shown only by molecular methods. No cultured forms have been isolated from the gastrointestinal tract of autists. A conceivable mechanisms of SRB effect is conversion of iron into biologically unavailable forms of sulfides, causing its deficiency in the organism. In this study we isolated two *Desulfovibrio* strains from feces of the children with diagnosed ASD. In experiments *Desulfovibrio desulfuricans* AY5 formed crystalline iron sulfides, greigite and pyrite, containing iron in a biologically unavailable form.

Keywords: sulfate-reducing bacteria, autistic spectrum disorders, *Desulfovibrio*, iron biomineralization, greigite, pyrite

**РЕЦЕНЗИЯ НА УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
“БИОРАЗНООБРАЗИЕ И СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ”,
авт. И.Б. ИВШИНА, А.В. КРИВОРУЧКО, М.С. КУЮКИНА**

© 2021 г. С. Ю. Щеголев*

*Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Чернышевского, Саратов, 410012 Россия*

**e-mail: redakciya@inmi.ru*

Поступила в редакцию 25.07.2020 г.

После доработки 27.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

DOI: 10.31857/S0026365621010079

Биоразнообразие микроорганизмов следует рассматривать в первую очередь как собрание их фенотипов в конгломератах, сосредоточенных в микробных сообществах (микробиомах), населяющих определенные экологические ниши, такие как почва, воздух, водная среда, организмы животных и т.п. Получаемые при этом сведения чрезвычайно важны для понимания эволюционных процессов и механизмов сложных взаимодействий с участием микроорганизмов, оптимального выбора объектов для их изучения и практического использования в интересах медицины, экологии, сельского хозяйства, энергетики, промышленности и др.

Большие надежды на усовершенствование подходов к филогенетическим исследованиям организмов (вообще) и прокариотов (в частности) привнесла геносистематика. С особенно впечатляющими успехами технологии 16S/18S рРНК в крупномасштабном режиме на уровне таксонов высокого порядка (от родов и выше), обеспечившей, в частности, разграничение представителей земной биоты на три домена жизни (бактерии, археи, эукариоты). Однако с развитием сравнительной вычислительной геномики и биоинформатики в этой отрасли знаний стал явственно ощущаться некий дискомфорт. Таковой обусловлен пониманием превалирующей роли горизонтального переноса генов (ГПГ) в приобретении прокариотами ряда фенотипических признаков, определяющих, в частности, их способность к адаптации и функционированию при существовании в разнообразных, часто меняющихся экологических нишах. На большом числе примеров становится все более очевидным разрыв между наиболее развитой на сегодняшний день систематикой прокариотов с использованием “генов домашнего хозяйства” (коровая часть пангенома) и той суммой наблю-

дений с фенотипическими признаками в рамках полифазного подхода, значительная часть которых определяется генами из подвижной (акцессорной) части пангенома. Одним из результатов оказались отраженные в литературе дискуссии с признанием все более ярко проявляющейся неоднозначности в определении и трактовке для прокариотов самого понятия вида. Отсюда следует очевидная условность оценок систематического положения изолятов и метагеномных объектов в рамках традиционной геносистематики с “вертикально” наследуемыми филогенетическими маркерами, далеко не всегда констатируемая в публикациях с результатами таксономических исследований прокариотов.

Перечисленными выше факторами, вероятно, объясняется необходимость переклассификации большого числа таксономических объектов (около 60% среди исследованных более ста тысяч) на традиционном древе жизни прокариотов, продемонстрированная в ряде недавних публикаций с результатами их фундаментальных филогенетических исследований. В данном контексте представляется перспективным развитие двухуровневой генетической системы оценки таксономического положения культивируемых штаммов и метагеномных объектов с учетом ГПГ. Однако достаточно “простого” (с точки зрения возможности его унификации) подхода к регистрации в таксономии прокариотов эффектов ГПГ, связанных с акцессорной составляющей пангенома, пока не прослеживается.

Таким образом, опубликование И.Б. Ившиной, А.В. Криворучко и М.С. Куюкиной учебного пособия “Биоразнообразие и систематика микроорганизмов” (Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2019. 304 с.: ил. ISBN 978-5-7944-3421-7) следует признать довольно смелым и ответственным

ным шагом, поставившим перед авторами задачу выбора оптимальных способов изложения материалов, не лишенных отмеченной выше противоречивости. С этой задачей, по мнению рецензента, авторы справились вполне успешно, не пытаясь игнорировать, либо сглаживать “острые углы”, обнаруживаемые в современной систематике прокариотов.

Книга напечатана на 304 страницах и снабжена 18 рисунками. В списке использованной литературы приведены ссылки на 167 источников, в дополнительном списке отражен ряд принципиальных современных публикаций в российских и мировых изданиях по рассматриваемым в пособии темам. Материал пособия распределен по 10 разделам (главам), именуемым авторами лекциями, составленными в соответствии с опытом их преподавательской работы на биологическом факультете Пермского государственного национального исследовательского университета.

В лекции 1 даются определения микробного разнообразия, основных его составляющих среди культивируемых и некультивируемых в лабораторных условиях объектов, обсуждаются методологические вопросы. Перечисляются международные проекты, направленные на исследования микроорганизмов, используемых в различных сферах человеческой деятельности, в том числе для решения задач биоремедиации экосистем, подвергнутых действию антропогенных факторов. Как одно из наиболее важных достижений современной систематики, обогащенной результатами молекулярно-генетических исследований, обсуждается введение в рассмотрение филогенетического древа жизни с выделением на нем архей в третий, самостоятельный домен в дополнение к бактериям и эукариотам.

Следующие две лекции посвящены терминологии — классификации прокариотов и их идентификации (лекция 2), и принципам формирования микробной номенклатуры (лекция 3) с отдельным описанием рангов таксонов в общей таксономической иерархии.

Лекция 4 предоставляет читателям хронологический очерк об основных исторических этапах становления систематики прокариотов — морфологического, физиологического (физиолого-биохимического) и нумерического (фенетического). В предваряющих его заметках авторы обращают внимание на объекты, относящиеся к области бактериальной и молекулярной палеонтологии, активно разрабатываемой, в частности, научными школами под руководством А.Ю. Розанова (Россия) и Р. Гувера (США). В работах этих школ обсуждаются результаты, относящиеся к проблеме происхождения земной жизни и возможности ее эволюции из простейших начальных форм,

привнесенных, вероятно, метеоритами на ранних этапах развития Земли (теория панспермии).

В лекции 5 дано описание филогенетической систематики, основанной на результатах генетических исследований, с указанием основных исторических вех при переходе от использования вторичных (РНК) и третичных (белковые последовательности) семантид к более надежным и информативным филогенетическим маркерам — последовательностям ДНК генов и рибосомной (16S/18S) РНК. Особое внимание уделено технологии 16S рРНК, как наиболее значимому инструменту в геносистематике в широком эволюционном таксономическом диапазоне прокариотов, но обнаружившему, вместе с тем, серьезные ограничения на уровне их видовой идентификации. В конце лекции отмечен ряд парадоксов филогенетической системы прокариотов, одним из которых является ситуация, когда глубина фенотипической дивергенции не соответствует глубине дивергенции генной (см. выше вводную часть рецензии).

Лекция 6 посвящена изложению современных представлений о ГПГ, его значении для понимания эволюционных процессов у прокариотов с демонстрацией влияния ГПГ на филогенетические конструкции в виде суперпозиции древоподобной (наследуемые признаки) и сетевой (ГПГ) составляющих. Довольно развернутое повествование приходится на обсуждение проблем определения и интерпретации понятия вида для прокариотов. В нем констатируется их зависимость от набора используемых филогенетических инструментов и внешних условий, в которых находятся рассматриваемые прокариотные сообщества. Отсюда следует очевидная размытость границ предполагаемых видов — “дискретных центров в едином континууме генов, напоминающем бугорчатое поле” (приведенная в пособии цитата из Э. Штакебрандта), каким автору этой цитаты представляется генетическое разнообразие организмов прокариотов. Учитывая большую роль случайностей в ходе генетических процессов, следуя результатам и идеям, представленным в трудах Е.В. Кунина и его школы (ссылки на которые имеются в рецензируемой книге), можно предположить, что для более четкого и непротиворечивого определения отмеченных выше границ понадобится, вероятно, развитие подходов на основе принципов, аналогичных тем, что используются в статистической физике.

В лекции 7 представлены сведения о наиболее существенных отличиях клеточной организации про- и эукариотов в 10 пунктах, в том числе: структуре генетического (хромосомного) аппарата; дифференциации на клеточном/надклеточном (эукариоты) и субклеточном (прокариоты) уровнях; внутриклеточном строении; движении клеток;

структурных основах размножения и др. Далее излагаются основы теории симбиогенеза, объясняющей эволюционное происхождение митохондрий и пластид в эукариотах как результат симбиотического слияния их предшественников с клетками прокариотов. В завершение данной лекции отмечен ряд соображений по дискуссионному вопросу о значении эндосимбиоза как универсального механизма возникновения более широкого круга клеточных органелл и самих эукариотов. К списку обсуждаемых в этой части главы общих “корневых” структур, кодируемых в геномах про- и эукариотов, можно было бы добавить белки цитоскелета, чьи аналоги были обнаружены на рубеже веков в геномах бактерий с несферической формой.

Лекция 8 дает представление об увлекательной истории идентификации и результатах современных исследований архей (часто представленных экстремофилами, но обнаруживаемых также и в обычных биотопах), как самостоятельного домена в трихотомичном (с некоторых пор) универсальном древе жизни. Подробно рассмотрены фенотипические и генотипические особенности архей, а также проблема анцестора (прародителя) — универсального предшественника трех независимых в своем эволюционном развитии клеточных линий.

Лекции 9 и 10 посвящены принципам и методам исследования фенотипических свойств микроорганизмов, используемых для их идентификации и классификации. В том числе морфологии клеток, их цитологических характеристик; культуральных и экологических признаков; физиоло-

го-биохимических показателей; иммунохимических свойств и результатов фаготипирования микроорганизмов; подвижности клеток; широкого спектра их хемотаксономических свойств. В конце лекции 9 дано краткое описание ряда современных изданий Определителя бактерий Берджи. Хемотаксономические показатели бактерий и методы их исследований представлены отдельно в лекции 10, включая структуру пептидогликана и тейхоевых кислот; хемотип клеточной стенки; хиноны и терминальные оксидазы дыхательной цепи; состав жирных кислот; полярные липиды; состав полиаминов.

Лекцию 10 и издание в целом завершает описание основных этапов и свод правил, рекомендуемых авторами при работе с микробными изолятами с целью установления их систематического положения. В дополняющих комментариях приводятся рассуждения авторов и цитаты из ряда источников, отражающие вполне оптимистичный взгляд на будущее систематики прокариотов, с преодолением сложностей и противоречий (обсуждаемых в пособии) благодаря наблюдаемому ныне бурному научному и технологическому прогрессу в “лабораторной” и вычислительной молекулярной биологии, связанных с ними отраслях знаний. В чем рецензент готов решительно присоединиться к авторам.

Полагаю, что данное издание будет весьма полезным студентами и молодым научным сотрудникам, чья специализация соответствует областям микробиологии и биотехнологии, а также с интересом встречено специалистами в указанных областях.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ 2020 г.

- Авакян М.Р. см. Лукина А.П.
 Авакян М.Р. см. Панова И.А.
 Аксенова Т.С. см. Проворов Н.А.
 Актуганов Г.Э. см. Кузьмина Л.Ю.
 Алексеев Я.И. см. Баймиев Ан.Х.
 Андронов Е.Е. см. Зверев А.О.
 Андронов Е.Е. см. Петрова С.Н.
 Андронов Е.Е. см. Проворов Н.А.
 Анохина Т.О. см. Есикова Т.З.
 Антал Т.К. см. Петрова Е.В.
 Атрощик Е.А. см. Николаев Ю.А.
 Ашихмин А.А. см. Большаков М.А.
 Ашихмин А.А. см. Горленко В.М.
 Ашихмин А.А. см. Махнева З.К.
 Бабенко В.В. см. Куликов Е.Е.
 Бабич Т.Л. см. Соколова Д.Ш.
 Бажутин Г.А. см. Тюмина Е.А.
 Баймиев Ал.Х. см. Баймиев Ан.Х.
 Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Кулуев Б.Р., Шве́ц К.Ю., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Чемерис Д.А., Зубов В.В., Алексеев Я.И., Мавзютов А.Р., Иваненков Я.А., Чемерис А.В. Современные подходы к дифференциации живых и мертвых бактерий с помощью избирательной амплификации нуклеиновых кислот № 1, 17–33.
 Банзаракцаева Т.Г. см. Лаврентьева Е.В.
 Батурина О.А. см. Лаврентьева Е.В.
 Белецкий А.В. см. Груздев Е.В.
 Белецкий А.В. см. Ермакова А.Я.
 Белецкий А.В. см. Кадников В.В.
 Белецкий А. см. Ошкин И.Ю.
 Белимов А.А. см. Зверев А.О.
 Белимов А.А. см. Петрова С.Н.
 Белова О.В. см. Лисов А.В.
 Белова С.Э., Салтыкова В.А., Дедыш С.Н. Антимикробная активность нового пресноводного планктомицета *Lacipirellula parvula* PX69^T № 5, 503–510.
 Белова С.Э. см. Ошкин И.Ю.
 Белова С.Э. см. Ошкин И.Ю.
 Белых О.И. см. Подлесная Г.В.
 Белькова Н.Л. см. Кузнецова Е.В.
 Береговая Ю.В. см. Петрова С.Н.
 Берестовская Ю.Ю. см. Каллистова А.Ю.
 Биджиева С.Х. см. Соколова Д.Ш.
 Биндер А.С. см. Летута У.Г.
 Бисенова М.А. см. Соколова Д.Ш.
 Богатырева А.О. см. Ревин В.В.
 Болотов А.Г. см. Глушакова А.М.
 Большаков М.А., Ашихмин А.А., Махнева З.К., Москаленко А.А. Сборка светособирающих комплексов LH2 *Thiorhodospira sibirica* с разным уровнем содержания каротиноидов № 3, 290–299.
 Большаков М.А. см. Махнева З.К.
 Бондаренко Н.А., Русанов И.И., Черницына С.М., Шубенкова О.В., Пименов Н.В., Борисова О.В., Галстян А.Г., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В., Зверев В.В. Дифференциальная диагностика бактерий по спектрам гигантского комбинационного рассеяния № 2, 200–205.
 Боровкова А.Н., Михайлова Ю.В., Наумова Е.С. Молекулярно-генетические особенности биологических видов дрожжей рода *Saccharomyces* № 4, 390–399.
 Боунди-Миллс К.Л. см. Наумова Е.С.
 Бочкова Е.А. см. Вишнякова А.В.
 Бочкова Е.А. см. Миронов В.В.
 Брянцева И.А. см. Горленко В.М.
 Булаев А.Г. Биоокисление пирротина умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами № 5, 511–521.
 Булаев А.Г. Влияние органического источника углерода на биоокисление пирита умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами № 3, 315–323.
 Булаев А.Г. см. Елкина Ю.А.
 Буров А.М. см. Шелудько А.В.
 Бут С.Ю. см. Ошкин И.Ю.
 Бут С.Ю. см. Ошкин И.Ю.
 Бутылкина М.А. см. Глушакова А.М.
 Вантеева А.В. см. Миронов В.В.
 Вишнякова А.В., Литти Ю.В., Бочкова Е.А., Ермошин А.А., Ножевникова А.Н. Изменение относительной численности микробных групп, участвующих в удалении азота в системе реакторов анаммокс-частичной нитрификации при увеличении нагрузки по аммонийному азоту и ХПК № 2, 206–213.
 Власова А.П. см. Манучарова Н.А.
 Галаджиева А.А. см. Дерябин Д.Г.
 Галимзянова Р.Ф. см. Кузьмина Л.Ю.
 Галстян А.Г. см. Борисова О.В.
 Ганнесен А.В. см. Данилова Н.Д.
 Ганнесен А.В. см. Журина М.В.

- Ганнесен А.В. см. Журина М.В.
 Ганнесен А.В. см. Миронов В.В.
 Ганнесен А.В. см. Николаев Ю.А.
 Ганнесен А.В. см. Плакунов В.К.
 Гафаров А.Б. см. Есикова Т.З.
 Герасин В.А. см. Журина М.В.
 Глаголев М.В. см. Сабреков А.Ф.
 Гладких Р.В. см. Захарков С.П.
 Глухова Л.Б. см. Соколянская Л.О.
 Глушакова А.М., Качалкин А.В., Умарова А.Б.,
 Бутылкина М.А., Кокорева А.А., Иванова А.Е., Бо-
 лотов А.Г., Дунаева А.Е., Максимова И.А. Дрожже-
 вые комплексы в почвах некоторых южных городов
 России (Краснодар, Майкоп, Симферополь, Сочи)
 № 5, 612–618.
 Головченко А.В. см. Добровольская Т.Г.
 Голомидова А.К. см. Куликов Е.Е.
 Голубева Е.М. см. Кондратьева Л.М.
 Горленко В.М., Брянцева И.А., Самылина О.С.,
 Ашихмин А.А., Синетова М.А., Кострикина Н.А.,
 Козяева В.В. Аноксигенные нитчатые фототроф-
 ные бактерии в микробных сообществах содовых
 озер Кулундинской степи (Алтайский край) № 6,
 688–699.
 Грачев В.А. см. Каллистова А.Ю.
 Груздев Д.С. см. Ивановский Р.Н.
 Груздев Д.С. см. Кузнецова А.И.
 Груздев Д.С. см. Соколова Д.Ш.
 Груздев Д.С. см. Турова Т.П.
 Груздев Е.В., Белецкий А.В., Кадников В.В.,
 Марданов А.В., Иванов М.В., Карначук О.В., Ра-
 вин Н.В. Разнообразие эукариотических микроор-
 ганизмов в дренажных водах открытого угольного
 карьера № 5, 623–628.
 Гулин М.Б. см. Тихонова Е.Н.
 Гуринович А.С., Титок М.А. Молекулярно-ге-
 нетический и функциональный анализ плазмиды
 PBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis* № 6,
 646–657.
 Данилова Н.Д., Соловьева Т.В., Мартыанов С.В.,
 Журина М.В., Ганнесен А.В. Стимулирующий эф-
 фект адреналина на биопленки *Micrococcus luteus*
 C01 № 4, 488–492.
 Данилова О.А. см. Януцевич Е.А.
 Данилова Э.В. см. Лукина А.П.
 Дедыш С.Н. см. Белова С.Э.
 Дедыш С.Н. см. Наумов Д.Г.
 Дедыш С.Н. см. Ошкин И.Ю.
 Дедыш С.Н. см. Ошкин И.Ю.
 Демкина Е.В. см. Николаев Ю.А.
 Демкина Е.В. см. Николаев Ю.А.
 Денщиков В.А. см. Петрова С.Н.
 Дерябин Д.Г., Галаджиева А.А., Дускаев Г.К.
 Скрининг производных *N*-гексанамида и 2*H*-1,3-
 бензодиазола как модуляторов “кворум сенсинга”
 у *Chromobacterium violaceum* № 6, 728–736.
 Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Юрчен-
 ко Е.Н., Якушев А.В., Манучарова Н.А., Лысак Л.В.,
 Костина Н.В. Структура и функции бактериаль-
 ных сообществ регрессионных пятен верхового
 торфяника № 1, 111–120.
 Долгих А.В. см. Кудинова А.Г.
 Доронина Н.В. см. Чемодурова А.А.
 Дунаева А.Е. см. Глушакова А.М.
 Дускаев Г.К. см. Дерябин Д.Г.
 Евсеев В.А. см. Соколянская Л.О.
 Евстигнеева С.С. см. Шелудько А.В.
 Елкина Ю.А., Мельникова Е.А., Меламуд В.С.,
 Булаев А.Г. Биовыщелачивание теннантита и
 энаргита умеренно-термофильными ацидофиль-
 ными микроорганизмами № 4, 419–431.
 Ермакова А.Я., Белецкий А.В., Марданов А.В.,
 Петрова М.А., Равин Н.В., Ракитин А.Л. Новая
 плазида PALWVS1.4 штамма *Acinetobacter lwoffii*
 VS15, несущая ген устойчивости к хлорамфени-
 колу № 5, 619–622.
 Ермошин А.А. см. Вишнякова А.В.
 Ершов А.П. см. Соколова Д.Ш.
 Ершов А.П. см. Семенова Е.М.
 Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Анохина Т.О. Генети-
 ческий контроль деструкции *epsilon*-капролактама,
 толуола и *meta*-ксилола у штамма *Pseudomonas*
putida CT3 № 2, 247–251.
 Журавлева Е.А. см. Ножевникова А.Н.
 Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В.,
 Плакунов В.К. Экспресс-метод определения вза-
 имосвязи биокоррозии полиэтилена биопленка-
 ми *Chromobacterium violaceum* с их способностью
 формировать внеклеточный полимерный мат-
 рикс № 1, 52–58.
 Журина М.В., Каллистова А.Ю., Панюшкина А.Е.,
 Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Герасин В.А., Си-
 вов Н.А., Тихомиров В.А., Плакунов В.К. Специ-
 фика формирования мультитиповых микробных
 биопленок на поверхности полиэтилена № 4,
 400–409.
 Журина М.В. см. Данилова Н.Д.
 Журина М.В. см. Плакунов В.К.
 Заварзина А.Г. см. Лисов А.В.
 Захарков С.П., Московцева А.В., Лепская Е.В.,
 Штрайхерт Е.А., Гладких Р.В. Продукционные
 характеристики бактерио- и фитопланктона Ава-
 чинской бухты и южного района Дальневосточ-
 ного Государственного Морского Биосферного
 Заповедника в летне-осенний период 2017 года
 № 5, 593–603.

Зверев А.О., Першина Е.В., Шапкин В.М., Кичко А.К., Митрофанова О.П., Кобылянский В.Д., Юзихин О.С., Белимов А.А., Андронов Е.Е. Молекулярный анализ микробных сообществ ризосфер злаков, выращенных на контрастных почвах № 2, 235–246.

Зверев В.В. см. **Борисова О.В.**

Земская Т.И. см. **Бондаренко Н.А.**

Земская Т.И. Функционирование микроводорослей подледного планктона и ледовой интерстициали в прибрежной зоне озера Байкал № 3, 344–355.

Зенова Г.М. см. **Манучарова Н.А.**

Зубов В.В. см. **Баймиев Ан.Х.**

Зюсман В.С. см. **Панова И.А.**

Иваненков Я.А. см. **Баймиев Ан.Х.**

Иванова А.Е. см. **Глушакова А.М.**

Иванова А.Е. см. **Соколова Д.Ш.**

Иванова Е.А. см. **Кузнецова А.И.**

Иванов М.В. см. **Груздев Е.В.**

Иванов М.В. см. **Панова И.А.**

Иванов М.В. см. **Соколянская Л.О.**

Ивановский Р.Н., Кеппен О.И., Лебедева Н.В., Груздев Д.С. Карбоангидраза аноксигенных фототрофных бактерий № 3, 276–283.

Ивановский Р.Н., Лебедева Н.В., Кеппен О.И., Чудновская А.В. Выделение продуктов фотосинтеза аноксигенными фототрофными бактериями № 1, 34–41.

Ивашина Т.В. см. **Канапина А.Ш.**

Ившина И.Б. см. **Тюмина Е.А.**

Иккерт О.П. см. **Соколянская Л.О.**

Ильясов Д.В. см. **Сабреков А.Ф.**

Кадников В.В., Марданов А.В., Белецкий А.В., Карначук О.В., Равин Н.В. Геномный анализ бактерии некультивируемого филума *Riflеbacteria* выявил пути органотрофного метаболизма и диссимиляционного восстановления железа № 3, 334–343.

Кадников В.В. см. **Груздев Е.В.**

Кадников В.В. см. **Панова И.А.**

Калинина А.Е. см. **Соколянская Л.О.**

Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачев В.А., Кострикина Н.А., Пелевина А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В. Исследование формирования и развития анаммокс-биопленок методами световой, эпифлуоресцентной и электронной микроскопии № 6, 700–713.

Каллистова А.Ю. см. **Журина М.В.**

Канапацкий Т.А. см. **Кузнецова А.И.**

Канапина А.Ш., Марченков В.В., Сурин А.К., Ивашина Т.В. Масс-спектрометрический анализ кислых экзоолигосахаридов клубеньковых бакте-

рий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 № 5, 522–534.

Капаруллина Е.Н. см. **Чемодурова А.А.**

Карасев Е.С. см. **Проворов Н.А.**

Каримов Т.Д. см. **Манучарова Н.А.**

Карначук О.В. см. **Груздев Е.В.**

Карначук О.В. см. **Кадников В.В.**

Карначук О.В. см. **Лукина А.П.**

Карначук О.В. см. **Панова И.А.**

Карначук О.В. см. **Соколянская Л.О.**

Картагена Гомез А.Д.П. см. **Тюмина Е.А.**

Кацы Е.И. см. **Шелудько А.В.**

Качалкин А.В. см. **Глушакова А.М.**

Качалкин А.В. см. **Максимова И.А.**

Кеппен О.И. см. **Ивановский Р.Н.**

Кеппен О.И. см. **Ивановский Р.Н.**

Кимеклис А.К. см. **Проворов Н.А.**

Кичко А.К. см. **Зверев А.О.**

Кобылянский В.Д. см. **Зверев А.О.**

Ковалева А.А. см. **Панова И.А.**

Козырева Л.П. см. **Лаврентьева Е.В.**

Козяева В.В. см. **Горленко В.М.**

Кокорева А.А. см. **Глушакова А.М.**

Колганова Т.В. см. **Николаев Ю.А.**

Кондратьева Л.М., Шадрина О.С., Литвиненко З.Н., Голубева Е.М., Коновалова Н.С. Микробные биопленки в карстовой пещере Прощальная (Дальний Восток, Россия) № 5, 535–546.

Коновалова Н.С. см. **Кондратьева Л.М.**

Константинов А.И. см. **Николаев Ю.А.**

Копать В.В. см. **Проворов Н.А.**

Косолапов Д.Б. см. **Кузнецова Е.В.**

Костина Н.В. см. **Добровольская Т.Г.**

Кострикина Н.А. см. **Горленко В.М.**

Кострикина Н.А. см. **Каллистова А.Ю.**

Коцюрбенко О.Р. см. **Лаврентьева Е.В.**

Краснопеев А.Ю. см. **Подлесная Г.В.**

Кренделева Т.Е. см. **Петрова Е.В.**

Кривина Е.С., Темралеева А.Д. Проблема идентификации и криптическое разнообразие микроводорослей клады *Chlorella* (*Chlorophyta*) № 6, 714–727.

Кривошеина М.Г. см. **Максимова И.А.**

Ксенофонтова Н.А. см. **Манучарова Н.А.**

Кудинова А.Г., Петрова М.А., Долгих А.В., Соина В.С., Лысак Л.В., Маслова О.А. Таксономическое разнообразие бактерий и их фильтрующих форм в почвах Восточной Антарктиды (оазисы Холмы Ларсеманн и Холмы Бангера) № 5, 581–592.

Кузнецова А.И., Иванова Е.А., Самылина О.С., Курбанова Ф.Г., Груздев Д.С., Канапацкий Т.А.,

Пименов Н.В. Прокариотные сообщества засоленных почв Приэльтонья в почвенной катене вдоль реки Хары № 6, 658–674.

Кузнецова Е.В., Косолапов Д.Б., Белькова Н.Л. Разнообразие планктонных бактерий Дургунского и Тайширского водохранилищ (Западная Монголия) № 5, 604–611.

Кузьмина Л.Ю., Червяцова О.Я., Ясаков Т.Р., Сафина В.Р., Галимзянова Р.Ф., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. Характеристика новых хитин-деградирующих штаммов *Laceyella* spp. из Новоафонской Пещеры (Абхазия), продуцирующих термостабильные хитиназы № 5, 566–580.

Кукарских Г.П. см. Петрова Е.В.

Куликов Е.Е., Голомидова А.К., Бабенко В.В., Летаров А.В. Простой метод выделения ДНК виroma фекалий лошади, пригодный для секвенирования по технологии Oxford Nanopore № 2, 252–256.

Кулуев Б.Р. см. Баймиев Ан.Х.

Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е. Способность бактерий рода *Azospirillum* к деколонизации синтетических красителей № 4, 453–461.

Курбанова Ф.Г. см. Кузнецова А.И.

Лаврентьева Е.В., Эрдынеева Е.Б., Банзаракцаева Т.Г., Кошорбенко О.Р., Батурина О.А., Хахинов В.В., Козырева Л.П. Разнообразие прокариот в биотопах соленого щелочного озера Гуджирганское (Баргузинская долина, Бурятия) № 3, 356–366.

Ланг Э. см. Чемодурова А.А.

Лаптев А.Б. см. Турова Т.П.

Латыголец Е.А. см. Панова И.А.

Лебедева Н.В. см. Ивановский Р.Н.

Лебедева Н.В. см. Ивановский Р.Н.

Леонтьевский А.А. см. Лисов А.В.

Лепская Е.В. см. Захарков С.П.

Летаров А.В. см. Куликов Е.Е.

Летута У.Г., Биндер А.С., Тихонова Т.А. Влияние изотопов магния на чувствительность бактерий *E. coli* к антибиотикам № 3, 284–289.

Лисичкин Г.В. см. Борисова О.В.

Лисов А.В., Заварзина А.Г., Белова О.В., Леонтьевский А.А. Трансформация гуминовой кислоты грибом *Cerrena unicolor* в условиях роста на целлюлозе и глюкозе № 3, 300–307.

Литвиненко З.Н. см. Кондратьева Л.М.

Литти Ю.В. см. Вишнякова А.В.

Литти Ю.В. см. Ножевникова А.Н.

Литти Ю.В. см. Сабреков А.Ф.

Лияськина Е.В. см. Ревин В.В.

Лойко Н.Г. см. Николаев Ю.А.

Лукина А.П., Авакян М.Р., Данилова Э.В., Карначук О.В. Использование микробных образ-

таний для выделения спорообразующих прокариот из подземной биосферы № 6, 748–752.

Лысак Л.В. см. Добровольская Т.Г.

Лысак Л.В. см. Кудинова А.Г.

Мавзютов А.Р. см. Баймиев Ан.Х.

Максимова И.А., Качалкин А.В., Яковлева Е.Ю., Кривошеина М.Г., Марков А.В. Дрожжевые сообщества, ассоциированные с двукрылыми насекомыми литорали Белого моря № 2, 214–221.

Максимова И.А. см. Глушакова А.М.

Малахова Т.В. см. Тихонова Е.Н.

Манучарова Н.А., Ксенофонтова Н.А., Каринов Т.Д., Власова А.П., Зенова Г.М., Степанов А.Л. Изменение филогенетической структуры метаболически активного прокариотного комплекса почв под влиянием нефтяного загрязнения № 2, 222–234.

Манучарова Н.А. см. Добровольская Т.Г.

Марданов А.В. см. Груздев Е.В.

Марданов А.В. см. Ермакова А.Я.

Марданов А.В. см. Кадников В.В.

Марданов А.В. см. Каллистова А.Ю.

Марданов А.В. см. Ошкин И.Ю.

Марданов А.В. см. Ошкин И.Ю.

Марков А.В. см. Максимова И.А.

Мартьянов С.В. см. Данилова Н.Д.

Мартьянов С.В. см. Журина М.В.

Мартьянов С.В. см. Журина М.В.

Мартьянов С.В. см. Плакунов В.К.

Марченков В.В. см. Канапина А.Ш.

Маслова О.А. см. Кудинова А.Г.

Матниязов Р.Т. см. Баймиев Ан.Х.

Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Выделение синглетного кислорода мембранами пурпурных фотосинтезирующих бактерий при облучении светом происходит при возможном участии каротиноидов № 2, 169–179.

Махнева З.К. см. Большаков М.А.

Мачулин А.В. см. Чемодурова А.А.

Меламуд В.С. см. Елкина Ю.А.

Меламуд В.С. см. Муравьев М.И.

Мелентьев А.И. см. Кузьмина Л.Ю.

Мельникова Е.А. см. Елкина Ю.А.

Меркель А.Ю. см. Тихонова Е.Н.

Минаков Д.Л. см. Петрова С.Н.

Миронов В.В., Бочкова Е.А., Ганнесен А.В., Вантеева А.В., Русскова Ю.И., Ножевникова А.Н. Динамика биологических процессов при компостировании анаэробно обработанного осадка сточных вод № 4, 474–487.

Мирошников К.К. см. Ошкин И.Ю.

Митрофанова О.П. см. Зверев А.О.

- Михайлова Ю.В. см. Боровкова А.Н.
 Мокеев Д.И. см. Шелудько А.В.
 Москаленко А.А. см. Большаков М.А.
 Москаленко А.А. см. Махнева З.К.
 Московцева А.В. см. Захарков С.П.
 Муравьев М.И., Меламуд В.С., Фомченко Н.В. Биокисление высокосернистых продуктов химического выщелачивания цинкового концентрата № 2, 180–188.
 Назина Т.Н. см. Семенова Е.М.
 Назина Т.Н. см. Соколова Д.Ш.
 Назина Т.Н. см. Турова Т.П.
 Наумова Е.С., Боунди-Миллс К.Л., Наумов Г.И. Филогенетика и биогеография важных для биотехнологии метилотрофных дрожжей *Komagataella* № 3, 308–314.
 Наумова Е.С. см. Боровкова А.Н.
 Наумов Г.И. см. Наумова Е.С.
 Наумов Д.Г., Дедыш С.Н. Хитиназы, кодируемые в геномах ацидобактерий: происхождение и эволюция № 4, 381–389.
 Никитина А.А. см. Ножевникова А.Н.
 Никитина В.Е. см. Купряшина М.А.
 Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Агрошик Е.А., Константинов А.И., Перминова И.В., Эль-Регистан Г.И. Функциональная активность гуминовых веществ в пролонгировании выживания популяции углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter junii* № 1, 74–87.
 Николаев Ю.А., Панкратов Т.А., Ганнесен А.В., Колганова Т.В., Сузина Н.Е., Демкина Е.В., Эль-Регистан Г.И. Образование и свойства клеток персисторов бактерий – обитателей кожи человека, *Staphylococcus capitis* и *Staphylococcus epidermidis* № 4, 432–443
 Николаев Ю.А. см. Каллистова А.Ю.
 Ножевникова А.Н., Русскова Ю.И., Литти Ю.В., Паршина С.Н., Журавлева Е.А., Никитина А.А. Синтрофия и межвидовой перенос электронов в метаногенных микробных сообществах № 2, 131–151.
 Ножевникова А.Н. см. Вишнякова А.В.
 Ножевникова А.Н. см. Миронов В.В.
 Оленин А.Ю. см. Борисова О.В.
 Ошкин И.Ю., Белова С.Э., Хохлачев Н.С., Семенова В.А., Червякова О.П., Чернушкин Д.В., Тихонова Е.Н., Марданов А.В., Равин Н.В., Попов В.О., Пименов Н.В., Дедыш С.Н. Молекулярный анализ состава микробного сообщества, формирующегося при непрерывном культивировании *Methylococcus* sp. Concept-8 на природном газе № 5, 556–565.
 Ошкин И.Ю., Хмеленина В.Н., Бут С.Ю., Мирошников К.К., Белова С.Э., Хохлачев Н.С., Чернушкин Д.В., Белецкий А., Марданов А.В., Равин Н.В., Попов В.О., Дедыш С.Н., Пименов Н.В. Анализ полной последовательности генома нового представителя рода *Methylococcus*, штамм Concept-8 № 3, 324–333.
 Панкратов Т.А. см. Николаев Ю.А.
 Панова И.А., Русанов И.И., Кадников В.В., Латыголец Е.А., Авакян М.Р., Иванов М.В., Зюсман В.С., Ковалева А.А., Н. В. Равин Н.В., Пименов Н.В., Карначук О.В. Сульфатредукция в подземных горизонтах затопленной угольной шахты в Кузбассе № 5, 547–555.
 Панюшкина А.Е. см. Журина М.В.
 Паршина С.Н. см. Ножевникова А.Н.
 Пелевина А.В. см. Каллистова А.Ю.
 Перминова И.В. см. Николаев Ю.А.
 Першина Е.В. см. Зверев А.О.
 Петрова Е.В., Кукарских Г.П., Кренделева Т.Е., Антал Т.К. О механизмах и роли фотосинтетического образования водорода у зеленых микроводорослей № 3, 259–275.
 Петрова Л.П. см. Шелудько А.В.
 Петрова М.А. см. Ермакова А.А.
 Петрова М.А. см. Кудинова А.Г.
 Петрова С.Н., Андронов Е.Е., Белимов А.А., Береговая Ю.В., Денщиков В.А., Минаков Д.Л. Изменение структуры прокариотного сообщества в ризосфере рапса ярового (*Brassica napus* L.) в зависимости от внесения бактерий, утилизирующих 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат дезаминазу № 1, 121–128.
 Пименов Н.В. см. Бондаренко Н.А.
 Пименов Н.В. см. Каллистова А.Ю.
 Пименов Н.В. см. Кузнецова А.И.
 Пименов Н.В. см. Ошкин И.Ю.
 Пименов Н.В. см. Ошкин И.Ю.
 Пименов Н.В. см. Панова И.А.
 Пименов Н.В. см. Тихонова Е.Н.
 Плакунов В.К., Ганнесен А.В., Мартянов С.В., Журина М.В. Механизмы биокоррозии синтетических пластмасс и их защита от повреждения мультивидовыми микробными биопленками № 6, 631–645.
 Плакунов В.К. см. Журина М.В.
 Плакунов В.К. см. Журина М.В.
 Подлесная Г.В., Потапов С.А., Краснопеов А.Ю., Штыкова Ю.Р., Томберг И.В., Тимошкин О.А., Белых О.И. Разнообразие денитрифицирующих бактерий в биопленках, сформированных на каменных субстратах в литеральной зоне озера Байкал № 3, 367–371.
 Пономарева Е.Г. см. Купряшина М.А.
 Пономарева Е.Г. см. Шелудько А.В.
 Попов В.О. см. Ошкин И.Ю.
 Попов В.О. см. Ошкин И.Ю.

- Потапов С.А. см. Подлесная Г.В.
- Проворов Н.А., Андронов Е.Е., Кимеклис А.К., Чирак Е.Р., Карасев Е.С., Аксенова Т.С., Копать В.В. Эволюционная география клубеньковых бактерий: видообразование, направляемое растения-ми-хозяевами № 1, 3–16.
- Равин Н.В. см. Груздев Е.В.
- Равин Н.В. см. Ермакова А.Я.
- Равин Н.В. см. Кадников В.В.
- Равин Н.В. см. Каллистова А.Ю.
- Равин Н.В. см. Ошкин И.Ю.
- Равин Н.В. см. Ошкин И.Ю.
- Равин Н.В. см. Панова И.А.
- Ракитин А.Л. см. Ермакова А.Я.
- Ратникова М.С., Титок М.А. Молекулярно-генетические маркеры для идентификации бактерий *Rhodococcus erythropolis* и *Rhodococcus qingshengii* № 4, 444–452.
- Ревин В.В., Лиясыкина Е.В., Сапунова Н.Б., Богатырева А.О. Выделение и характеристика штаммов — продуцентов бактериальной целлюлозы № 1, 88–98.
- Русанов И.И. см. Бондаренко Н.А.
- Русанов И.И. см. Панова И.А.
- Русскова Ю.И. см. Миронов В.В.
- Русскова Ю.И. см. Ножевникова А.Н.
- Сабреков А.Ф., Семенов М.В., Терентьева И.Е., Литти Ю.В., Ильясов Д.В., Глаголев М.В. Связь удельной скорости окисления метана почвой и обилия метанотрофов, оцененного с помощью количественной ПЦР № 2, 189–199.
- Салтыкова В.А. см. Белова С.Э.
- Самылина О.С. см. Горленко В.М.
- Самылина О.С. см. Кузнецова А.И.
- Сапунова Н.Б. см. Ревин В.В.
- Сафина В.Р. см. Кузьмина Л.Ю.
- Семенова В.А. см. Ошкин И.Ю.
- Семенова Е.М., Ершов А.П., Соколова Д.Ш., Турова Т.П., Назина Т.Н. Разнообразие и биотехнологический потенциал нитратредуцирующих бактерий из месторождений тяжелой нефти (Россия) № 6, 675–687.
- Семенова Е.М. см. Соколова Д.Ш.
- Семенов М.В. см. Сабреков А.Ф.
- Сивов Н.А. см. Журина М.В.
- Синетова М.А. см. Горленко В.М.
- Сисенбаева М.Р. см. Соколова Д.Ш.
- Соина В.С. см. Кудинова А.Г.
- Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Груздев Д.С., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Иванова А.Е., Бабич Т.Л., Сисенбаева М.Р., Бисенова М.А., Назина Т.Н. Микробное разнообразие и потенциальные продуценты сероводорода в нефтяном месторождении Каражанбас (Казахстан) № 4, 462–473.
- Соколова Д.Ш. см. Турова Т.П.
- Соколова Д.Ш. см. Семенова Е.М.
- Соколянская Л.О., Иванов М.В., Иккерт О.П., Калинина А.Е., Евсеев В.А., Глухова Л.Б., Карначук О.В. Осаждение меди в нерастворимые оксалаты термофильными *Aspergillus* spp., выделенными из горящих отходов добычи угля № 4, 493–497.
- Соловьева Т.В. см. Данилова Н.Д.
- Степанов А.Л. см. Манучарова Н.А.
- Сузина Н.Е. см. Николаев Ю.А.
- Сурин А.К. см. Канапина А.Ш.
- Тарновецкий И.Ю. см. Тихонова Е.Н.
- Темралеева А.Д. см. Кривина Е.С.
- Терентьева И.Е. см. Сабреков А.Ф.
- Терёшина В.М. см. Януцевич Е.А.
- Тимошкин О.А. см. Подлесная Г.В.
- Титок М.А. см. Гуринович А.С.
- Титок М.А. см. Ратникова М.С.
- Тихомиров В.А. см. Журина М.В.
- Тихонова Е.Н. см. Ошкин И.Ю.
- Тихонова Е.Н., Тарновецкий И.Ю., Малахова Т.В., Гулин М.Б., Меркель А.Ю., Пименов Н.В. Идентификация аэробных метанооксиляющих бактерий в прибрежных осадках Крымского полуострова № 6, 737–747.
- Тихонова Т.А. см. Летута У.Г.
- Томберг И.В. см. Подлесная Г.В.
- Турова Т.П. см. Семенова Е.М.
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Груздев Д.С., Лаптев А.Б. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ с поверхности полиэтилентерефталатных материалов при экспозиции в водных средах № 1, 99–110.
- Тюмина Е.А., Бажутин Г.А., Картагена Гомез Ад.П., Ившина И.Б. Нестероидные противовоспалительные средства как разновидность эмерджентных загрязнителей № 2, 152–168.
- Умарова А.Б. см. Глушакова А.М.
- Филиппчева Ю.А. см. Шелудько А.В.
- Фомченко Н.В. см. Муравьев М.И.
- Хахинов В.В. см. Лаврентьева Е.В.
- Хмеленина В.Н. см. Ошкин И.Ю.
- Хохлачев Н.С. см. Ошкин И.Ю.
- Хохлачев Н.С. см. Ошкин И.Ю.
- Чемерис А.В. см. Баймиев Ан.Х.
- Чемерис Д.А. см. Баймиев Ан.Х.
- Чемодурова А.А., Капарулина Е.Н., Мачулин А.В., Шпроер К., Ланг Э., Доронина Н.В. *Ancylobacter lacus* sp. nov. и *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov. — новые аэробные факультативно-метилотрофные бактерии № 1, 42–51.

- Червякова О.П. см. Ошкин И.Ю.
Червякова О.П. см. Ошкин И.Ю.
Червяцова О.Я. см. Кузьмина Л.Ю.
Черницына С.М. см. Бондаренко Н.А.
Чернушкин Д.В. см. Ошкин И.Ю.
Чернушкин Д.В. см. Ошкин И.Ю.
Чирак Е.Р. см. Проворов Н.А.
Чудновская А.В. см. Ивановский Р.Н.
Шадрина О.С. см. Кондратьева Л.М.
Шапкин В.М. см. Зверев А.О.
Швец К.Ю. см. Баймиев Ан.Х.
Шелудько А.В., Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С.,
Филиппчева Ю.А., Буров А.М., Петрова Л.П.,
Пономарева Е.Г., Кацы Е.И. Анализ ультраструк-
туры клеток в составе биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* № 1, 59–73.
Шпроер К. см. Чемодурова А.А.
Штрайхерт Е.А. см. Захарков С.П.
Штыкова Ю.Р. см. Подлесная Г.В.
Шубенкова О.В. см. Бондаренко Н.А.
Эль-Регистан Г.И. см. Николаев Ю.А.
Эль-Регистан Г.И. см. Николаев Ю.А.
Эрдынеева Е.Б. см. Лаврентьева Е.В.
Юзихин О.С. см. Зверев А.О.
Юрченко Е.Н. см. Добровольская Т.Г.
Яковлева Е.Ю. см. Максимова И.А.
Якушев А.В. см. Добровольская Т.Г.
Ямиданов Р.С. см. Баймиев Ан.Х.
Януцевич Е.А., Данилова О.А., Терёшина В.М.
Комбинированное действие различных стрессор-
ных факторов на состав мембранных липидов и
осмолитов *Aspergillus niger* № 4, 410–418.
Ясаков Т.Р. см. Кузьмина Л.Ю.