

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 90, номер 4, 2021

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Катаболический потенциал и сурфактантная активность галотолерантных углеводородокисляющих бактерий <i>А. Е. Иванова, И. А. Борзенков, Д. Ш. Соколова</i>	387
Сравнение таксономического состава бактериальных обрастаний, развивающихся на поверхности различных материалов, экспонированных в водных средах <i>Т. П. Турова, Д. Ш. Соколова, Т. Н. Назина, А. Б. Лантев</i>	400
Азотный метаболизм аноксигенной нитчатой фототрофной бактерии <i>Oscillochloris trichoides</i> DG-6 <i>Р. Н. Ивановский, Н. В. Лебедева, О. И. Кеппен, Т. П. Турова</i>	413
<i>Fervidicoccus fontis</i> 3639Fd – первая кренархеота, способная расти на липидах <i>А. И. Карасева, А. Г. Ельченинов, А. А. Перевалова, К. С. Заюлина, Т. В. Кочеткова, И. В. Кубланов</i>	421
Влияние минеральных соединений азота и метанола на состав метанотрофных накопительных культур из осадка метанового сипа озера Байкал <i>О. В. Шубенкова, А. С. Захаренко, Ю. П. Галачьянц, Г. В. Калмычков, В. Г. Иванов, А. В. Хабеев, Т. В. Погодаева, С. М. Черницына, Т. И. Земская</i>	430
Делимитация видов и анализ криптического разнообразия микроводорослей клады <i>Parachlorella</i> ( <i>Chlorophyta</i> ) <i>Е. С. Кривина, А. Д. Темралеева, Ю. С. Букин</i>	443
Изменения в синтезе липополисахарида влияют на формирование биопленок <i>Azospirillum baldaniorum in planta</i> в условиях повышенного содержания меди <i>Л. П. Петрова, Ю. А. Филипьевичева, Е. М. Телешева, Т. Е. Пылаев, А. В. Шелудько</i>	459
Функциональная специфичность продукта гена <i>nifA</i> в пределах группы клубеньковых бактерий <i>А. А. Владимирова, Р. С. Гуменко, Е. С. Акимова, Ал. Х. Баймиев, Ан. Х. Баймиев</i>	471
Особенности дрожжевых сообществ, ассоциированных с термитами тропического муссонного леса: национальный парк Кат Тьен, Вьетнам <i>А. И. Зуева, А. В. Качалкин, И. А. Максимова, Нгуен Ван Тхинь, А. В. Тиунов</i>	480
Молекулярно-генетический полиморфизм дрожжей <i>Kluyveromyces dobzhanskii</i> <i>Е. С. Наумова, Ч.-Ф. Ли, Г. И. Наумов</i>	492
Микробное сообщество отходов птицефабрики и его роль в образовании сероводорода <i>Е. В. Груздев, Е. А. Латыголец, А. В. Белецкий, М. А. Григорьев, А. В. Марданов, М. К. Кадырбаев, О. П. Иккерт, О. В. Карначук, Н. В. Равин</i>	500

## ХРОНИКА

К 150-летию со дня рождения академика Бориса Лаврентьевича Исаченко годы жизни (15.06.1871–17.11.1948)	506
К 120-летию со дня рождения академика Евгения Николаевича Мишустина (22.02.1901–03.05.1991)	509
Пименов Николай Викторович (к 60-летию со дня рождения)	511

# Contents

---

---

Vol. 90, No. 4, 2021

---

---

## Experimental Articles

- Catabolic Potential and Surfactant Activity of Halotolerant Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria  
*A. E. Ivanova, I. A. Borzenkov, and D. Sh. Sokolova* 387
- Comparative Analysis of the Taxonomic Composition of Bacterial Biofilms Developing on Various Material Exposed to Aqueous Media  
*T. P. Tourova, D. Sh. Sokolova, T. N. Nazina, and A. B. Laptev* 400
- Nitrogen Metabolism of an Anoxygenic Filamentous Phototrophic Bacterium *Oscillochlois trichoides* Strain DG-6  
*R. N. Ivanovsky, N. V. Lebedeva, O. I. Keppen, and T. P. Tourova* 413
- Fervidococcus fontis* Strain 3639Fd, the First Crenarchaeon Capable of Growth on Lipids  
*A. I. Karaseva, A. G. Elcheninov, A. A. Perevalova, K. S. Zayulina, T. V. Kochetkova, and I. V. Kublanov* 421
- Effect of Methanol and Mineral Nitrogen Compounds on the Composition of Methanotrophic Enrichments from the Sediments of a Lake Baikal Methane Seep  
*O. V. Shubenkova, A. S. Zakharenko, Yu. P. Galach'yants, G. V. Kalmychkov, V. G. Ivanov, A. V. Khabuev, T. V. Pogodaeva, S. M. Chernitsyna, and T. I. Zemskaya* 430
- Species Delimitation and Cryptic Diversity Analysis of *Parachlorella*-Clade Microalgae (*Chlorophyta*)  
*E. S. Krivina, A. D. Temraleeva, and Yu. S. Bukin* 443
- Variations in Lipopolysaccharide Synthesis Affect Formation of *Azospirillum baldaniorum* Biofilms *in planta* at Elevated Copper Content  
*L. P. Petrova, Yu. A. Filip'echeva, E. M. Telesheva, T. E. Pylaev, and A. V. Shelud'ko* 459
- Functional Specificity of the *nifA* Gene Product within the Group of Root Nodule Bacteria  
*A. A. Vladimirova, R. S. Gumenko, E. S. Akimova, Al. Kh. Baymiev, and An. Kh. Baymiev* 471
- Properties of the Yeast Communities Associated with Termites of a Tropical Monsoon Forest (Cat Tien National Park, Vietnam)  
*A. I. Zueva, A. V. Kachalkin, I. A. Maksimova, Nguen Van Tkhin, and A. V. Tiunov* 480
- Molecular Genetic Polymorphism of the Yeast *Kluyveromyces dobzhanskii*  
*E. S. Naumova, Ch.-Fu Lee, and G. I. Naumov* 492
- The Microbial Community of Poultry Farm Waste and Its Role in Hydrogen Sulfide Production  
*E. V. Gruzdev, E. A. Latygolets, A. V. Beletsky, M. A. Grigoriev, A. V. Mardanov, M. K. Kadyrbaev, O. P. Ikkert, O. V. Karnachuk, and N. V. Ravin* 500

---

## Chronicles

- 150th Anniversary of B.L. Isachenko (1871–1948) 506
- 120th Anniversary of E.N. Mishustin (1901–1991) 509
- 60 Years to N.V. Pimenov 511
- 
-

КАТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ И СУРФАКТАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ<sup>1</sup>© 2021 г. А. Е. Иванова<sup>1</sup>, \*, И. А. Борзенков<sup>1</sup>, Д. Ш. Соколова<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: a.e.ivanova@mail.ru

Поступила в редакцию 24.11.2020 г.

После доработки 27.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Исследованы углеводородоокисляющий потенциал, способность к синтезу биосурфактантов и устойчивость к экологически значимым факторам ранее выделенных штаммов-деструкторов: *Acinetobacter seifertii* WS-1, *Pseudomonas extremaustralis* WS-1, *Dietzia maris* 367-2, *Rhodococcus qingshengii* 367-6, *Gordonia cholesterolivorans* S12. Установлено, что в целом изученные штаммы способны функционировать как деструкторы углеводородов при умеренных (25–37°C) и пониженных (6–10°C) температурах, в широком диапазоне рН (4.0–11.5) и солёности (0–9%) среды. Показано, что, наряду с индивидуальными *n*-алканами, они эффективно разлагали нефть (85–91% алифатической фракции за 5 сут), причем для разных культур бактерий биодеградация C<sub>10</sub>–C<sub>29</sub> *n*-алканов составила 96–100%, а C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub> *изо*-алканов – 26–47%. Благодаря использованию модельной смеси *n*-алканов состава C<sub>10</sub>–C<sub>33</sub> определены скорости потребления углеводородов и субстратные предпочтения штаммов. Обнаружено, что метаболизм обычно устойчивых к биодеструкции мультиразветвленных алканов, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонана (ГМН) и сквалана (C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>, 2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракозан), активировался в присутствии *n*-алканов, при этом *изо*-алканы потреблялись одновременно, но с меньшей скоростью, чем *n*-алканы. После полного элиминирования *n*-алканов окисление сквалана тормозилось, тогда как биодеструкция ГМН активно продолжалась. Штаммы использовали 48–68% сквалана за 6 сут и 28–82% ГМН за 4 сут. ГМН не мог служить единственным источником углерода и энергии для исследованных штаммов, однако длительное культивирование (30 сут) со скваланом сопровождалось резким снижением значений поверхностного и межфазного натяжения среды, слабым ростом бактерий и потреблением до 15% углеводорода. Показано, что все изученные штаммы-деструкторы являются продуцентами поверхностно-активных веществ (ПАВ). Гидрофобные субстраты (жидкие парафины, сквалан, оливковое масло) индуцировали образование био-ПАВ с выраженной сурфактантной активностью, которые снижали межфазное и поверхностное натяжение до минимальных значений – 2.0 и 27.2 мН/м соответственно, тогда как водорастворимые источники углерода (этанол, бензоат, фенол) способствовали образованию эмульгаторов. Эмульгирующая активность была характерна для отдельных штаммов, проявлялась не на всех субстратах и не превышала 50%. Высокий метаболический и адаптивный потенциал исследованных штаммов может быть использован для биоремедиации нефтезагрязненных объектов.

**Ключевые слова:** углеводородоокисляющие бактерии, биодеградация углеводородов, нефть, гептаметилнонан, сквалан, био-ПАВ, поверхностное и межфазное натяжение

**DOI:** 10.31857/S0026365621040054

Углеводородоокисляющие бактерии (УОБ) в течение длительного времени остаются в фокусе интенсивных теоретических и прикладных исследований, что в значительной степени обусловлено их практическим использованием для очистки окружающей среды (Desai, Vanat, 1997; Kumar et al., 2011; Rayu et al., 2012). Эта группа микроорганизмов широко распространена в природе и разно-

образна в таксономическом отношении. Среди наиболее известных ее представителей, утилизирующих индивидуальные углеводороды и нефть, бактерии родов *Acinetobacter* (Lal, Khanna, 1996); *Dietzia* (Wang et al., 2011); *Mycobacterium* (Guo et al., 2010); *Pseudomonas* (Zhang et al., 2011); *Rhodococcus* (Binazadeh et al., 2009) и ряд других.

Нефть представляет собой сложную смесь, состоящую преимущественно из углеводородов. Микробной трансформации подвержен широкий спектр этих соединений (Xu et al., 2018), но степень и скорость биодеградации углеводородов

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621040054 для авторизованных пользователей.

определяется их химическим строением и биологическими возможностями бактерий-деструкторов. Например, мультиразветвленные алканы окисляют только уникальные микроорганизмы (Berekaa, Steinbüchel, 2000; Иванова и соавт., 2016), что стимулирует их дальнейший поиск.

На процесс биодegradации нефти влияют не только ее состав и количество, наличие и физиологические возможности УОБ, но также условия среды обитания микроорганизмов, определяющие саму возможность их активной жизнедеятельности. Поэтому успех применения биотехнологий зависит как от селекции наиболее активных деструкторов, так и от выбора среди них штаммов, приспособленных к основным абиотическим факторам (рН, температура, соленость) местообитания.

Таким образом, знание физиологии новых штаммов бактерий, деградирующих углеводороды разного химического строения, является критически важным для очистки загрязненных местообитаний путем биоремедиации.

Данная работа является частью комплексных исследований по созданию новых биоконструктивных материалов на основе инкапсулирования стабилизированных форм УОБ для очистки нефтесодержащих систем. Выбор микробиологических объектов исследования, общих для всех этапов работы, связан, с одной стороны, с ведущей ролью УОБ в микробной трансформации нефтяных углеводородов, а с другой – с разработкой новых и универсальных для различных представителей этой группы бактерий методических подходов, обеспечивающих повышение жизнеспособности, стрессоустойчивости и функциональной активности бактерий-деструкторов. В работе использовали ранее выделенные нами природные изоляты *A. seifertii* WS-1, *P. extremaustralis* WS-1, *D. maris* 367-2, *R. qingshengii* 367-6, *G. cholesterolivorans* S12, которые характеризовались способностью использовать нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, но отличались по источнику выделения и принадлежности к разным родам грамположительных и грамотрицательных бактерий. Уровень сходства с соответствующими типовыми штаммами по последовательности гена 16S рРНК, определенный при помощи программного обеспечения DNASTAR Inc. (<https://www.dnastar.com/software/lasergene/>), составлял 99.9–100.0%.

Целью настоящей работы было изучить особенности биодеструкции нормальных и разветвленных алканов штаммами *A. seifertii* WS-1, *P. extremaustralis* WS-1, *D. maris* 367-2, *R. qingshengii* 367-6, *G. cholesterolivorans* S12 и оценить их способность синтезировать биосурфактанты в процессе роста на различных органических субстратах, а также устойчивость к температуре, рН и солености среды при росте на углеводородах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** В работе исследовали бактерии, выделенные из нефтяной скважины Бондюжского месторождения нефти (штаммы *R. qingshengii* 367-6 и *D. maris* 367-2), болотистых почв Западной Сибири (штаммы *A. seifertii* WS-1 и *P. extremaustralis* WS-1) и активного ила очистного сооружения г. Альметьевск (штамм *G. cholesterolivorans* S12). Последовательности гена 16S рРНК штаммов *A. seifertii* WS-1, *P. extremaustralis* WS-1, *D. maris* 367-2, *R. qingshengii* 367-6, *G. cholesterolivorans* S12 депонированы в базе данных NCBI под номерами MT632639, MT641229, MT632637, MT632489, MT632490 соответственно. Углеводородокисляющий потенциал и биологические особенности этих штаммов, прямо или косвенно связанные с использованием углеводородов, ранее не изучались.

**Состав питательных сред и условия культивирования микроорганизмов.** Исследуемые штаммы УОБ, если не указаны иные условия, культивировали при температуре 30°C и начальном рН 7.0 в течение 2–15 сут в статических условиях во флаконах объемом 125 мл, содержащих жидкую минеральную среду “М” и одно из выбранных органических соединений в качестве субстрата. Среда “М” содержала (г/л дистиллированной воды):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.02;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01. В среду вносили микроэлементы (Pfennig, Lippert, 1966) в количестве 1 мл/л. Соотношение объемов питательной среды и газовой фазы (воздух), 1 : 10, было достаточным, чтобы исключить лимитацию по кислороду. Углеводороды (*n*-додекан, жидкие парафины состава  $\text{C}_{14}$ – $\text{C}_{21}$ , 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан, сквалан), бензоат, метанол и фенол вносили в среду в количестве 0.1–0.2% (об./об.), остальные органические соединения (оливковое масло, ацетат, пропионат, этанол, глицерин) и нефть – в количестве 1%. Фенол добавляли до конечной концентрации 1 г/л дробно, по 100 мг, после полного потребления предыдущей порции субстрата. Заключение об использовании бактериями конкретного субстрата делали после трех последовательных пересевов культуры на тот же субстрат.

В некоторых экспериментах бактерии выращивали аналогичным образом, но на готовой среде Луриа–Бертани (LB) (“Carl Roth GmbH + Co. KG”, Германия) или на богатой среде “КД” слезыдующего состава (г/л дистиллированной воды): казеиновые кислоты – 10%; дрожжевой экстракт – 5%. Начальное значение рН среды устанавливали 7.2–7.5.

Инокулятом служила культура, выращенная в течение 1–2 сут в жидкой среде LB. Затем клетки осаждали центрифугированием, промывали стерильной водопроводной водой и вносили во фла-



коны с культуральной средой до получения начальной оптической плотности ( $OD_{600}$ ) 0.02–0.04, что соответствовало численности клеток  $10^5$ – $10^6$  клеток в 1 мл в зависимости от штамма бактерий. Рост культур оценивали по оптической плотности на приборе Ultraspec 2100 pro UV/visible Spectrophotometer (“Amersham Biosciences”, США) в 10 мм кювете при длине волны ( $\lambda$ ) 600 нм. В связи с неомогенным ростом бактерий в средах с углеводородами, биомассу перед измерением оптической плотности предварительно отделяли от гидрофобного субстрата центрифугированием, а затем суспендировали в том же объеме минеральной среды “М” без субстрата.

Влияние на исследуемые бактерии основных абиотических факторов среды (температура, pH и соленость) анализировали в жидкой минеральной среде “М” с углеводородами (1 об. %) в качестве субстрата. Зависимость роста УОБ от температуры определяли в среде с *n*-додеканом, от pH и солености – в среде с жидкими парафинами. Рост УОБ изучали в диапазоне pH 3.0–12.0, интервале температур для роста 6–45°C и солености 0–12% NaCl.

В ряде экспериментов субстратом для исследуемых бактерий служила нефть Московского нефтеперерабатывающего завода (МНПЗ). Инкубацию проводили в колбах объемом 500 мл, содержащих 100 мл жидкой минеральной среды “М” с 1 об. % нефти, на качалке (130 об./мин) при температуре 30°C в течение 5 сут. Клетки бактерий первоначально выращивали на среде LB и вносили в среду “М” в количестве 5 об. %.

**Аналитические методы исследования.** Степень биодеструкции нефти оценивали по изменению содержания *n*-алканов и *изо*-алканов в алифатической фракции биодegradированной нефти по сравнению с контролем (в %), как описано ранее (Иванова и соавт., 2018). Контролем служила стерильная среда с нефтью, которую инкубировали в тех же условиях. После инкубации нефть из культуральной жидкости экстрагировали гексаном, гексановую фракцию упаривали на ротационном испарителе и из остатка выделяли алифатическую фракцию на колонке с силикагелем. Алифатическую фракцию анализировали методом ГЖХ на хроматографе Кристалл 5000.1 (ЗАО “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Zebtron™ ZB-1XT (30 м × 0.53 мм × 2.65 мкм) в режиме: начальная температура колонки 100°C, скорость нагрева – 5°C/мин, конечная – 320°C (10 мин). Газом-носителем служил гелий.

Остаточное содержание (%) алканов нефти рассчитывали на основе хроматографических данных по методу внутренней нормализации. В качестве внутреннего стандарта при обчете серии хроматограмм алифатической фракции сырой нефти

использовали суммарную площадь пиков пристана и фитана (*изо*-C<sub>19</sub> + *изо*-C<sub>20</sub>). Обсчет считался корректным при сохранении в ходе экспериментов соотношения *изо*-C<sub>19</sub>/*изо*-C<sub>20</sub>, характерного для нефти МНПЗ. При изменении указанного соотношения в ходе эксперимента более чем на 5% в качестве внутреннего стандарта использовали величину площади пика фитана.

В экспериментах с модельными смесями углеводородов использовали различные композиции *n*-алканов без добавок, а также смеси, дополненные гептаметилнонаном (ГМН) или скваланом (“Merck”, Германия; степень чистоты 98 и 98.5% соответственно). Смесь № 1 получали при растворении 4 г твердых парафинов П2 по ГОСТ 23683-89 в 10 мл смеси жидких парафинов, используемых при розжиге. На рис. S1 (см. Дополнительные материалы) представлена хроматограмма этой модельной смеси. Смесь № 2 состояла из индивидуальных *n*-алканов (*n*-C<sub>12</sub> и *n*-C<sub>17</sub>) и ГМН в соотношении 1 : 1 : 1. Смесь № 3 получали при смешивании 2 мл сквалана и 8 мл смеси жидких парафинов, используемых при розжиге. Содержание индивидуальных углеводородов в модельных смесях представлено в табл. S1 (см. Дополнительные материалы).

Для инкубации со смесью № 1 бактерии предварительно подращивали на среде LB, разбавленной в 4 раза, до достижения величины оптической плотности ( $OD_{600}$ ), равной 1.0. В колбу со 100 мл среды “М” добавляли 300 мкл модельной смеси и 5 мл подращенной культуры УОБ. Через 48 ч инкубации на качалке (130 об./мин) при 30°C остаточные углеводороды экстрагировали путем добавления в каждую колбу 4.5 мл гексана, содержащего в качестве внутреннего стандарта 1 об. % сквалана.

При использовании в качестве источника углерода ГМН, сквалана, смеси № 2 и смеси № 3 биомассу УОБ предварительно подращивали в среде “М” со смесью № 1 до момента достижения величины оптической плотности  $OD_{600}$ , равной 1.0. Затем в колбу со 100 мл среды “М” добавляли 300 мкл субстрата (индивидуального *изо*-алкана или *изо*-алкана в смеси с *n*-алканами) и 5 мл подращенной культуры. Бактерии культивировали в условиях перемешивания на качалке (130 об./мин) и 30°C. Через определенные периоды времени культуры снимали с качалки и остаточные углеводороды экстрагировали путем добавления в каждую 4.5 мл гексана с 1 об. % сквалана в качестве внутреннего стандарта для вариантов с ГМН или, наоборот, с 1 об. % ГМН для вариантов со скваланом. В процессе экстракции закрытые полиэтиленовой пленкой колбы помещали на качалку (130 об./мин) при комнатной температуре на 15 мин. После расслоения жидкостей пробу для хроматографического анализа объемом 0.5 мл отбирали из верхнего углеводородного слоя. Степень биодegradации уг-

леводородов оценивали по изменению содержания детектируемых соединений в биодеградированном субстрате по сравнению со стерильным контролем без микроорганизмов, инкубируемым в тех же условиях.

Поверхностное натяжение против воздуха и межфазное натяжение на границе культуральная жидкость/гексадекан в культуральных средах исследуемых УОБ определяли полустатистическим методом отрыва кольца на тензиометре Surface Tensiomat 21 (“Cole-Parmer”, США). Индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ) определяли, как описано ранее (Иванова и соавт., 2016). Для того чтобы установить, связан био-ПАВ с клетками бактерий или выделяется в среду, исследовали реологические свойства культуральной жидкости с клетками, супернатанта и клеточной суспензии. Для получения последней 10 мл культуральной жидкости фильтровали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм (“Millipore”, США) с последующим суспендированием биомассы в 10 мл стерильной водопроводной воды.

**Статистический анализ данных.** Представленные в работе результаты отражают усредненные величины по трем независимым сериям экспериментов при трехкратной повторности измерений. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного пакета Statistica (“TIBCO Software Inc.”, США). Для оценки достоверности различий средних данных использовали *t*-критерий Стьюдента с расчетом 95% доверительного интервала.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Изучение некоторых биологических особенностей исследуемых штаммов*

Известно, что большинство УОБ утилизирует разнообразные органические субстраты, и только немногие представители группы (в английской транскрипции “hydrocarbonoclastic bacteria”) специализированы на окислении углеводов. Однако использование углеводов, как отличительная черта рассматриваемой физиологической группы бактерий в целом, накладывает на их биологию существенный отпечаток. Поэтому не вполне корректно изучать некоторые особенности физиологии УОБ на неспецифических субстратах и средах. Например, определять диапазон значений pH и солёности для роста представителей УОБ на глюкозе или богатой органической среде и экстраполировать полученные данные на метаболизм углеводов, что нередко встречается в литературе.

**Влияние источника углерода на рост штаммов-деструкторов.** Из табл. S2 видно, что рост бактерий поддерживали субстраты углеводородной природы (гексадекан, сквалан, вазелиновое масло) и их

производные (ацетат, пропионат, этанол), ароматические соединения (бензоат, фенол), а также глицерин (побочный продукт производства биодизеля) и оливковое масло (пример возобновляемого сырья в качестве альтернативы ископаемым видам топлив). Таким образом, разнообразные широко распространенные и дешевые продукты могут служить для наращивания биомассы этих микроорганизмов.

Следует подчеркнуть, что сквалан поддерживал медленный и слабый рост исследуемых штаммов (за исключением *P. extremaustralis* WS-1), а ГМН не мог служить для них единственным субстратом. Полученные результаты согласуются с данными других авторов о сложности утилизации микроорганизмами сильно разветвленных алканов. В частности, только единичные представители УОБ эффективно утилизируют сквалан в качестве единственного источника углерода и энергии. Среди них быстро растущие актинобактерии *Mycobacterium ratisbonense* и *M. fortuitum* (Berekaa, Steinbüchel, 2000), медленно растущая ацидофильная микобактерия *Mycobacterium* sp. AG<sub>S10</sub> (Иванова и соавт., 2016) и облигатно специализированная на окислении алифатических углеводов бактерия *Alkanindiges illinoisensis* (Bogan et al., 2003).

**Влияние физико-химических характеристик среды на рост штаммов.** Зависимость роста изучаемых штаммов от содержания хлорида натрия в среде проверяли на среде “М” с жидкими парафинами. Результаты представлены на рис. S2. Как можно видеть, все исследуемые штаммы являются галотолерантными и хорошо растут в присутствии в среде до 4% NaCl, при этом рост *D. maris* 367-2 и *G. cholesterolivorans* S12 возможен в более широком диапазоне концентраций хлорида натрия (вплоть до 6 и 9% соли соответственно). Оптимальная концентрация NaCl для роста находится в пределах 0–0.5% NaCl для бактерий *P. extremaustralis* WS-1, *A. seifertii* WS-1, *R. qingshengii* 367-6, 1% NaCl для *G. cholesterolivorans* S12 и 3% NaCl для *D. maris* 367-2. Изменение условий культивирования путем замены минеральной среды на среду КД или LB приводило не только к расширению диапазона солёности для роста культур, но и к смещению оптимальной величины этого параметра в сторону больших значений (рис. 1). Полагаем, что это обусловлено присутствием в использованных богатых питательных средах соединений с осмопротекторными свойствами (например, пролина), оказывающих защитное действие на клетки в условиях повышенного содержания соли.

Зависимость роста культур УОБ от величины начального pH среды изучали в минеральной среде “М” с жидкими парафинами в качестве единственного источника углерода и энергии в течение 2 сут (для *A. seifertii* WS-1) и 5 сут для остальных УОБ. На протяжении этого времени значение pH

оставалось практически неизменным. Буферные растворы не использовали, так как при исследовании широкого диапазона pH приходится применять буферы разного состава, которые сами по себе могут оказывать воздействие на рост микроорганизмов. Результаты суммированы в табл. S3. Для *A. seifertii* WS-1 и *G. cholesterolivorans* S12 оптимальной является слабокислая среда (pH 6.6–6.8), для остальных УОБ – слабощелочная среда в диапазоне pH 7.4–8.5 в зависимости от конкретной культуры бактерий. Следует отметить, что на богатых средах (КД, LB) как диапазон pH для роста, так и оптимальная величина этого параметра могут значительно отличаться от таковых на минеральной среде с углеводородами (данные не показаны). Наблюдаемая картина может объясняться способностью многих бактерий регулировать величину внешнего pH в благоприятную для роста сторону, если состав среды это позволяет.

Влияние температуры на рост культур УОБ изучали в минеральной среде “М” с *n*-додеканом в качестве единственного источника углерода, так как этот *n*-алкан остается в жидком состоянии в исследуемом температурном диапазоне. По нашим данным (табл. S3), исследованные бактерии являются мезофилами, лучше растут в области умеренных температур с оптимумом 28–30°C, но могут активно функционировать и при пониженных температурах, 6–10°C.

Таким образом, штаммы-деструкторы приспособлены к нестабильным экологическим условиям окружающей среды. Наши данные позволяют предположить, что диапазоны pH и солёности, поддерживающие рост штаммов, можно расширить, корректируя состав среды культивирования.

#### Образование био-ПАВ при росте штаммов УОБ на гидрофильных и гидрофобных субстратах

Ограниченная растворимость углеводов в воде препятствует их проникновению в микробную клетку. Для ассимиляции подобных субстратов УОБ выработали различные приспособительные стратегии, в том числе механизм повышения биодоступности углеводов, основанный на снижении поверхностного натяжения растворов посредством синтеза био-ПАВ (Desai, Banat, 1997).

Для определения спектра субстратов, способствующих образованию био-ПАВ, исследовали реологические свойства культуральных жидкостей бактерий, выращенных на различных органических соединениях в статических условиях при температуре 30°C в течение 5 сут. По нашим данным, все изученные штаммы-деструкторы являются продуцентами био-ПАВ (табл. S4, табл. 1). Проведенные сравнительные исследования субстрат-зависимой сурфактантной активности бактерий свидетельствуют о том, что гидрофобные

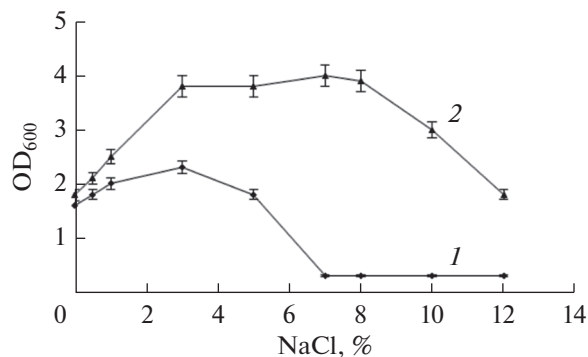


Рис. 1. Рост *D. maris* 367-2 в минеральной среде с жидкими парафинами (1) и на богатой среде КД (2) в присутствии разных концентраций NaCl. Условия инкубации: 5 сут культивирования в статических условиях при температуре 30°C и начальном pH 7.0.

субстраты (жидкие парафины, сквалан, оливковое масло) индуцируют образование ПАВ с выраженными межфазными свойствами (снижают межфазное натяжение среды культивирования до минимальных значений 2.2–2.0 мН/м) и поверхностной активностью (снижают поверхностное натяжение вплоть до 28.7–27.2 мН/м), тогда как водорастворимые источники углерода (этанол, бензоат, фенол) способствуют образованию эмульгаторов (табл. S4, табл. 1). Так, *P. extremaustralis* WS-1, по-видимому, образует комплекс веществ, обладающих эмульгирующими и поверхностно-активными свойствами. Причем на гидрофобном субстрате (жидкие парафины) синтезировались соединения с поверхностно-активными свойствами, а на гидрофильных (этанол, бензоат) – преимущественно эмульгатор. Однако есть и исключения. Так, у *D. maris* 367-2 эмульгирующая способность не выявлена ни на одном из использованных углеводородных субстратов. С другой стороны, биосурфактанты *A. seifertii* WS-1 при росте на жидких парафинах и *G. cholesterolivorans* S12, выращенной на бензоате, феноле и парафинах, проявляли обе функциональные активности.

Следует отметить, что поверхностно-активные свойства штаммов были более выражены, чем их эмульгирующая способность (табл. S4, табл. 1). Последняя характерна для отдельных штаммов и проявлялась не на всех субстратах культивирования, при этом индекс эмульгирования не превышал 50%.

Необходимы дальнейшие исследования сурфактантной способности штаммов в зависимости от субстрата, поскольку есть перспективы для синтеза био-ПАВ с заданным типом функциональной активности.

Более детальное исследование реологических характеристик культуральных жидкостей, полученных после выращивания бактерий на жидких

**Таблица 1.** Реологические параметры культуральных жидкостей исследуемых бактерий при выращивании в среде с жидкими парафинами

Штамм, проба	OD <sub>600</sub>	E <sub>24</sub> , %	ПН, мН/м	МН, мН/м
<i>A. seifertii</i> WS-1				
Культуральная жидкость	2.343	50.0 ± 3	43.1 ± 0.2	15.2 ± 0.1
Супернатант культуральной жидкости		0	42.0 ± 0.3	15.0 ± 0.2
Клеточная суспензия*		50.0 ± 2	43.5 ± 0.4	19.8 ± 0.4
<i>D. maris</i> 367-2				
Культуральная жидкость	0.560	0	45.0 ± 0.2	12.5 ± 0.2
Супернатант культуральной жидкости		0	53.0 ± 0.2	19.2 ± 0.1
Клеточная суспензия*		0	43.0 ± 0.3	2.0 ± 0.1
<i>G. cholesterolivorans</i> S12				
Культуральная жидкость	0.558	5.0 ± 0.2	43.5 ± 0.1	5.0 ± 0.2
Супернатант культуральной жидкости		0	53.9 ± 0.5	22.0 ± 0.4
Клеточная суспензия*		50.0 ± 4	51.0 ± 0.2	3.1 ± 0.2
<i>R. qingshengii</i> 367-6				
Культуральная жидкость	0.582	10.0 ± 0.4	33.8 ± 0.3	2.3 ± 0.1
Супернатант культуральной жидкости		0	51.0 ± 0.1	20.0 ± 0.3
Клеточная суспензия*		5.0 ± 0.3	38.2 ± 0.3	7.5 ± 0.4
<i>P. extremaustralis</i> WS-1				
Культуральная жидкость	0.372	0	35.0 ± 0.2	8.0 ± 0.2
Супернатант культуральной жидкости		0	46.0 ± 0.4	19.7 ± 0.4
Клеточная суспензия*		0	44.9 ± 0.5	4.0 ± 0.1
Контроль без микроорганизмов	0.05	0	55.0 ± 0.2	25.0 ± 0.5

\* Культуральную жидкость с клетками пропускали через фильтры с диаметром пор 0.2 мкм, полученную биомассу суспендировали в 10 мл стерильной водопроводной воды. Обозначения: ПН – поверхностное натяжение, МН – межфазное натяжение (против гексадекана), E<sub>24</sub> – индекс эмульгирования.

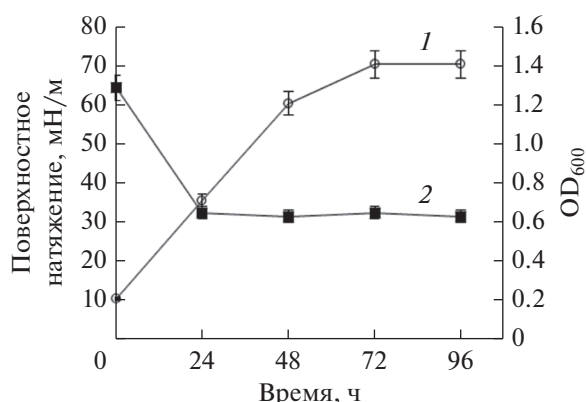
парафинах (табл. 1), позволяет предварительно отнести синтезируемые биосурфактанты к разным типам. Например, после отделения клеток *G. cholesterolivorans* S12 в супернатанте отмечено резкое снижение эмульгирующей активности с 50% до 0, которое коррелирует с повышением поверхностного (с 43.5 до 53.9 мН/м) и межфазного натяжения (с 5.0 до 22.0 мН/м), что может свидетельствовать об образовании гордонией био-ПАВ, связанных с клетками. *R. qingshengii* 367-6 и *D. maris* 367-2 тоже, по-видимому, синтезируют ПАВы эндо-типа, что характерно для большинства актиномицетов (Sutcliff, 1998).

Отметим, что поверхностное натяжение культуральной жидкости, супернатанта и собственно биомассы грамотрицательной бактерии *A. seifertii* WS-1 после роста на жидких парафинах характеризовалось близкими значениями параметра, в то время как высокая эмульгирующая активность (50%) была ассоциирована исключительно с

клетками и падала до нуля в бесклеточном экстракте (табл. 1). Полученные результаты могут свидетельствовать о синтезе этой культурой биосурфактантов эндо- и экзо-типов, причем первый отличается значительной эмульгирующей активностью.

Что касается второй исследуемой грамотрицательной бактерии, *P. extremaustralis* WS-1, то определенное выводу относительно принадлежности синтезируемых ею био-ПАВ к конкретному типу пока делать рано. Необходимы дальнейшие исследования.

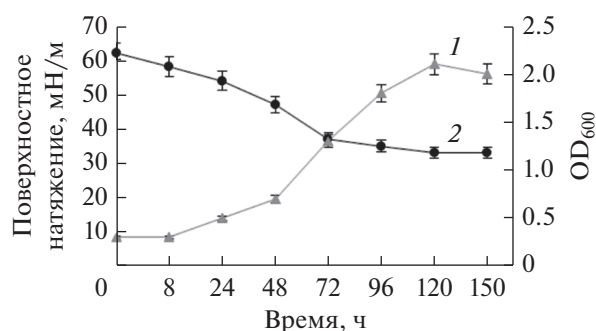
Нами прослежено образование био-ПАВ в динамике бактериями *A. seifertii* WS-1 и *D. maris* 367-2 (рис. 2 и 3 соответственно) в минеральной среде “М” с *n*-додеканом в качестве источника углерода и энергии. Вслед за инокуляцией среды культурой *A. seifertii* WS-1 поверхностное натяжение культуральной жидкости резко падало, достигая минимальных значений параметра (около 30 мН/м) в



**Рис. 2.** Образование биосурфактанта в процессе роста *A. seifertii* WS-1 в минеральной среде с *n*-додеканом в динамике. Обозначения: 1 – рост штамма; 2 – поверхностное натяжение.

экспоненциальной фазе роста, после 24 ч культивирования штамма (рис. 2). При дальнейшей инкубации значительных изменений величины этого параметра не наблюдалось. Что касается *D. maris* 367-2, то и в этом случае синтез биосурфатанта из *n*-додекана происходил в основном в экспоненциальную фазу роста культуры, но максимум снижения поверхностного натяжения приходился на 72 ч культивирования (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что био-ПАВ образуется как первичный метаболит, сопровождающий рост клеточной биомассы. Это позволяет предположить возможность эффективного синтеза биосурфактанта в условиях хемостата или иммобилизованными клетками бактерий.

Как известно, наиболее эффективные биосурфактанты снижают поверхностное натяжение воды с 72 до 28–24 мН/м (Cooper, Goldenberg, 1987; Morikawa et al., 1993). Перспективными продуцентами ПАВ считаются микроорганизмы, снижающие поверхностное натяжение культуральной среды более чем на 10 мН/м (Francy et al., 1991) или примерно до 35–30 мН/м (Desai, Banat, 1997). В настоящей работе определяли потенциальную сурфактантную активность исследуемых штаммов-деструкторов; задача оптимизировать состав среды и условия инкубации культур с целью максимального улучшения функциональных характеристик и интенсификации синтеза био-ПАВ не ставилась. Тем не менее продуцируемые ими биосурфактанты обладали выраженными поверхностными и межфазными свойствами, не уступая по этим параметрам известным продуцентам микробных ПАВ.



**Рис. 3.** Рост и образованием био-ПАВ в процессе культивирования штамма *D. maris* 367-2 в среде с *n*-додеканом. Обозначения: 1 – рост штамма; 2 – поверхностное натяжение.

### Особенности биодегradации нефтяных углеводов исследуемыми штаммами УОБ

**Биодеструкция нефти.** Способность УОБ утилизировать нефтяные углеводороды делает их перспективными кандидатами для очистки загрязненных местообитаний. Как видно из сравнения хроматограмм алифатической фракции нефти МНПЗ после биодегradации ее исследуемыми штаммами (рис. S3a–S3д) и контрольного образца без микроорганизмов (рис. S3е), они существенно различались между собой. В табл. S5 представлены результаты обсчета полученной серии хроматограмм. Биодеструкция алканов за 5 сут культивирования составила от 85 до 91% (для *P. extremaustralis* WS-1 и *D. maris* 376-2 соответственно). Деструкция *n*-алканов приближалась к 100%, а деструкции *изо*-алканов достигала 26–47%.

Следует отметить, что способность исследованных бактерий утилизировать *изо*-алканы разного молекулярного веса и степени разветвленности одновременно с *n*-алканами важна для очистки объектов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, в которых, как правило, представлены оба типа углеводородов. Наши данные могут быть полезны в контексте биоремедиации, для интерпретации и прогнозирования деструкции углеводородов этими штаммами.

Дальнейшие исследования особенностей биодегradации углеводородов проводили с четырьмя штаммами, наиболее активными в отношении утилизации нефти, исключив из экспериментов *P. extremaustralis* WS-1.

**Потребление индивидуальных *n*-алканов модельной смеси № 1.** Сложность и непостоянство химической структуры нефтяных смесей может маскировать изменения входящих в их состав углеводородов под влиянием УОБ. Для расшифровки последовательности и особенностей биодеструкции конкретных детектируемых соединений исполь-

**Таблица 2.** Степень деструкции (%) *n*-алканов модельной смеси № 1 культурами микроорганизмов

<i>n</i> -Алкан	<i>A. seifertii</i> WS-1	<i>D. maris</i> 367-2	<i>G. cholesterolivorans</i> S12	<i>R. qingshengii</i> 367-6
C <sub>10</sub>	97 ± 2	100	91 ± 5	77 ± 5
C <sub>11</sub>	93 ± 4	96 ± 4	65 ± 3	57 ± 4
C <sub>12</sub>	95 ± 3	97 ± 2	22 ± 1	56 ± 3
C <sub>13</sub>	98 ± 1	100	22 ± 1	81 ± 6
C <sub>14</sub>	100	100	53 ± 2	83 ± 2
C <sub>15</sub>	100	100	50 ± 4	81 ± 2
C <sub>16</sub>	100	100	37 ± 2	75 ± 4
C <sub>17</sub>	100	100	21 ± 1	43 ± 2
C <sub>21</sub>	100	100	14 ± 1	49 ± 2
C <sub>22</sub>	89 ± 5	100	2	42 ± 3
C <sub>23</sub>	87 ± 4	100	0	45 ± 2
C <sub>24</sub>	84 ± 2	100	0	46 ± 4
C <sub>25</sub>	76 ± 5	92 ± 3	0	37 ± 2
C <sub>26</sub>	59 ± 4	92 ± 6	0	28 ± 2
C <sub>27</sub>	41 ± 1	91 ± 5	0	22 ± 1
C <sub>28</sub>	19 ± 0	51 ± 5	0	19 ± 1
C <sub>29</sub>	2 ± 1	31 ± 2	0	2
C <sub>30</sub>	0	0	0	0
C <sub>31</sub>	0	0	0	0
C <sub>32</sub>	0	0	0	0
C <sub>33</sub>	0	0	0	0

В таблице приведены величины: среднее по результатам трех экспериментов ± стандартное отклонение (при наличии).

зовали модельные смеси углеводов разной степени сложности.

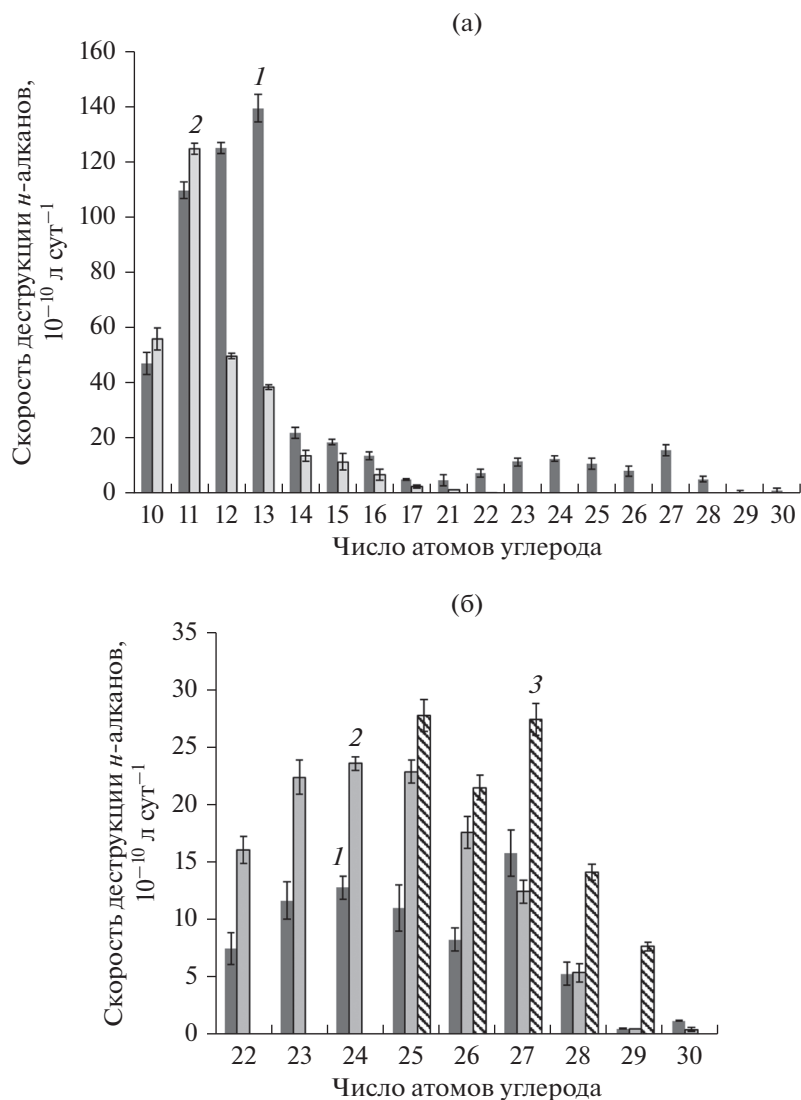
В табл. 2 представлены результаты биодegradации смеси № 1 после 48 ч инкубации с УОБ. Степень деструкции *n*-алканов состава C<sub>10</sub>–C<sub>17</sub>, C<sub>21</sub> выше 90% была зафиксирована для *A. seifertii* WS-1 и *n*-алканов C<sub>10</sub>–C<sub>17</sub>, C<sub>21</sub>–C<sub>27</sub> – для *D. maris* 367-2. Вероятно, аналогичным образом окислялись и C<sub>18</sub>–C<sub>20</sub> *n*-алканы, отсутствовавшие в смеси № 1. Следует отметить, что штаммы *G. cholesterolivorans* S12 и *R. qingshengii* 367-6 использовали *n*-алканы с заметно меньшей эффективностью. Последнее, по-видимому, не свидетельствует о более низкой углеводородокисляющей активности этих штаммов, а объясняется особенностями активации их ферментных систем в присутствии углеводов после культивирования на богатой среде LB. В других экспериментах, где в качестве инокулята служила биомасса УОБ со среды с углеводородами, углеводородокисляющая активность всех штаммов существенно не различалась. Кроме того, из сравнения данных экспериментов с использованием нефти и смеси № 1 можно заключить, что на показатели биодеструкции (степень и скорость

процесса) индивидуальных компонентов смеси влияет ее общий состав.

Разброс в степени биодegradации *n*-алканов позволил вычислить скорость окисления индивидуальных углеводов по убыли конкретного компонента (рис. 4). Корректными считали величины, полученные при условии, что остаточное содержание детектируемого *n*-алкана составляло не менее 8–10%, т.е. при отсутствии дефицита по субстрату. Более других этому условию отвечали результаты, полученные для *R. qingshengii* 367-6 и *G. cholesterolivorans* S12. Для этих штаммов были вычислены скорости деструкции в широком диапазоне C<sub>10</sub>–C<sub>29</sub> *n*-алканов (рис. 4а). Максимальная скорость деструкции отмечена для C<sub>10</sub>–C<sub>13</sub> *n*-алканов и составила 38.72–139.70 × 10<sup>-10</sup> л сут<sup>-1</sup>. В диапазоне C<sub>14</sub>–C<sub>29</sub> *n*-алканов скорость деструкции резко снижалась и варьировала в пределах 0.31–22.00 × 10<sup>-10</sup> л сут<sup>-1</sup>.

Аналогичные показатели были рассчитаны и для других культур, но для более узких интервалов длины углеродной цепи парафинов. На рис. 4б показано распределение величин скорости деструкции





**Рис. 4.** Скорость потребления *n*-алканов модельной смеси № 1 штаммами УОБ: а – *R. qingshengii* 367-6 и *G. cholesterolivorans* S12; б – *R. qingshengii* 367-6, *A. seifertii* WS-1 и *D. maris* 367-2. Обозначения: (а) 1 – *R. qingshengii* 367-6, 2 – *G. cholesterolivorans* S12; (б) 1 – *R. qingshengii* 367-6, 2 – *A. seifertii* WS-1, 3 – *D. maris* 367-2.

для *R. qingshengii* 367-6 в сравнении с *A. seifertii* WS-1 и *D. maris* 367-2 в диапазоне  $C_{22}$ – $C_{29}$  *n*-алканов.

Данные показывают, что биodeградация *n*-алканов разного молекулярного веса происходит одновременно, при этом существенно более высокая скорость окисления отмечается в диапазоне  $C_{10}$ – $C_{13}$  *n*-алканов. У разных штаммов УОБ наблюдается большой разброс скоростей окисления индивидуальных *n*-алканов. Например, в области длинноцепочечных *n*-алканов *D. maris* 367-2 лучше окисляет  $C_{23}$ – $C_{27}$  *n*-алканы, а *A. seifertii* WS-1 –  $C_{23}$ – $C_{25}$  *n*-алканы. По-видимому, подобные различия в метаболизме углеводов определяются индивидуальными особенностями конкретных штаммов УОБ.

**Углеводородокисляющая активность изучаемых штаммов УОБ в отношении мультиразветвленных алканов.** Биодеструкция *изо*-алканов – относительно малоизученный процесс. Некоторые микроорганизмы используют *изо*-алканы разного молекулярного веса и степени разветвленности в качестве единственного источника углерода и энергии (Chen et al., 2017), однако большинство к этому неспособно. Судьба углеводов в ходе биодеструкции зависит не только от биологических особенностей бактерий-деструкторов, но и от состава конкретного углеводородсодержащего субстрата. По данным (Marin et al., 1996), *n*-алканы ингибируют окисление *изо*-алканов, в то время как исследования других авторов (Solano-Serena et al., 2000) свидетельствуют об обратном. Так, показано (Rocha et al., 2011), что штамм *Pseudomonas*

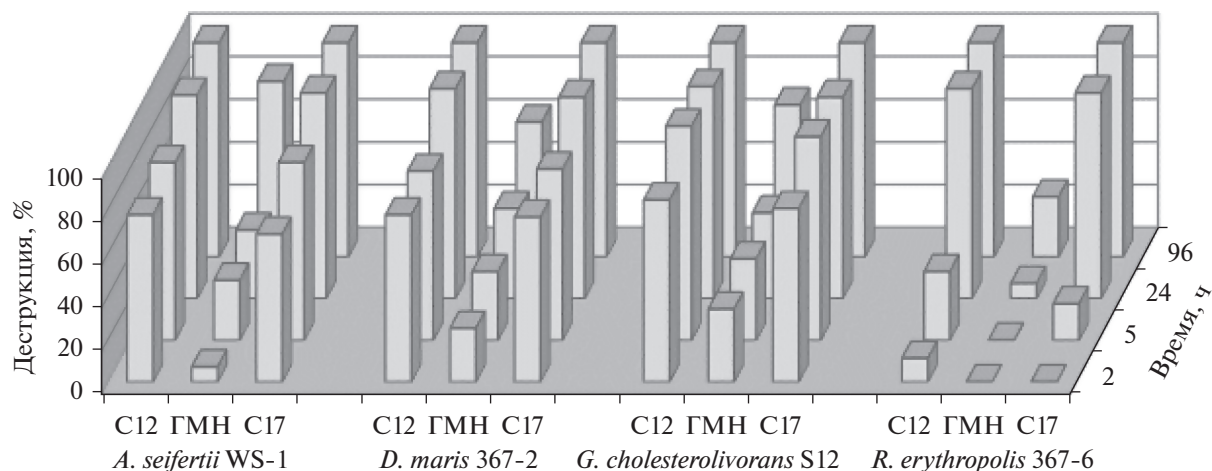


Рис. 5. Динамика потребления гептаметилнонана в модельной смеси углеводородов № 2. Бактерии культивировали на качалке (130 об./мин) при температуре 30°C и начальном значении pH 7.0. Обозначения: C12 – додекан, ГМН – гептаметилнонан, C17 – гептадекан.

*aeruginosa* ATCC 55925 не использовал пристан (2,6,10,14-тетраметилпентадекан) как индивидуальное соединение или в смеси с  $C_7$ – $C_{18}$  *n*-алканами, но демонстрировал такую способность, когда углеводороды были диспергированы в водной фазе с помощью биосурфактанта. В то же время пристан, как компонент топочного мазута, частично подвергался биоразрушению и без биосурфактанта.

В силу особенностей химического строения многие *изо*-алканы труднее поддаются биодеструкции по сравнению с нормальными парафинами, могут накапливаться в биосфере и являться остаточными загрязнителями после биоремедиации (Nocentini et al., 2000). Поэтому способность микроорганизмов разрушать сильно разветвленные алканы в составе смесей и как индивидуальные соединения представляет значительный интерес. На разнице скоростей потребления изопреноидов и насыщенных алканов основано широкое использование в органической геохимии нефти величины отношения суммарного содержания *изо*- $C_{19}$  + *изо*- $C_{20}$  (пристан + фитан) к суммарному содержанию *n*- $C_{17}$  + *n*- $C_{18}$  (гептадекан + октадекан). Этот диагностический показатель характеризует степень биодеструкции нефти. В то же время биодеструкция *изо*-алканов более разветвленных или более тяжелых, чем указанные выше, исследована недостаточно. Это побудило нас к экспериментам с ГМН и скваланом, которые, в силу устойчивости к микробному воздействию, нередко используются как внутренний стандарт в хроматографическом анализе при изучении биодegradации или в качестве инертных растворителей (носителей), повышающих биодоступность целевых углеводородов.

Проведено исследование окисления ГМН в качестве единственного субстрата исследуемыми

штаммами УОБ, и анализ проб, отобранных после 48 и 96 ч культивирования, продемонстрировал отсутствие его потребления микроорганизмами. Следует отметить, что и в долгосрочных экспериментах (более 12 сут культивирования) роста бактерий в среде с ГМН не было отмечено (табл. S2).

В другой серии экспериментов исследовали способность культур микроорганизмов использовать ГМН в составе композиции с *n*-алканами (смесь № 2), близкими по длине углеродной цепи (додекан, *n*- $C_{12}$ ) или по молекулярному весу (гептадекан, *n*- $C_{17}$ ). Для всех четырех штаммов скорость потребления додекана и гептадекана была высокой: содержание *n*-алканов снижалось практически до 0 в течение 24 ч культивирования (рис. 5). ГМН использовался бактериями медленнее, чем *n*-алканы, но по мере потребления последних (94–98% через 1 сут) степень его деструкции существенно возрастала: с 32 до 82% для *A. seifertii* WS-1, с 40 до 71% – для *G. cholesterolivorans* S12, с 7 до 28% – для *R. erythropolis* 367-6 и с 42 до 63% – для *D. maris* 367-2 за 4 сут. Скорости окисления ГМН бактериями *A. seifertii* WS-1, *D. maris* 367-2 и *G. cholesterolivorans* S12 были близки, тогда как для *R. qingshengii* 367-6 она была минимальной. Для исследуемых УОБ необходимым условием активации метаболизма ГМН было присутствие *n*-алканов.

Продолжительное культивирование со скваланом в качестве единственного субстрата сопровождалось медленным ростом УОБ и изменением реологических свойств культуральных жидкостей (табл. 2 и табл. S4), при этом деструкция субстрата бактериями *R. qingshengii* 367-6, *G. cholesterolivorans* S12, *D. maris* 367-2 и *A. seifertii* WS-1 составляла, соответственно, 8, 10, 12 и 15% после 30 сут культивирования.



Таблица 3. Биодegradация индивидуальных углеводов модельной смеси № 3 исследуемыми бактериями

Время культивирования, ч	Степень деструкции <i>n</i> -алканов и сквалана, %								
	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>15</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>17</sub>	Сквалан
<i>A. seifertii</i> WS-1									
24	100	86 ± 5	67 ± 3	59 ± 3	55 ± 2	55 ± 5	56 ± 3	60 ± 3	34 ± 2
48	100	100	100	100	100	100	100	100	61 ± 2
72	100	100	100	100	100	100	100	100	68 ± 4
144	100	100	100	100	100	100	100	100	68 ± 3
<i>G. cholesterolivorans</i> S12									
24	100	100	88 ± 4	84 ± 6	74 ± 5	66 ± 3	71 ± 4	75 ± 4	22 ± 2
48	100	100	100	100	100	100	100	100	44 ± 3
72	100	100	100	100	100	100	100	100	47 ± 4
144	100	100	100	100	100	100	100	100	48 ± 2
<i>R. qingshengii</i> 367-6									
24	100	83 ± 4	62 ± 2	66 ± 4	64 ± 2	60 ± 3	85 ± 4	67 ± 2	26 ± 2
48	100	100	94 ± 5	92 ± 6	92 ± 4	87 ± 4	99 ± 1	99 ± 1	55 ± 4
72	100	100	100	100	100	100	100	100	57 ± 2
144	100	100	100	100	100	100	100	100	58 ± 3
<i>D. maris</i> 367-2									
24	100	78 ± 3	32 ± 3	5 ± 1	0	0	0	0	0
48	100	100	84 ± 3	68 ± 3	55 ± 1	51 ± 2	44 ± 2	52 ± 3	47 ± 1
72	100	100	100	94 ± 5	94 ± 3	92 ± 3	95 ± 4	96 ± 2	49 ± 2
144	100	100	100	100	100	100	100	100	51 ± 4

Результаты изучения биодegradации сквалана в составе композиции с C<sub>10</sub>–C<sub>17</sub> *n*-алканами (смесь № 3) представлены в табл. 3. Динамика процесса была сходной для всех исследованных УОБ; различия в основном касались скорости окисления *n*-алканов, которая была максимальной у *A. seifertii* WS-1. Окисление сквалана происходило с меньшей скоростью, но одновременно с окислением *n*-алканов и сильно тормозилось после полного потребления нормальных парафинов. Следует отметить, что деструкция сквалана в составе углеводородной смеси была значительно эффективнее (48–68% для разных штаммов за 6 сут), чем когда он служил единственным источником углерода и энергии (не более 15% за 30 сут). Эти результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения процесса биодеструкции сквалана у исследованных штаммов-деструкторов, в том числе путем анализа разнообразия генов, присутствующих в геномах этих бактерий и обеспечивающих способность к дегradации алканов, а также их избирательной транскрипции в зависимости от условий роста и наличия дополнительных углеводородных субстратов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что известные таксоны родового уровня, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Gordonia* и *Dietzia*, к

которым принадлежат исследованные штаммы, могут быть источником новых эффективных нефте-деструкторов и продуцентов биосурфактантов. По совокупности характеристик: способности к дегradации широкого спектра нормальных и *изо*-алканов, высокому адаптивному потенциалу к факторам внешней среды, способности образовывать био-ПАВ, – бактерии *A. seifertii* WS-1, *P. extremaustralis* WS-1, *R. qingshengii* 367-6, *G. cholesterolivorans* S12, *D. maris* 367-2 могут рассматриваться как перспективные кандидаты для очистки загрязненных нефтью и нефтепродуктами почвенных и водных объектов. Изученные штаммы пригодны для использования в условиях умеренных и пониженных (6–10°C) температур, при содержании NaCl в среде до 4% и pH в диапазоне 5.0–9.0. Окончательный вывод об эффективности, целесообразности и безопасности их практического применения в целях биоремедиации можно будет сделать на основании результатов дополнительных исследований. В этой связи следует изучить влияние сурфактантной активности штаммов на дегradацию нефти из почвы. Также представляет интерес интенсификация процесса окисления углеводов путем создания микробных ассоциаций на основе исследованных культур УОБ и посредством иммобилизации живых клеток-деструкторов на ор-

ганических носителях. Кроме того, необходимо исключить наличие среди штаммов-деструкторов патогенных и условно патогенных представителей, поскольку последние имеют ограниченное практическое использование.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-05009 МК) и Министерства науки и высшего образования РФ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванова А.Е., Соколова Д.Ш., Канатьева А.Ю. Биодegradация углеводородов и образование поверхностно-активных соединений ацидофильными микобактериями // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 300–308.
- Ivanova A.E., Sokolova D.Sh., Kanat'eva A.Yu. Hydrocarbon biodegradation and surfactant production by acidophilic mycobacteria // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 317–324.
- Иванова А.Е., Борзенков И.А. Аэробная биодegradация компонентов сырой нефти ацидофильными микобактериями // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 344–355.
- Ivanova A.E., Borzenkov I.A. Aerobic biodegradation of crude oil components by acidophilic mycobacteria // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 453–462.
- Berekaa M.M., Steinbüchel A. Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 4462–4467.
- Binazadeh M., Karimi I.A., Li Z. Fast biodegradation of long chain *n*-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449 // Enzyme Microb. Technol. 2009. V. 45. P. 195–202.
- Bogan B.W., Sullivan W.R., Kayser K.J., Derr K.D., Aldrich H.C., Paterek J.R. *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 1389–1395.
- Cooper D.G., Goldenberg D.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 50. P. 520–529.
- Chen W., Li J., Sun X., Min J., Hu X. High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium *Dietzia* species CN-3 // Int. Biodeter. Biodegr. 2017. V. 118. P. 110–118.
- Desai J.D., Banat I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. P. 47–64.
- Francy D.S., Thomas J.M., Raymond R.L., Ward C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria // J. Ind. Microbiol. 1991. V. 8. P. 237–245.
- Guo C., Dang Y., Wong Y., Tam N.F. Biodegradation ability and dioxygenase genes of PAN-degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments // Int. Biodeter. Biodegr. 2010. V. 64. P. 419–426.
- Kumar A., Bisht B.S., Joshi V.D., Dhewa T. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool // Int. J. Environ. Sci. 2011. V. 1. P. 1079–1093.
- Lal B., Khanna S. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alkaligenes odorans* // J. Appl. Bacteriol. 1996. V. 81. P. 355–362.
- Morikawa M., Daido H., Takao T., Murata S., Shimonishi Y., Imanaka T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38 // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 6459–6466.
- Nocentini M., Pineli D., Fava F. Bioremediation of a soil contaminated with hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem // Chemosphere. 2000. V. 41. P. 1115–1123.
- Pfennig N., Lippert K.D. Über das vitamin B<sub>12</sub> – Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien // Arch. Microbiol. 1966. V. 55. P. 245–256.
- Rayu S., Karpouzias D.G., Singh B.K. Emerging technologies in bioremediation: constraints and opportunities // Biodegradation. 2012. V. 23. P. 917–926.
- Rocha C.A., Pedregosa A.M., Laborda F. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925 // AMB Express. 2011. V. 1. Art. 9. <https://doi.org/10.1186/2191-085-1-9>
- Solano-Serena F., Marchal R., Casaregola S., Vasnier C., Lebeault J.-M., Vandecasteele J.-P. *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 2392–2399.
- Sutcliff I.C. Cell envelope composition and organization in the genus *Rhodococcus* // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V. 74. P. 49–58.
- Wang X.-B., Chi C.-Q., Nie Y., Tang Y.-Q., Tan Y., Wu G., Wu X.-L. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. P. 7755–7761.
- Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Liang P., Gao X., Li F., Li H., Yu H. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis // Front. Microbiol. V. 9. Art. 2885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>
- Zhang Z.Z., Hou Z.W., Yang C.Y., Ma C.Q., Tao F., Xu P. Degradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8 // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. P. 4111–4116.

## Catabolic Potential and Surfactant Activity of Halotolerant Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria

A. E. Ivanova<sup>1,\*</sup>, I. A. Borzenkov<sup>1</sup>, and D. Sh. Sokolova<sup>1</sup>

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

\*e-mail: a.e.ivanova@mail.ru

Received November 24, 2020; revised February 27, 2021; accepted March 2, 2021

**Abstract**—The hydrocarbon-oxidizing potential, ability to synthesize biosurfactants, and resistance to ecologically significant factors were studied for the following previously isolated degrader strains: *Acinetobacter seifertii* WS-1, *Pseudomonas extremaustralis* WS-1, *Dietzia maris* 367-2, *Rhodococcus qingshengii* 367-6, and *Gordonia cholesterolivorans* S12. The studied strains were able to act as hydrocarbon degraders at moderate (25–37°C) and low (6–10°C) temperatures, within broad ranges of pH (4.0–11.5) and salinity (0–9%). Apart from individual *n*-alkanes, they efficiently degraded oil (85–91% of the aliphatic fraction after 5 days). Depending on the culture, biodegradation varied from 96 to 100% for C<sub>10</sub>–C<sub>29</sub> *n*-alkanes and from 26 to 47% for C<sub>14</sub>–C<sub>20</sub> *iso*-alkanes. The rates of hydrocarbon consumption and substrate preferences of the strains were studied using a model mixture of C<sub>10</sub>–C<sub>33</sub> *n*-alkanes. Metabolism of multibranched alkanes, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) and squalane (C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>, 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane), which are usually resistant to biodegradation, was activated in the presence of *n*-alkanes, while *iso*-alkanes were consumed simultaneously with *n*-alkanes, albeit at a lower rate. The rate of squalane oxidation decreased after complete elimination of *n*-alkanes, while active HMN biodegradation continued. The strains utilized 48–68% squalane in 6 days and 28–82% HMN in 4 days. While HMN could not be used as the sole carbon and energy source by the studied strains, prolonged cultivation (30 days) with squalane resulted in a drastic decrease of surface and interfacial tensions, poor bacterial growth, and consumption of up to 15% of the hydrocarbon. All studied degrader strains were shown to produce surface-active compounds (SAC). Hydrophobic substrates (liquid paraffins, squalane, and olive oil) induced production of SAC with a pronounced surfactant activity, which decreased the interfacial and surface tensions to their minimal values of 2.0 and 27.2 mN/m, respectively, while water-soluble carbon sources (ethanol, benzoate, and phenol) induced production of emulsifying agents. Emulsifying activity was found in some strains, only on certain substrates, and did not exceed 50%. High metabolic and adaptive potential of the studied strains may be used for bioremediation of oil-contaminated objects.

**Keywords:** hydrocarbon-oxidizing bacteria, hydrocarbon, heptamethylnonane, squalane, bio-SAC, surface and interfacial tensions

## СРАВНЕНИЕ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СОСТАВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОБРАСТАНИЙ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ НА ПОВЕРХНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ В ВОДНЫХ СРЕДАХ<sup>1</sup>

© 2021 г. Т. П. Турова<sup>а, \*</sup>, Д. Ш. Соколова<sup>а</sup>, Т. Н. Назина<sup>а</sup>, А. Б. Лаптев<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное унитарное предприятие “Всероссийский научно-исследовательский институт авиационных материалов”, Москва, 105005 Россия

\*e-mail: [tpour@rambler.ru](mailto:tpour@rambler.ru)

Поступила в редакцию 29.12.2020 г.

После доработки 12.02.2021 г.

Принята к публикации 05.03.2021 г.

Целью работы являлось выявление потенциальных деструкторов полиэтилентерефталата (ПЭТ), полистирола (ПС) и стали 20 на основании сравнения таксономического состава сообществ бактериальных обрастаний на образцах этих материалов, помещенных в водные среды различного происхождения (морские, природные пресные и промышленные) в разных климатических регионах. Полученные методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рНК библиотеки группировались, преимущественно, согласно типам водных сред. При этом состав и количественное соотношение таксонов, как на уровне филумов/классов, так и на родовом уровне заметно различались для каждой из групп полученных библиотек, а внутри групп менялись в основном в зависимости от времени экспозиции, в промышленной воде – от проведения антимикробной обработки и, в меньшей степени, от типа материала образцов. Полученные результаты позволили предположить, что промышленная оборотная вода является более агрессивной средой по отношению к полимерным материалам, а потенциальные штаммы-деструкторы полимеров (ПЭТ и ПС) могут быть обнаружены среди представителей родов *Pseudomonas*, *Acidovorax* и *Arenimonas*. В морской воде в биокоррозии стали наиболее вероятно участвуют представители серо- и железоокисляющих бактерий родов *Sulfurimonas* и *Mariprofundus*.

**Ключевые слова:** полиэтилентерефталат, ПЭТ, полистирол, ПС, сталь, СТ, биodeградация, биокоррозия, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рНК

**DOI:** 10.31857/S0026365621040182

В настоящее время созданы полимерные материалы, максимально стойкие в различных агрессивных средах, что обуславливает необходимость разработки методов их утилизации с наименьшим ущербом для окружающей среды. Полиэтилентерефталат (ПЭТ) и полистирол (ПС) наиболее широко производятся и используются в Европе и мире и составляют значительную часть твердых бытовых отходов на суше и основную массу загрязнителей в морских экосистемах. Отмечена тенденция перехода большинства предприятий на “экологически чистую” биологическую утилизацию отходов. Основой таких очистных сооружений являются бактериальные сообщества, которые с течением времени эволюционируют и приспосабливаются к использованию различных химических соеди-

нений из отходов предприятий, в том числе, и синтетических полимеров. При этом микроорганизмы-биодеструкторы в сточных водах не учитываются и сливаются в реки в неограниченном количестве. В частности, в результате исследования состава микробных сообществ в 250 образцах природных и антропогенных сред обитания, включая почву, осадки водоемов и промышленные стоки, первая и пока единственная бактерия-деструктор ПЭТ *Ideonella sakaiensis* была выделена японскими учеными именно из активного ила предприятия по переработке пластиковых бутылок (Yoshida et al., 2016). С экологической точки зрения, такие штаммы микроорганизмов-биодеструкторов можно эффективно использовать для утилизации бытовых отходов и промышленных изделий из пластических материалов, загрязняющих окружающую среду. Но с технологической точки зрения, для обеспечения длительных сроков эксплуатации конструкций и изделий из полимерных материалов необ-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621040182 для авторизованных пользователей.

ходимо предусмотреть меры по контролю за их использованием в потенциально агрессивных средах.

Устойчивость полимеров к биодegradации зависит от различных факторов: типа, химической структуры и физического состояния полимеров, а также физико-химических условий среды, в которой они эксплуатируются. Полимеры с гидролизующими химическими связями в основной цепи, такие как ПЭТ, более подвержены биодegradации (Webb et al., 2013), чем такие как ПС, в структуре которого отсутствуют гидролизующие функциональные группы (Kueger et al., 2017). В частности, не было обнаружено никаких признаков разрушения ПС-листа, закопанного в почве в течение 32 лет (Otake et al., 2020). Однако вспененный ПС может подвергаться интенсивной биодegradации с участием симбиоза личинок насекомого *Tenebrio molitor* Linnaeus и выделенного из их желудка штамма-деструктора ПС *Exiguobacterium* sp. YТ2 (Yang et al., 2015).

В водных системах на поверхности погруженных материалов и конструкций неизбежно образуются микробные биопленки. Биопленки усиливают микробную активность, защищают микроорганизмы от ультрафиолета, радиации, высокой солености, тяжелых металлов и антибиотиков (de Carvalho et al., 2018). Однако пока отсутствует понимание, чем в большей степени определяется состав формирующихся биопленок — физико-химическими факторами и микрофлорой окружающей водной среды или свойствами экспонируемых материалов. Имеющиеся в научной литературе данные, полученные в результате изучения биопленок, развивающихся на различных материалах в водных средах, пока не позволяют однозначно ответить на этот вопрос. В частности, было установлено, что микробные скопления на пластике и стекле при экспозиции в Северном море в течение 6 недель формировались в основном под влиянием сезонных и географических факторов, а не в зависимости от поверхностных свойств материала (Oberbeckmann et al., 2018). Обнаружено, что основным фактором, влияющим на микробные сообщества, развивающиеся на различных природных и искусственных материалах в пресных водах, загрязненных антропогенным мусором, является место отбора пробы; при этом, однако, существуют некоторые различия между составом биопленок в зависимости от типа субстрата (Hoellein et al., 2014). Недавно было показано, что состав бактериальных сообществ на поверхности двух типов микропластика и древесных частиц больше зависит от места экспозиции в Северном море, чем от типа материала, но в то же время значительно отличается от состава сообществ сестона (естественной взвеси микрочастиц) и свободноживущих сообществ (Keszy et al., 2019). Аналогично обнаружены различия в таксономиче-

ском составе бактериальных сообществ с образцов взвеси микропластика и сообществ сестона, а также свободноживущих сообществ в западной части Средиземноморского бассейна, при этом были выявлены специфичные для микропластика филоотипы бактерий (Dussud et al., 2018).

В наших предыдущих работах было показано заметное влияние типа водной среды обитания на состав сообществ микробных обрастаний, развивающихся на образцах ПЭТ (Турова и соавт., 2020) и ПС (Турова et al., 2020), помещенных в водные среды различного происхождения (морские, природные пресные и промышленные) в разных климатических регионах.

Для обнаружения возможных микроорганизмов-биодеструкторов необходимы сравнительные комплексные исследования распространенности тех или иных микроорганизмов в разных средах, их способности к деструкции различных материалов, включая полимерные, а также путей распространения в окружающей среде микроорганизмов, наиболее агрессивных к материалам технологических конструкций.

Целью работы являлось выявление потенциальных деструкторов полиэтилентерефталата (ПЭТ), полистирола (ПС) и стали 20 (СТ) на основании сравнения таксономического состава сообществ микробных обрастаний на образцах этих материалов, помещенных в водные среды различного происхождения (морские, природные пресные и промышленные) в разных климатических регионах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Подготовка образцов.** Для сравнительного анализа использовали следующие материалы: полиэтилентерефталат (ПЭТ) (ГОСТ Р 51695-2000) — распространенный полимерный материал, как широко используемый для изготовления некоторых промышленных конструкций, так и наиболее интенсивно загрязняющий окружающую среду; полистирол (ПС) (ГОСТ 20282-86) — стойкий к химическим воздействиям и биоповреждениям полимер, широко применяемый как для изготовления бытовых изделий, так и в промышленных конструкциях; сталь 20 (СТ) (ГОСТ 1050-2013) — наиболее распространенный материал для изготовления несущих конструкций, трубопроводов и метизов.

Специально подготовленные образцы материалов размером 100 × 10 × 2 мм помещали в водные среды на глубину 1 м в разных климатических регионах России. В г. Геленджик образцы экспонировали в соленой морской воде в прибрежной зоне Черного моря в естественных природных условиях (группа “Marine”); в Подмоскowie (г. Можайск) образцы помещали в пресноводное Можайское водохранилище в районе д. Горетово (группа

“Fresh”). Все образцы группы “Fresh” экспонировали 10 сут, а образцы группы “Marine” экспонировали 10, 20, 40 и 60 сут (ПЭТ и СТ) и 10, 40, 60 сут (ПС).

В г. Уфа образцы помещали в водоблоки с пресной оборотной охлаждающей водой промышленного назначения завода “Уфаоргсинтез” (группа “Industrial”). Образцы этой группы экспонировали 10, 20, 40 и 60 сут. Особенности охлаждающей воды являются незначительно изменяющаяся температура, недостаток освещенности и периодическое насыщение солями (в основном, хлоридами и сульфатами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ), продуктами нефтепереработки, а также взвешенными неорганическими и органическими частицами, которые являются благоприятной средой для развития микроорганизмов. Кроме того, на заводском водоблоке для корректировки роста микроорганизмов используется обработка химическими антимикробными реагентами. При превышении численности микроорганизмов в воде свыше  $10^5$  кл./мл подается 10%-ный щелочной раствор гипохлорита натрия, который обладает антисептическим и дезинфицирующим действием и широко используется в качестве бытового и промышленного дезинфектанта, средства очистки и обеззараживания воды. Такая обработка производилась примерно на 17–19 сут экспозиции образцов.

**Химический состав водных сред** определяли с помощью Biotronic ion хроматографа. Соленость, общую жесткость и общее содержание  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  определяли с использованием, соответственно, Aquamerck alkalinity analytic kit, Aquamerck Total Hardness kit и Iron Test kit (“Merck”, Darmstadt, Германия). Значение pH определяли с использованием Anion ionometer (Новосибирск, Россия) с соответствующими электродами. Определение индекса химического потребления кислорода (ХПК) производили согласно ГОСТ 31859-2012 (Российский Госстандарт) с использованием стандартных процедур. Измерения проводились в 3-х повторностях.

**Выделение ДНК, высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК и подготовка их к анализу** были проведены, как описано ранее (Турова и соавт., 2020).

**Анализ библиотек фрагментов гена 16S рРНК.** Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК бактериальных сообществ анализировали с использованием онлайн-ресурсов SILVA (<https://www.arb-silva.de/ngs/>) и RDP (<http://pyro.cme.msu.edu>). Для анализа библиотек последовательности предварительно объединяли в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с уровнем сходства 97%. Неидентифицированные последовательности (риды) и единичные риды (синглтоны), представленные только в одной из анализируемых библиотек, были исключены из дальнейшего анализа. Ин-

дексы разнообразия были рассчитаны с использованием программы EstimateS (<http://purl.oclc.org/estimates>). Для создания диаграмм Венна использовали онлайн-ресурс InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net>). Онлайн-ресурс ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) был использован для создания графика Principal Component Analysis (PCA) и тепловых карт (Heatmaps) членов сообщества на родовом уровне. Для определения таксонов-маркеров, различающих библиотеки согласно применяемым параметрам сравнения (тип материала образцов и характер среды экспозиции), был использован метод эффекта размера в линейном дискриминантном анализе (Linear discriminant analysis effect size method, LEfSe) (Segata et al., 2011) на основании таблицы относительной представленности ОТЕ в сравниваемых библиотеках. Использовали настройки параметров по умолчанию с минимальным значением размера 4.0 и применением стратегии сравнения “всех-против-всех” (all-against-all).

**Микроскопические методы.** При исследовании бактериальных обрастаний и поверхности образцов ПЭТ применяли сканирующий микроскоп TESCAN VEGA 3 XMU (Чехия) и систему энергодисперсионного микроанализа (ADVANCED AZTEC Energy, включая Inca Energy 350) на базе безазотного энергодисперсионного детектора X-MAX 50 STANDARD (“Oxford Instruments NanoAnalysis”, Великобритания).

**Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК бактерий** из микробных обрастаний образцов, полученные в результате секвенирования, депонированы в NCBI SRA под номерами PRJNA545821 (ПЭТ), PRJNA613231 (ПС) и PRJNA660935 (СТ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Физико-химические условия водных сред.** Физико-химические условия в местах экспозиции образцов материалов приведены в табл. 1. Общая соленость и жесткость оборотной воды нефтехимического предприятия превышали аналогичные показатели пресной воды Можайского водохранилища, но были значительно ниже соответствующих значений морской воды. В местах экспозиции образцов в море и в пресноводном водоеме изменения температуры определялись суточными колебаниями и были в интервале значений температуры промышленной оборотной воды. Величины солености, жесткости и химического потребления кислорода (ХПК) промышленной воды в ходе эксперимента снижались, вероятно, в результате циклической очистки оборотных вод от вредных примесей в этот период, связанной с разбавлением их чистой водой согласно технологическому протоколу. Величина pH пресной воды составляла 7.4, а пробы промышленной и морской воды были более щелочными (pH 7.8–8.5).

**Таблица 1.** Химический состав промышленной оборотной, морской и природной пресной воды, в которой экспонировали образцы

Местообитание/время экспозиции	Общая соленость, мг/л	pH	Температура воды, °С	Жесткость общая, мг-экв/л	Железо общее, мг/л	Щелочность общая, мг-экв/кг	ХПК*, мг O <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>
Промышленная вода							
10 сут	1098	8.5 ± 0.1	24.0–27.0	13.8	0.45	6.4	101
20 сут	1100	8.5 ± 0.1	21.5–25.5	12.6	0.37	6.5	103
40 сут	918	8.4 ± 0.1	19.0–23.0	9.8	0.21	4.3	72
60 сут	676	8.1 ± 0.1	14.0–18.0	6.7	0.61	2.4	90
Черное море**, образцы 10–60 сут	18600	7.8 ± 0.1	26.8–24.1	66.9	Нд***	Нд	Нд
Пресная вода, 10 сут	90–500	7.4 ± 0.1	17–23	4.3	Нд	Нд	Нд

\* ХПК – химическое потребление кислорода.

\*\* Сведения о составе морской воды, приведены для начальной точки экспозиции.

\*\*\* Нд – нет данных.

**Статистический анализ.** В результате применения высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК были получены библиотеки фрагментов гена 16S рРНК для каждой из 26 проб бактериальных обрастаний на подложке исследуемых материалов. Общее количество последовательностей (ридов) для 26 библиотек после исключения неидентифицированных ридов и синглтонов составило 828 925, из которых было сформировано 10214 ОТЕ (филотипов) с уровнем сходства последовательностей  $\geq 97\%$ .

Уровень покрытия для всех библиотек составлял  $>97\%$ , что подтверждало их репрезентативность. Об этом же свидетельствовали низкие значения индексов Chao1 (табл. 2). Индексы разнообразия различались для библиотек из разных мест экспонирования образцов. Для библиотек, полученных из образцов, экспонировавшихся в воде Черного моря и в природной пресной воде Можайского водохранилища, индексы разнообразия Шеннона–Уивера и Симпсона оказались высокими, а индексы доминирования Бергера–Паркера, наоборот, низкими. При этом в морской воде наибольшее разнообразие на образцах пластика наблюдалось на начальной стадии экспозиции (10 сут), а на образцах стали на следующей стадии (20 сут) с постепенным снижением к окончанию экспозиции. Для образцов, экспонировавшихся в пресной промышленной оборотной воде, варьирование индексов разнообразия и доминирования было выражено значительно сильнее, причем в некоторых случаях разнонаправленно для различных материалов. Так, на стадии 20 сут, т.е. после проведения антимикробной обработки, для образцов ПЭТ индексы разнообразия существенно падали, а индекс доминирования, соответственно, возрастал. И наоборот, для образцов ПС на этом же этапе индексы разнообразия резко вырастали, а индекс доминирова-

ния падал. Для образцов СТ прослеживалась аналогичная тенденция, но менее резко выраженная. При этом в группах “Industrial” и “Marine” к окончанию экспозиции индексы разнообразия становились ниже, а индекс доминирования выше их максимального и минимального значений соответственно, что свидетельствовало о постепенном действии отбора специфической микрофлоры в обрастаниях.

**Таксономический состав сообществ бактерий на исследуемых образцах на уровне филумов/классов.** Во всех анализируемых библиотеках были выявлены только бактерии, а архейный компонент не был обнаружен. Таксономическое распределение филогенов бактерий на уровне филумов, а для *Proteobacteria* – на уровне классов, показано на рис. S1.

Большинство последовательностей в библиотеках генов 16S рРНК, представленных для всех исследуемых типов образцов материалов (ПЭТ, ПС и СТ), относилось к филуму *Proteobacteria*, однако состав классов в этом филуме различался как между библиотеками с разных типов образцов, так и из разных сред. Значительную часть разнообразия бактерий во всех библиотеках составляли *Gamma**proteobacteria*, при этом их количественное соотношение и изменения в процессе экспонирования были специфичными не для сравниваемых материалов, а для водных сред, в которых эти материалы экспонировались. Для всех сравниваемых образцов материалов в промышленной оборотной воде наблюдалось значительное увеличение доли гаммапротеобактерий на последних стадиях экспозиции (с 13–19% для 1–2 этапов до 37–53% на 3–4 этапах), в то время как в морской воде их доля на различных стадиях либо оставалась примерно одинаковой (23–30% для СТ), либо немного уменьшалась на последних стадиях (20–10% для ПЭТ и 24–13% для ПС).

**Таблица 2.** Индексы разнообразия\* библиотек фрагментов гена 16S рРНК из обрастаний на поверхности подложек из различных материалов, экспонированных в водных средах

Среда	Образец	Библиотека	Риды	ОТЕ	Chao1	H	1/S	D
Группа “Industrial” (промышленная оборотная вода)	PET	PET10I	12421	365	377 ± 6	4.7	53.4	0.08
		PET20I	16647	256	292 ± 13	1.8	2.0	0.70
		PET40I	13690	226	249 ± 10	3.3	8.6	0.30
		PET60I	10001	281	299 ± 8	4.1	20.9	0.15
	PS	PS10I	24282	575	618 ± 12	3.4	6.1	0.39
		PS20I	59621	1446	1457 ± 5	5.8	131.4	0.04
		PS40I	37938	779	803 ± 8	4.4	26.4	0.11
		PS60I	24789	596	633 ± 12	4.0	11.9	0.26
	ST	ST10I	35475	1219	1278 ± 13	5.4	85.4	0.05
		ST20I	62539	1571	1601 ± 8	5.7	105.5	0.04
		ST40I	31814	554	569 ± 7	4.7	45.6	0.08
		ST60I	41464	699	716 ± 15	4.5	17.8	0.20
Группа “Marine” (морская вода)	PET	PET10M	5688	266	281 ± 8	4.8	72.9	0.04
		PET20M	4338	284	296 ± 7	4.8	59.6	0.06
		PET40M	5351	192	191 ± 1	4.4	45.2	0.07
		PET60M	10881	256	271 ± 9	4.3	30.3	0.13
	PS	PS10M	20996	930	950 ± 7	5.8	162.7	0.03
		PS40M	15852	574	581 ± 4	5.4	99.6	0.05
		PS60M	46101	1061	1069 ± 4	5.2	51.0	0.10
		ST	ST10M	18501	192	197 ± 4	2.7	8.7
	ST	ST20M	23973	980	1007 ± 8	5.2	43.6	0.10
		ST40M	61537	1186	1208 ± 8	5.5	88.7	0.05
		ST60M	61246	1066	1082 ± 7	4.8	32.7	0.13
		Группа “Fresh” (природная пресная вода)	PET	PET10F	9568	469	481 ± 5	5.0
PS	PS10F		27423	1721	1724 ± 4	6.2	85.3	0.09
ST	ST10F		44734	2000	2021 ± 6	6.1	124.9	0.05

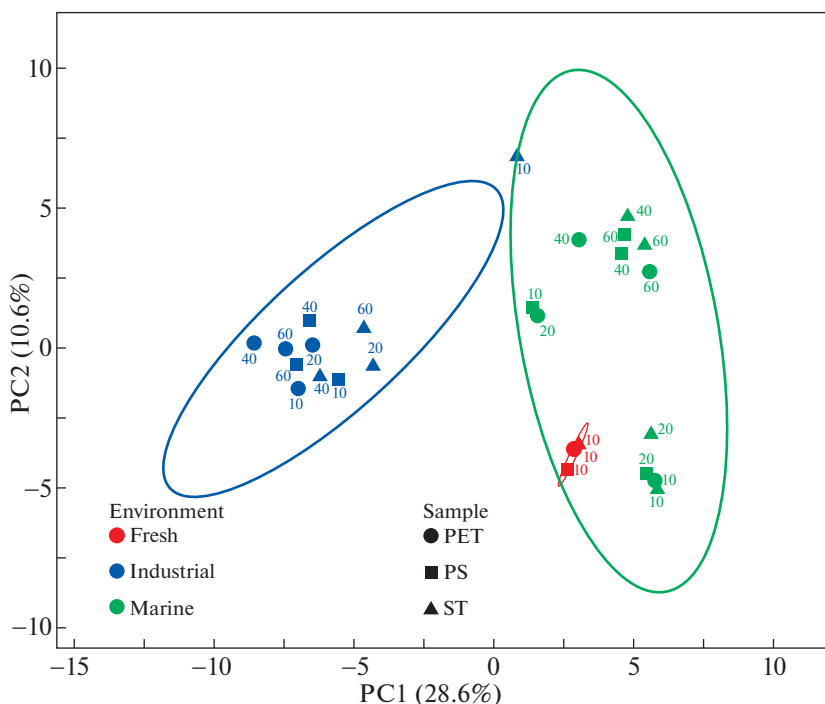
\* Chao1 – индекс видового богатства; H – индекс разнообразия Шеннона–Уивера; 1/S – обратный индекс разнообразия Симпсона; D – индекс доминирования Бергера–Паркера.

Представители *Betaproteobacteria* в заметных количествах были преимущественно выявлены только в пресных водах, т.е. в промышленной оборотной (5–27%) и в природной пресной воде Можайского водохранилища (16–28%). Присутствие представителей филума *Cyanobacteria* было выявлено только в морской и природной пресной воде, а в промышленной оборотной воде цианобактерии отсутствовали, по-видимому, из-за недостаточной освещенности. Наиболее значительным различием между образцами из пластика и стали являлось присутствие в бактериальных сообществах последних, при этом исключительно в морской воде, значительного количества пред-

ставителей филумов *Epsilon-* (16–18%) и *Zetaproteobacteria* (6–8%).

**Сравнение состава сообществ обрастаний на уровне родов.** В результате классификации 10214 ОТЕ в общем составе 26 библиотек фрагментов генов 16S рРНК были выявлены представители 778 родов бактерий. Группирование библиотек на родовом уровне приведено на графике PCA, построенном с помощью программы ClustVis (рис. 1). Результаты этого анализа свидетельствуют о разделении библиотек на 2 области, соответствующие экспозиции образцов в морской воде и в обоих типах пресных вод. При этом наблюдалось внутреннее группирование библиотек из





**Рис. 1.** График, показывающий группирование образцов ПЭТ, ПС и СТ в различных средах в соответствии с составом бактериальных сообществ их обрастаний, полученный методом главных компонент (Principal Components Analysis, PCA) с использованием параметра SVD в программе ClustVis. Эллипсы обозначают области, внутрь которых с вероятностью 0.95 попадет новый объект из той же группы.

пресных вод, отделяющее библиотеки группы “Fresh”, а также отдельные библиотеки группы “Industrial” друг от друга. Группирование последних коррелировало со временем экспозиции, т.е. библиотеки, полученные на поздних стадиях экспозиции (40–60 сут) (после антимикробной обработки), преимущественно группировались отдельно от библиотек, полученных на ранних стадиях экспозиции (10–20 сут).

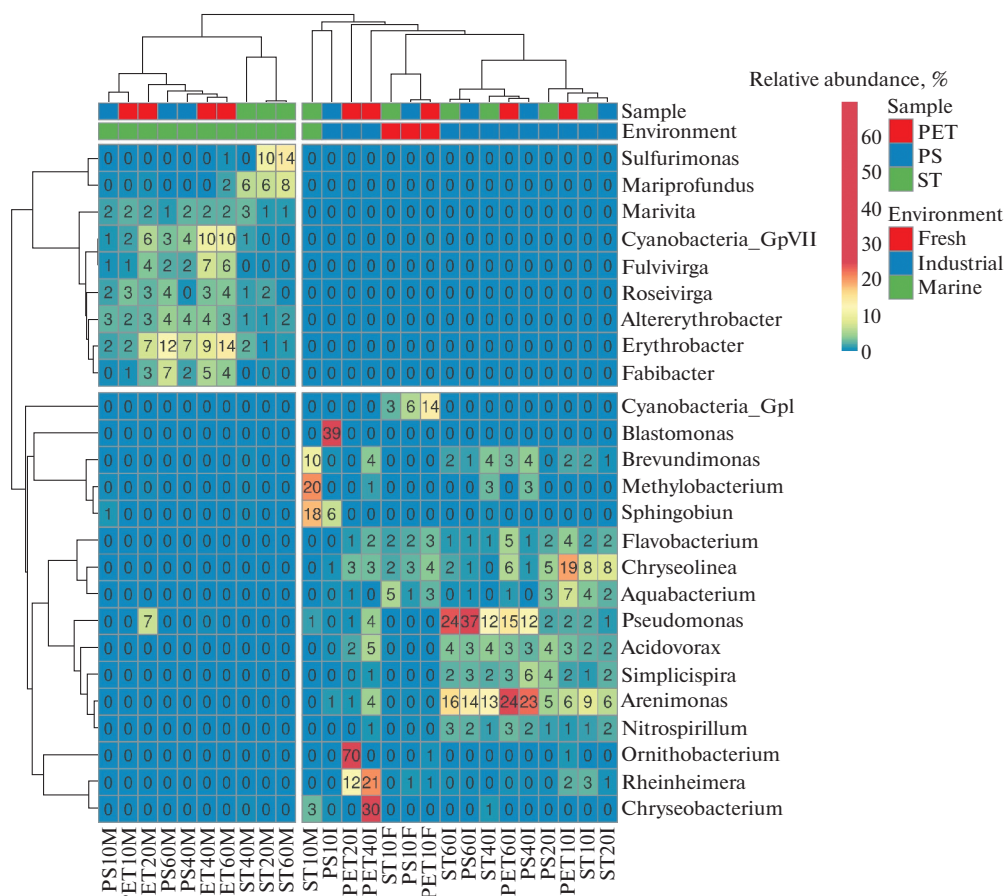
Тепловая карта распределения всех 778 родов бактерий, созданная с использованием программы ClustVis, позволяет проследить распределение библиотек по двум параметрам, а именно, типу материала образца и характеру среды экспозиции. На тепловой карте (рис. S2) видны 3 четко различающиеся области, коррелирующие с типами сред обитания. Такое распределение библиотек свидетельствует о кардинальных различиях в родовом составе бактериальных сообществ при экспонировании образцов в соответствующих водных средах, хотя пресноводные сообщества были более близки по составу между собой, чем с морскими сообществами. При этом внутри областей в группе “Marine” наблюдалась тенденция к группированию библиотек по типу материала образцов, а для группы “Industrial” такой тенденции не прослеживалось.

На тепловой карте 25 родов, преобладающих в общем составе библиотек, можно отметить фор-

мирование только двух областей, коррелирующих с морской и пресноводными типами сред, что подтверждает относительное сходство библиотек групп “Industrial” и “Fresh” (рис. 2). В результате этого анализа были выявлены различия в родовой структуре преобладающих компонентов сообществ бактерий в морской и пресноводных средах.

В промышленной оборотной воде на образцах всех типов материалов наиболее представленными были бактерии родов *Arenimonas* и *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*). Там же присутствовали бактерии родов *Acidovorax* и *Simplispira* (*Betaproteobacteria*); на некоторых стадиях экспозиции выявлялись также *Brevundimonas* и *Nitrospirillum* (*Alphaproteobacteria*). Специфичными для библиотек ПЭТ на средних стадиях экспонирования (20–40 сут) в промышленной воде были бактерии рода *Reinheimeria*, а для библиотеки с образца ПС на начальной стадии экспонирования (10 сут) – бактерий родов *Blastomonas* и *Sphingobium* (*Alphaproteobacteria*).

В морской воде универсально представленными на образцах всех типов материалов были бактерии родов *Marivita*, *Erythrobacter* и *Altererythrobacter* (*Alphaproteobacteria*) и *Roseivirga* (*Bacteroidetes*). Представители доминантных родов *Fulvivirga* и *Fabibacter* филума *Bacteroidetes* были выявлены только в библиотеках с образцов пластика. В то



**Рис. 2.** Тепловая карта (Heatmap) распределения 25 доминантных родов бактерий по общей сумме ридов во всех 26 библиотеках, представляющих бактериальные сообщества с образцов ПЭТ, ПС и СТ. Представленность родов рассчитана как отношение количества ридов, принадлежащих представителям данного рода, к общему количеству ридов в каждой библиотеке. Как строки, так и столбцы группировались с использованием программы ClustVis. Сравнительное количество фрагментов последовательностей гена 16S рРНК бактерий определенных родов в библиотеках показано цветом.

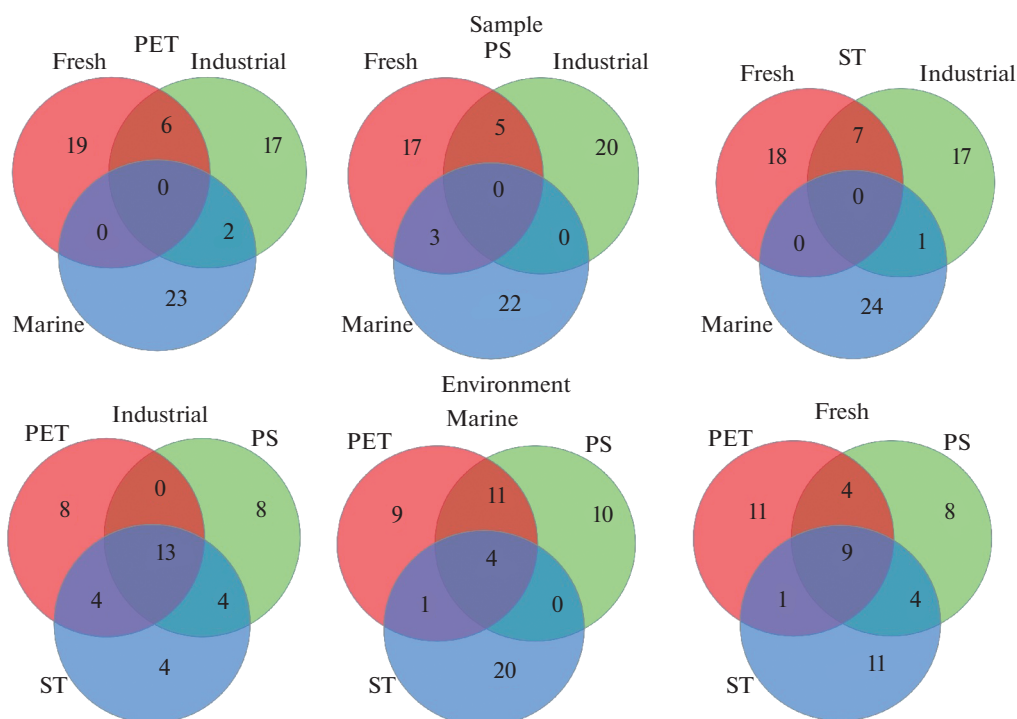
же время специфичными для библиотек с образцов стали бактерии рода *Sphingobium* (*Alphaproteobacteria*) на начальной стадии экспонирования (10 сут), а родов *Sulfurimonas* (*Epsilonproteobacteria*) и *Mariprofundus* (*Zetaproteobacteria*) – на последующих стадиях (20–60 сут).

Поскольку было выявлено заметное изменение состава исследуемых библиотек на родовом уровне в соответствии с типом среды экспонирования, было дополнительно проведено 2 варианта анализа, в которых сравнивали состав доминирующих родов (топ-25) индивидуально по каждой среде экспозиции для каждого из типов материалов (табл. S1).

В первом варианте этого анализа выявленные доминирующие роды сравнивались по группированию согласно типу материала образцов (рис. 3\_Sample). При сравнении диаграмм Венна, построенных для каждого материала, прослеживались тенденции, одинаковые для всех трех ма-

териалов. Так, ни на одной диаграмме не было обнаружено общих родов для каждой из трех групп сред, в которой экспонировались образцы данного типа материалов. Кроме того, при попарном сравнении между пресноводными средами и морской средой для каждого типа материалов количество общих родов было минимальным (0–3). И только при сравнении обеих пресноводных сред для каждого типа материалов было обнаружено заметное количество общих родов (5–7). Соответственно, количество родов, индивидуальных для каждого типа материалов, было значительным (16–24).

Во втором варианте анализа наборы топ-25 родов сравнивались по группированию согласно среде экспозиции (рис. 3\_Environment). При сравнении диаграмм Венна, построенных для каждой среды, количество общих родов для каждого типа материала при группировании по типам сред было значительно выше, чем в первом варианте анализа, но при этом варьировало для каждой среды.



**Рис. 3.** Диаграммы Венна, показывающие количество общих и уникальных родов из доминантных (топ-25) родов по количеству родов представителей каждого рода в сумме родов по каждому типу материала (ПЭТ, ПС и СТ) в каждой среде экспозиции (группы “Industrial”, “Marine” и “Fresh”). Sample – соотношения родов при сравнении по типу материала образцов; Environment – соотношения родов при сравнении по типу среды экспозиции.

Оно было наименьшим для морской воды (4), средним для природной пресной воды (9) и наибольшим для промышленной оборотной воды (13). Соответственно варьировало и количество индивидуальных для каждой среды родов, которое было минимальным для группы “Industrial” (4–8), средним для группы “Fresh” (8–11) и максимальным для группы “Marine” (10–20). Попарное сравнение образцов материалов также варьировало для каждой из сред. Для обоих типов пресной воды количество общих родов было незначительно как для обоих образцов пластика (0–4), так и образцов пластика со сталью (1–4). В то же время в случае инкубации в морской воде было выявлено значительное количество общих родов для образцов пластика (10) и низкое при сравнении образцов пластика и стали (0–1).

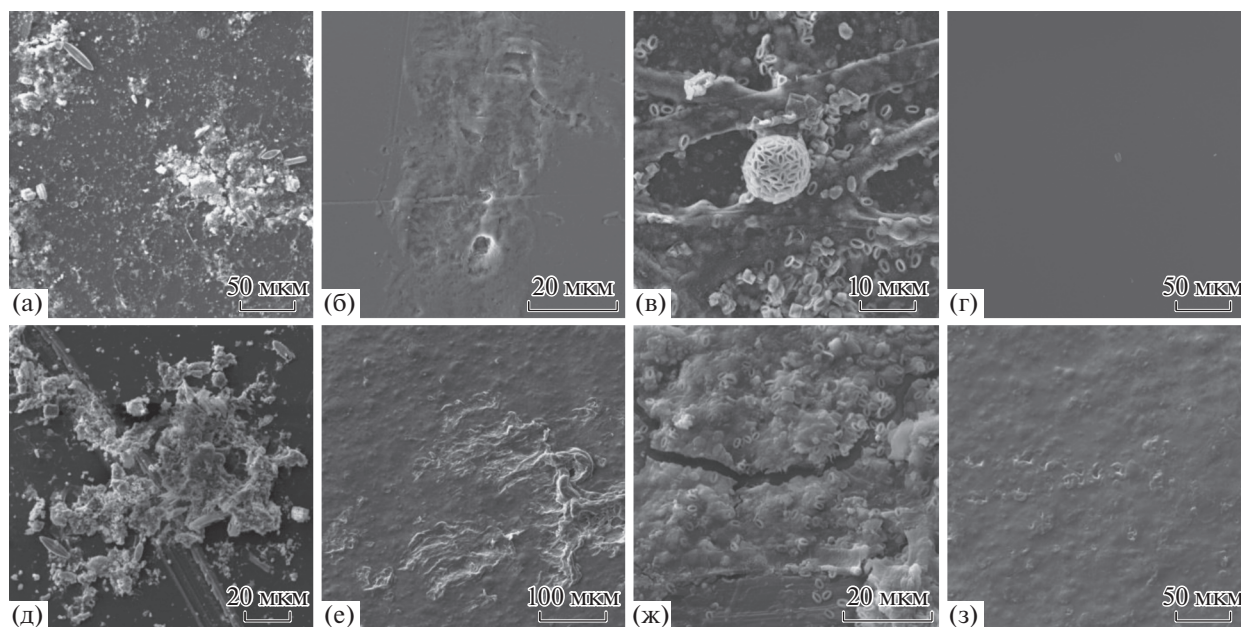
**Выявление таксонов-маркеров в бактериальных сообществах.** Чтобы выявить таксоны (маркеры), которые достоверно различают сравниваемые сообщества по сравнительной обильности, был применен метод LefSe. Из общего количества для всех библиотек были отобраны 2777 ОТЕ (каждая из ОТЕ объединяла в своем составе >0.1% от общего состава 26 библиотек), классифицированные от филума до рода.

При сравнении библиотек согласно различиям по средам экспозиции (рис. S3\_Environment)

было выявлено всего 40 таксонов уровня от филума до рода, представленность которых была специфична для каждой из сред экспозиции, в том числе, 23 таксона – для морской воды, 13 – для промышленной оборотной воды и 14 – для природной пресной воды. При этом в группе “Marine” были наиболее представлены бактерии филума *Planctomycetes* и классов *Alphaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* и *Zetaproteobacteria*, а также порядка *Alteromonadales*; для группы “Industrial” – бактерии порядков *Pseudomonadales* и *Xanthomonadales*. Бактерии филума *Bacteroidetes* и класса *Betaproteobacteria* были относительно обильны в группах “Industrial” и “Fresh”, а филума *Cyanobacteria/Chloroplast* – в группах “Marine” и “Fresh”.

Выявленные с помощью программы LefSe роды-маркеры, для группы “Industrial” – *Pseudomonas*, *Arenimonas* и *Acidovorax*, а для группы “Marine” – *Erythrobacter*, *Altererythrobacter* и *Mariprofundus*, входили в топ-25 родов по сумме представленности во всех библиотеках (рис. 2), что свидетельствовало о специфичности этих доминирующих в сообществах родов бактерий для сравниваемых сред экспозиции. Распределение родов-маркеров по средам экспозиции и по типу материала образцов представлены на рис. S4.





**Рис. 4.** Микрофотографии обрастаний на образцах полимеров после 60 сут экспозиции: ПЭТ (а–г) и ПС (д–з), экспонированных в промышленной (а, д) и в морской воде (в, ж); а также отмытых от обрастаний образцов ПЭТ и ПС, экспонированных в промышленной (б, е) и в морской воде (г, з). Сканирующий электронный микроскоп TESCAN VEGA 3 XMU.

При сравнении библиотек согласно типам материала образцов (рис. S3\_Sample) результаты LefSe анализа существенно отличались от рассмотренных выше. Было выявлено всего 8 таксонов уровня от филума до рода, представленность которых была специфична для каждого из типов материала: 4 таксона для образцов ПЭТ, 3 – для образцов ПС и всего 1 – для образцов СТ. Дифференцирующая относительная обильность таксонов-маркеров для образцов ПЭТ была выявлена на уровне семейства *Flavobacteraceae*, для образцов ПС – на уровне рода *Blastomonas* и филума *Actinobacteria*, а для образцов СТ – только на уровне филума *Proteobacteria*.

**Микроскопия микробных обрастаний на образцах пластика.** Методом сканирующей электронной микроскопии были исследованы микробные обрастания на поверхности полимерных образцов (ПЭТ и ПС), экспонировавшихся в водных средах, а также поверхность образцов, отмытых от обрастаний. Обрастания на образцах полимеров в промышленной оборотной воде были в основном представлены рыхлыми конгломератами бактериальных колоний, а структурированные микроэукариоты в них были единичны (рис. 4а, 4д). При этом на микрофотографиях отмытых от обрастаний образцов обоих типов полимеров в этой среде видны хотя и локальные, но заметные разрушения подложки (рис. 4б, 4е).

На образцах обоих типов полимеров в морской воде были обнаружены более разнообраз-

ные обрастания, значительную часть которых составляли различные структурированные микроэукариоты (рис. 4в, 4ж). Возможные конгломераты бактериальных колоний были представлены либо в виде нижнего слоя на поверхности подложек, либо на элементах микроэукариотных обрастаний. Однако микрофотографии отмытых от обрастаний образцов ПЭТ и ПС продемонстрировали различное влияние обрастаний на эти типы материалов. Образец ПЭТ после экспонирования в морской воде остался интактным, в то время как на поверхности образца ПС были обнаружены незначительные точечные повреждения (рис. 4г, 4з).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Различные способы анализа таксономического состава обрастаний на поверхности двух полимерных материалов (ПЭТ и ПС), а также стали показали, что влияние среды экспонирования на состав микробных сообществ с поверхности подложек из различных материалов было значительнее, чем влияние природы материала. Наиболее заметное влияние на состав сообществ обнаружено для промышленной оборотной воды. Среди общих для этой среды таксонов особое место занимали бактерии рода *Pseudomonas*, представленность которых заметно возрастала к концу экспозиции всех образцов материалов в данной среде. Бактерии этого рода являются модельным объектом для изучения биodeградации ряда ароматиче-

ских и полициклических соединений, в том числе, бензола, катехола и других (Nogales et al., 2017). Многие представители этого рода являются деструкторами синтетических пластических материалов, включая ПЭТ и ПС (Wilkes, Aristilde, 2017), а также участвуют в биокоррозии стали (Abdolahi et al., 2014). Известно, что представители вида *Pseudomonas putida* могут разлагать как обработанный ультрафиолетом ПЭТ (Vague et al., 2019), так и его мономеры – этиленгликоль (Franden et al., 2018) и терефталевую кислоту (Kenny et al., 2008). Были выделены штаммы *P. putida*, способные деградировать мономер ПС – стирол (Gassner, 2019). Штаммы *P. putida* входили также в состав микроконсорциума, осуществляющего коррозию стали (Aguliah, Ting, 2014). Проведенные нами микроскопические исследования подтвердили протекание процессов биодеструкции полимеров преимущественно в промышленной оборотной воде, поскольку после экспонирования в этой среде были наиболее заметны повреждения подложек из этих материалов. Таким образом, эта среда может быть наиболее агрессивной в отношении промышленных изделий и конструкций, изготовленных из пластика. По-видимому, это связано с тем, что поступление в оборотную воду различных химических примесей, образующихся в производственных процессах нефтесинтеза, способствует отбору штаммов-деструкторов полимеров и/или их мономерных составляющих. Кроме того, антимикробная обработка промышленной воды, проводимая согласно программе корректировки, приводит к смене состава микробного сообщества и появлению наиболее устойчивой к обработке микрофлоры. Такие циклические изменения также влияют и на структуру подложки, возможно, делая ее более доступной для биодеструкции (Лаптев и соавт., 2019).

Наиболее заметные изменения таксономического состава бактериальных сообществ в результате антимикробной обработки промышленной оборотной воды прослеживались на образцах ПС. На начальной стадии (10 сут) преобладающими в библиотеке с образца ПС являлись бактерии рода *Blastomonas* (*Alphaproteobacteria*), которые отсутствовали во всех остальных сравниваемых библиотеках. Возможно, это объясняется способностью бактерий рода *Blastomonas* продуцировать в пресной водной среде адгезины для формирования биопленок с другими бактериями (Rickard et al., 2004), что особенно актуально для образцов ПС с наиболее твердой и гладкой поверхностью. Еще одним специфическим доминантным родом для этой стадии экспозиции ПС в промышленной воде оказался *Sphingobium*, многие штаммы которого способны к деградации широкого круга ароматических соединений, включая стирол (Verma et al., 2014). Однако, по-видимому, представители этих родов оказались наиболее чувствительными к ан-

тимикробной обработке, поэтому в дальнейшем таксономический состав этих библиотек изменялся с накоплением к концу экспозиции бактерий родов *Arenimonas* и *Pseudomonas*. Накопление бактерий рода *Pseudomonas* на всех образцах в промышленной воде может быть результатом их участия в процессах как биodeградации полимеров и/или продуктов их деполимеризации, так и биокоррозии стали в этой среде. Для бактерий рода *Arenimonas* показано активное участие в деградации нефтепродуктов (Gao et al., 2019), что может способствовать накоплению их в загрязненной продуктами нефтехимического синтеза промышленной оборотной воде. Не исключена также возможность использования этими бактериями мономерных продуктов деградации пластических материалов.

Несмотря на то, что по уровню солености промышленная оборотная вода значительно ближе к пресной, чем к морской воде, общими компонентами библиотек для обоих типов пресноводных сред являются только бактерии доминантных родов *Flavobacterium* и *Chryseolinea* (*Bacteroidetes*), а также бактерий рода *Aquabacterium* (*Alphaproteobacteria*). Таким образом, особенности таксономического состава бактериальных сообществ обрастаний на поверхности полимерных материалов и стали в промышленной оборотной воде в основном связаны со специфическими физико-химическими условиями этой среды: повышенной соленостью, жесткостью и, особенно, значительным количеством продуктов нефтесинтеза.

Таксономический состав доминантных родов (топ-25) библиотек группы “Marine” был кардинально отличным от такового в группе “Industrial”. Общими для всех библиотек доминантными бактериями в группе “Marine” были морские альфапротеобактерии родов *Marivita*, *Erythrobacter* и *Altererythrobacter*. Доля бактерий родов *Erythrobacter* и *Altererythrobacter* была более высокой на образцах пластика (до 14 и 4% на последних этапах экспонирования соответственно). Это совпадало с результатами, полученными ранее при экспонировании образцов ПЭТ и ПС в Балтийском море, на основании чего предполагалось, что обильно представленные на них бактерии рода *Erythrobacter* катаболизируют не сам пластик, а ассоциированные с ним полициклические ароматические углеводороды, сорбированные из окружающей водной среды (Oberbeckmann et al., 2018). В то же время в геноме одного из штаммов *Altererythrobacter* (AC AP018498) (Maeda et al., 2018) представлены гены деградации стирола, что не исключает возможности участия представителей этого рода в деградации ПС. Кроме того, возможно участие в деградации стирола минорных компонентов сообщества, относящихся к родам *Tropicibacter* и *Marinobacter* (Tourova et al., 2020). Это не противоречит нашим результатам микроскопии, согласно

которым на подложках ПС, экспонированных в морской воде, наблюдались точечные повреждения, в то время как на подложках ПЭТ в этой среде никаких повреждений не обнаружено (рис. 4).

Выявлены значительные различия таксономического состава микроорганизмов на образцах стали на первоначальном (10 сут) и последующих этапах (20–40 сут) экспонирования в морской воде. На первом этапе типичная морская микробиота отсутствовала, но при этом преобладали бактерии родов *Methylobacterium* и *Sphingobium*, для которых показано участие в формировании биопленок на металлических поверхностях (Ogawa et al., 2020). Возможно, это связано с избирательностью первичной адгезии микроорганизмов на металлической поверхности в соленой морской воде (обусловленной электростатическим взаимодействием с поверхностью) по сравнению с адгезией на поверхности пластика. Особый состав этой библиотеки обусловил ее группирование на графике PCA и на тепловых картах с библиотеками бактерий из пресноводных местообитаний, а не с остальными морскими (рис. 1, S2 и 2). На последующих этапах экспонирования (20–60 сут) таксономический состав библиотек с образцов стали кардинально изменялся с появлением в нем родов морских альфапротеобактерий, общих для всех остальных библиотек группы “Marine”. Главным отличием этих сообществ от сообществ, развивающихся на образцах пластика, стало присутствие бактерий доминантных родов *Sulfurimonas* (*Epsilonproteobacteria*) и *Mariprofundus* (*Zetaproteobacteria*). Представители этих таксонов были выявлены ранее при анализе бактериальных сообществ морских местообитаний (Dang et al., 2011; McBeth, Emerson, 2016). Предполагается, что бактерии рода *Sulfurimonas* участвуют в окислении восстановленных соединений серы и, возможно, водорода, образующихся в процессах биокоррозии (Little, Lee, 2007). В состав филума *Zetaproteobacteria* входят литотрофные железоокисляющие бактерии, которые присутствуют в различных морских экосистемах и быстро появляются в биопленках на поверхности стальных материалов, в результате чего предлагается рассматривать их в качестве маркеров протекающих в этой среде процессов Fe-окисления (Emerson, 2018). Обогащение обрастаний на поверхности стали в морской воде серо- и железоокисляющими бактериями, в отличие от одновременно экспонируемых образцов пластика, свидетельствует о влиянии этих бактерий на процессы биокоррозии и, возможно, о большей агрессивности этой среды в отношении металлоконструкций по сравнению с промышленной водой.

Полученные результаты могут найти применение в последующих исследованиях по выделению эффективных бактерий-деструкторов полимерных

материалов для использования их в процессах утилизации бытовых и промышленных отходов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной поддержке РФФИ (грант № 18-29-05033).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лантев А.Б., Николаев Е.В., Куршев Е.В., Горяшник Ю.С. Особенности биодеструкции термопластов на основе полиэфиров в различных климатических зонах // Труды ВИАМ. 2019. № 7. С. 84–91.  
<https://doi.org/10.18577/2307-6046-2019-0-7-84-91>
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Груздев Д.С., Лантев А.Б. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ с поверхности полиэтилентерефталатных материалов при экспозиции в водных средах // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 99–110.  
<https://doi.org/10.31857/S0026365620010152>
- Tourova T.P., Sokolova D.S., Nazina T.N., Grouzdev D.S., Laptev A.B. Phylogenetic diversity of microbial communities from the surface of polyethylene terephthalate materials exposed to different water environments // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 96–106.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261720010154>
- Abdolah A., Hamzah E., Ibrahim Z., Hashim S. Microbially influenced corrosion of steels by *Pseudomonas aeruginosa* // Corros. Rev. 2014. V. 32. P. 129–141.  
<https://doi.org/10.1515/correv-2013-0047>
- Aruliah R., Ting Y.-P. Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from water in a cooling tower // ISRN Corros. 2014. V. 2014. Art. 803219.  
<https://doi.org/10.1155/2014/803219>
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- de Carvalho C.C.R. Marine biofilms: A successful microbial strategy with economic implications // Front. Mar. Sci. 2018. V. 5. Art. 126.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>

- Dang H., Chen R., Wang L., Shao S., Dai L., Ye Y., Guo L., Huang G., Klotz M.G. Molecular characterization of putative biocorroding microbiota with a novel niche detection of *Epsilon-* and *Zetaproteobacteria* in Pacific Ocean coastal seawaters // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 3059–3074. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02583.x>
- Dussud C., Meistertzheim A.L., Conan P., Pujo-Pay M., George M., Fabre P., Coudane J., Higgs P., Elineau A., Pedrotti M.L., Gorsky G., Ghiglione J.F. Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters // *Environ. Pollut.* 2018. V. 236. P. 807–816. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.027>
- Emerson D. The role of iron-oxidizing bacteria in biocorrosion: a review // *Biofouling.* 2018. V. 34. P. 989–1000. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1526281>
- Franden M.A., Jayakody L.N., Li W.-J., Wagner N.J., Cleveland N.S., Michener W.E., Hauer B., Blank L.M., Wierckx N., Klebensberger J., Beckham G.T. Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient ethylene glycol utilization // *Metab. Eng.* 2018. V. 48. P. 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.06.003>
- Gao S., Liang J., Teng T., Zhang M. Petroleum contamination evaluation and bacterial community distribution in a historic oilfield located in loess plateau in china // *Appl. Soil Ecol.* 2018. V. 136. P. 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.12.012>
- Gassner G.T. The styrene monooxygenase system // *Methods Enzymol.* 2019. V. 620. P. 423–453. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.03.019>
- Hoellein T., Rojas M., Pink A., Gasior J., Kelly J. Anthropogenic litter in urban “Fresh” water ecosystems: Distribution and microbial interactions // *PLoS One.* 2014. V. 9. e98485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098485>
- Kenny S.T., Nikodinovic-Runic J., Kaminsky W., Woods T., Babu R.P., Keely C.M., Blau W., O'Connor K.E. Up-Cycling of PET (polyethylene terephthalate) to the biodegradable plastic PHA (polyhydroxyalkanoate) // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. P. 7696–7701. <https://doi.org/10.1021/es801010e>
- Kesy K., Oberbeckmann S., Kreikemeyer B., Labrenz M. Spatial environmental heterogeneity determines young biofilm assemblages on microplastics in Baltic Sea mesocosms // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 1665. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01665>
- Krueger M.C., Seiwert B., Prager A., Zhang S., Abel B., Harms H., Schlosse D. Degradation of polystyrene and selected analogues by biological Fenton chemistry approaches: Opportunities and limitations // *Chemosphere.* 2017. V. 173. P. 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.089>
- Little B.J., Lee J.S. *Microbiologically Influenced Corrosion*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc., 2007. Ch. 1e4.
- Maeda A.H., Nishi S., Ishii S., Shimane Y., Kobayashi H., Ichikawa J., Kurosawa K., Arai W., Takami H., Ohta Y. Complete genome sequence of *Altererythrobacter* sp. strain B11, an aromatic monomer-degrading bacterium, isolated from deep-sea sediment under the seabed off Kashima, Japan // *Genome Announc.* 2018. V. 22. e00200-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00200-18>
- McBeth J.M., Emerson D. *In situ* microbial community succession on mild steel in estuarine and “Marine” environments: exploring the role of iron-oxidizing bacteria // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 767. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00767>
- Nogales J., García J.L., Díaz E. Degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas*: A systems biology view // *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids* / Ed. Rojo F. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. 2017. P. 1–49. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5\\_32-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_32-1)
- Oberbeckmann S., Kreikemeyer B., Labrenz M. Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics // *Front. Microbiol.* 2018. V. 8. Art. 2709. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02709>
- Ogawa A., Takakura K., Hirai N., Kanematsu H., Kuroda D., Kougo T., Sano K., Terada S. Biofilm formation plays a crucial role in the initial step of carbon steel corrosion in air and water environments // *Materials.* 2020. V. 13. Art. 923. <https://doi.org/10.3390/ma13040923>
- Otake Y., Kobayashi T., Asabe H., Murakami K., Ono K. Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years // *J. Appl. Polym. Sci.* 1995. V. 56. P. 1789–1796. <https://doi.org/10.1002/app.1995.070561309>
- Rickard A.H., Gilbert P., Handley P.S. Influence of growth environment on coaggregation between freshwater biofilm bacteria // *J. Appl. Microbiol.* 2004. V. 96. P. 1367–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02297.x>
- Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Gevers D., Miropolsky L., Garrett W.S., Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation // *Genome Biol.* 2011. V. 24. Art. R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Tourova T., Sokolova D., Nazina T., Grouzdev D., Kurshev E., Laptev A. Biodiversity of microorganisms colonizing the surface of polystyrene samples exposed to different aqueous environments // *Sustainability.* 2020. V. 12. Art. 3624. <https://doi.org/10.3390/su12093624>
- Vague M., Chan G., Roberts C., Swartz N.A., Jay L., Mellies J.L. *Pseudomonas* isolates degrade and form biofilms on polyethylene terephthalate (PET) plastic // *bioRxiv.* 2019. 647321. <https://doi.org/10.1101/647321>
- Verma H., Kumar R., Oldach P., Sangwan N., Khurana J.P., Gilbert J.A., Rup L. Comparative genomic analysis of nine *Sphingobium* strains: insights into their evolution and hexachlorocyclohexane (HCH) degradation pathways // *BMC Genomics.* 2014. V. 15. Art. 1014. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1014>
- Webb H., Arnott J., Crawford R., Ivanova E. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate) // *Polymers.* 2013.

V. 5. P. 1–18.

<https://doi.org/10.3390/polym5010001>

Wilkes R., Aristilde L. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* spp.: capabilities and challenges // J. Appl. Microbiol. 2017. V. 123. P. 582–593.

<https://doi.org/10.1111/jam.13472>

Yang Y., Yang J., Wu W.-M., Zhao J., Song Y., Gao L., Yang R., Jiang L. Biodegradation and mineralization of polystyrene

by plastic-eating mealworms: part 2. Role of gut microorganisms // Environm. Sci. Technol. 2015. V. 49. P. 12087–12093.

<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02663>

Yoshida S., Hiraga K., Takehana T., Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y., Toyohara K., Miyamoto K., Kimura Y., Oda K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) // Science. 2016. V. 353. P. 759–759.

<https://doi.org/10.1126/science.aad6359>

## Comparative Analysis of Bacterial Biofilms Developing on Various Material Exposed to Aqueous Media

T. P. Tourova<sup>1, \*</sup>, D. Sh. Sokolova<sup>1</sup>, T. N. Nazina<sup>1</sup>, and A. B. Laptev<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>All-Russian Scientific Research Institute of Aviation Materials, Moscow, 105005 Russia

\*e-mail: [tptour@rambler.ru](mailto:tptour@rambler.ru)

Received December 29, 2020; revised February 12, 2021; accepted March 5, 2021

**Abstract**—The work was aimed at detection of potential degraders of polyethylene terephthalate (PET), polystyrene (PS), and steel 20 based on comparison of the taxonomic composition of the biofilm communities formed on these materials immersed in aqueous media of diverse origin (marine, natural freshwater, and industrial) in different climatic regions. The libraries obtained by high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene V3–V4 region were mainly grouped according to the media types. The composition and relative ratios of the taxa (both at the phylum/class and the genus levels) differed significantly between the groups of libraries; inside the groups, these parameters varied depending mainly on the incubation time and on antimicrobial treatment (for industrial samples), while the material of the samples had less effect. Our results indicated that industrial recirculated water was more aggressive against polymer materials, with potential degraders of the polymers (PET and PS) belonging to the genera *Pseudomonas*, *Acidovorax*, and *Arenimonas*. Iron- and sulfur-oxidizing bacteria of the genera *Sulfurimonas* and *Mariprofundus* are probably involved in steel biocorrosion in seawater.

**Keywords:** polyethylene terephthalate, polystyrene, steel, biodegradation, biocorrosion, high-throughput sequencing, the 16S rRNA gene



## АЗОТНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ АНОКСИГЕННОЙ НИТЧАТОЙ ФОТОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ *OSCILLOCHLORIS TRICHOIDES* DG-6<sup>1</sup>

© 2021 г. Р. Н. Ивановский<sup>а, \*</sup>, Н. В. Лебедева<sup>а</sup>, О. И. Кеппен<sup>а</sup>, Т. П. Турова<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, Москва, 119191, Россия

<sup>б</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия  
\*e-mail: mguru@mail.ru

Поступила в редакцию 21.02.2021 г.

После доработки 23.03.2021 г.

Принята к публикации 24.03.2021 г.

Источниками азота для *Oscillochloris trichoides* DG-6 – типowego штамма семейства *Oscillochloridaceae*, могут служить аммоний, N<sub>2</sub>, глутамат, а также аминокислоты аспарагин, глицин, и глутамин. Ассимиляция молекулярного азота происходит при участии нитрогеназы, структурный ген которой, *nifH*, находится в составе генного кластера, включающего также гены субъединиц нитрогеназы *nifD* и *nifK* и вспомогательный ген *nifV*. Учитывая, что *nifHBDK* кластеры аннотированы также в геномах других представителей семейства *Oscillochloridaceae*, в том числе некультивируемых и таксонов-кандидатов, можно предположить, что способность к азотфиксации является свойством, имманентным для всего этого семейства. Пути ассимиляции аммония у клеток, выросших с использованием различных источников азота, могут различаться. *Osc. trichoides* DG-6 при росте на среде с аммонием ассимилирует его при участии глутаматдегидрогеназы, которая детерминируется единственным геном. Продукт экспрессии этого гена имеет двойную специфичность и может использовать для реализации реакции как НАД, так и НАДФ. При росте *Osc. trichoides* DG-6 на среде с глутаматом в качестве единственного источника азота в клетках обнаруживаются все ферменты, необходимые для реализации ГС-ГОГАТ пути. Однако для осуществления глутаминсинтетазной реакции, участвующей в этом пути, необходим отсутствующий в среде аммоний, источником которого может служить глутаматдегидрогеназная реакция.

**Ключевые слова:** аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии, *Oscillochloris*, азотный метаболизм, ассимиляция N<sub>2</sub> и аммония

**DOI:** 10.31857/S0026365621040066

Все известные в настоящее время аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии (АНФБ) входят в филум *Chloroflexi*. Представители порядка *Chloroflexales* образуют монофилетическую линию, включающую семейства *Chloroflexaceae*, *Roseiflexaceae* и *Oscillochloridaceae*. АНФБ, принадлежащие этим семействам, различаются по строению фотохимического аппарата, способности к автотрофии, а также по температурным режимам роста. Кроме того, между представителями этих семейств имеются различия и в осуществлении метаболизма азота (Hanada, 2014).

У представителей семейства термофильных фототрофов *Roseiflexaceae* способность использовать молекулярный азот в качестве источника азота не показана (Thiel et al., 2017). Однако в ге-

номах *Roseiflexus* sp. RS1 и *Roseiflexus castenholzii* был обнаружен кластер из четырех совместно локализованных *nifHBDK* генов, которые, как предполагается, кодируют структурные гены Мо-нитрогеназы. При этом было высказано предположение, что неспособность к росту этих бактерий в diazotrophic условиях связана с отсутствием дополнительных генов, обычно участвующих в биосинтезе и созревании функционального апопротеина нитрогеназы (van der Meer et al., 2010; Klatt et al., 2013; Thiel et al., 2017; Nishihara et al., 2018).

Представители семейства *Chloroflexaceae* в качестве единственного источника азота могут использовать аммоний и некоторые аминокислоты – аланин, глутамат, глутамин, аспартат, глицин и серин, но не нитраты (Heda, Madigan, 1986; Hanada, 2014). Способность к азотфиксации и активность нитрогеназы не были обнаружены у четырех штаммов *Chloroflexus aurantiacus*, что коррелирует с их термофилией (Heda, Madigan, 1986; Hanada,

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621040066 для авторизованных пользователей.

2014). Впоследствии эти данные были подтверждены при анализе генома *Cfl. aurantiacus*, в котором не были выявлены структурные гены нитрогеназы и нитратредуктазы (Tang et al., 2011).

Фотоавтотрофные бактерии семейства *Oscillochloridaceae*, являющиеся основным объектом данного исследования, являются мезотрофными микроорганизмами с оптимумом роста при 28–30°C (Кеппен и соавт., 1993). Основным источником азота для роста *Oscillochloris trichoides* DG-6 – типовой штамма семейства *Oscillochloridaceae*, является аммоний, а также аминокислоты аспарагин, глицин, глутамат, глутамин (Кеппен и соавт., 1989). Отличительной особенностью *Osc. trichoides* от бактерий, принадлежащих к родам *Roseiflexus* и *Chloroflexus*, является его способность использовать для роста N<sub>2</sub> в качестве единственного источника азота (Кеппен и соавт., 1989). Впоследствии были проведены амплификация и секвенирование гена *nifH*, детерминирующего редуктазу нитрогеназы, ключевой фермент нитрогеназного комплекса на матрице ДНК трех штаммов *Oscillochloris*, включая *Osc. trichoides* DG-6 (Tourova et al., 2006).

Целью данной работы являлся сравнительный анализ геномных данных, касающихся предположительных реакций азотного метаболизма у культивируемых АФНБ порядка *Chloroflexales*, а также экспериментальное подтверждение осуществления этих реакций бактериями штамма *Osc. trichoides* DG-6.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Бактерии и условия их культивирования.** Объектом исследования была аноксигенная нитчатая фототрофная бактерия (АНФБ) *Osc. trichoides* DG-6. Культуры выращивали на модифицированной среде DGN с комплексом витаминов, 0.1% ацетата, 0.1% бикарбоната и 0.1% сульфида (Кеппен et al., 1994). Культивирование бактерий проводили в анаэробных условиях на свету на магнитной мешалке (300 об./мин) при температуре 28–30°C и освещенности 2000 лк во флаконах на 500 мл с завинчивающимися пробками. Если в качестве источника азота использовали N<sub>2</sub>, флаконы содержали 300 мл среды и молекулярный азот в качестве газовой фазы. Когда в качестве источника азота использовали аммоний или глутамат, флаконы заполняли средой полностью.

**Получение экстрактов клеток.** Для получения бесклеточных экстрактов культуры, находящиеся в конце экспоненциальной фазы роста, центрифугировали (9000 об./мин при 6–8°C), отмывали 0.05 М *tris*-HCl буфером (pH 7.5) и разрушали клетки на X-прессе (“ЛКВ”, Швеция) при избыточном давлении 10 т/см<sup>2</sup>. Неразрушенные клетки и крупные фрагменты отделяли центрифугированием при 35000 g в течение 1 ч. Получившейся су-

пернатант использовали для определения ферментативной активности.

**Определение активности ферментов.** Реакции и катализирующие их ферменты путей N-метаболизма *Osc. trichoides* DG-6, активность которых измерялась в данной работе, представлена в табл. 1. Активность ферментов определяли на спектрофотометре Hitachi 200 (“Hitachi”, Япония) по окислению НАД(Ф)Н и восстановлению НАД(Ф) при 340 нм.

Реакционные смеси для определения активности ферментов содержали соответственно:

(1) глутаматдегидрогеназы (ГДГ): кетоглутарат –  $5 \times 10^{-3}$  М, NH<sub>4</sub>Cl –  $4 \times 10^{-2}$  М, НАД(Ф)Н –  $2.5 \times 10^{-4}$  М; *tris*-HCl (pH 7.5) –  $5 \times 10^{-2}$  М;

(2) глутаматсинтазы (ГОГАТ): кетоглутарат –  $5 \times 10^{-3}$  М, глутамин –  $5 \times 10^{-3}$  М, НАД(Ф)Н –  $2.5 \times 10^{-4}$  М; *tris*-HCl (pH 7.5) –  $5 \times 10^{-2}$  М;

(3) глутамат-оксалоацетат трансминазы (ГОТ): НАД –  $2.5 \times 10^{-4}$  М, кетоглутарат –  $4 \times 10^{-3}$  М, аспартат –  $4 \times 10^{-3}$  М, фосфатный буфер (pH 7.4) – 0.1 М, малатдегидрогеназа – 1.25 мг/мл;

(4) глутамат-пируват трансминазы (ГПТ): НАД –  $2 \times 10^{-4}$  М, кетоглутарат –  $4 \times 10^{-3}$  М, фосфатный буфер (pH 7.5) – 0.1, аланин –  $8 \times 10^{-3}$  М, лактатдегидрогеназа –  $1.25 \times 10^{-3}$  мг/мл;

(5) глутаминазы (ГА): глутамин  $4 \times 10^{-3}$  М, *tris*-HCl (pH 7.5) –  $5 \times 10^{-2}$  М, глутаматдегидрогеназа – 0.15 ед./мл.

Активность глутаминсинтетазы (ГС) измеряли, как описано ранее (Ivanovsky, Khatipov, 1994).

Во все реакционные смеси вносили экстракт клеток, содержащий 1.0–2.0 мг/мг белка.

**Биоинформатический анализ.** Реконструкцию возможных путей метаболизма азота на основании сравнения геномов культивируемых штаммов АФНБ порядка *Chloroflexales* проводили с использованием онлайн-сервисов NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) PATRIC (<https://www.patricbrc.org>) и KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Сравнение кластеров *nif*-генов проводили с использованием онлайн-сервиса Gene Graphics (<https://katlabs.cc/genegraphics/app>).

Белок измеряли по методу Лоури.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Потенциальные функциональные характеристики азотного метаболизма культивируемых штаммов АФНБ порядка *Chloroflexales* на основе сравнения их геномов.** Было проведено сравнение представленных генов, детерминирующих ферменты путей метаболизма азота (“Nitrogen methabolism”) и аланина, аспартата и глутамата (“Alanine, aspartate and glutamate methabolism”) на основании базы данных KEGG в геномах культивируемых

**Таблица 1.** Реакции и катализирующие их ферменты путей N-метаболизма *Osc. trichoides* DG-6, активность которых измерялась в данной работе

Фермент	Метка локуса гена в геноме (locus_tag)	Реакция
Нитрогеназа EC 1.18.6.1	OSCT_0062 OSCT_0063 OSCT_0064 OSCT_0065	$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$
Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) EC 1.4.1.2; EC 1.4.1.4	OSCT_0145	Глутамат + НАД(Ф) <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O → α-кетоглутарат + НАД(Ф)Н + NH <sub>3</sub>
Глютамин синтаза (ГС) EC 6.3.1.2	OSCT_1286	Глутамат + NH <sub>4</sub> + АТФ → глютамин + АДФ + Ф <sub>н</sub>
Глютаматсинтаза (ГОГАТ) EC 1.4.1.13	OSCT_0551	2Глутамат + НАДФ <sup>+</sup> → глютамин + α-кетоглутарат + НАДФН
Глютамат-оксалоацетат трансминаза (ГОТ) EC 2.6.1.1	OSCT_0733 OSCT_1058 OSCT_1297 OSCT_3177	Аспартат + α-кетоглутарат → оксалоацетат + глютамин
Глутамат-пируват трансминаза (ГПТ) EC 2.6.1.2	OSCT_0566	α-Кетоглутарат + аланин → глютамин + пируват

штаммов родов *Oscillochloris*, *Chloroflexus* и *Roseiflexus* (рис. S1a, S1b).

На тепловой карте предполагаемых ферментов метаболизма азота, согласно геномным данным, у всех сравниваемых штаммов представлены ферменты преобразования глутамата: глютаматсинтаза (ГОГАТ) (НАД(Ф)Н) (EC 1.4.1.13); глютамин синтаза (ГС) (EC 6.3.1.2) и глютаматдегидрогеназа (ГДГ) в двух функциональных вариантах — НАДН (EC 1.4.1.2) и НАД(P)Н (EC 1.4.1.4). Эти же ферменты представлены у всех сравниваемых штаммов так же и на тепловой карте ферментов метаболизма аланина, аспартата и глутамата.

Представленность остальных предполагаемых ферментов метаболизма азота заметно различается в зависимости от таксономической принадлежности сравниваемых штаммов. Нитрогеназа (EC 1.18.6.1), обеспечивающая фиксацию молекулярного азота, аннотирована только в геномах штаммов *Oscillochloris* и *Roseiflexus*, так же, как и карбоангидраза (EC 4.2.1.1). Гидроксиламинредуктаза (EC 1.7.99.1) аннотирована только для штаммов *Oscillochloris*, а нитратредуктаза (EC 1.7.99.4) — только для штаммов *Roseiflexus*. Большинство ферментов метаболизма аланина, аспартата и глюконата аннотированы в геномах всех сравниваемых штаммов, однако аланиндегидрогеназа (EC 1.4.1.1) аннотирована

только у штаммов *Roseiflexus*, а аланинтрансминаза (EC 2.6.1.2) — только у штаммов *Oscillochloris*.

Отсутствие генов, детерминирующих ферменты ассимиляционной и диссимиляционной нитратредукции в геномах культивируемых штаммов родов *Chloroflexales* и *Oscillochloris*, объясняет ранее полученные экспериментальные данные о неспособности АФНБ этих родов расти на средах, содержащих окисленные соединения азота. В то же время, подтверждаются сведения об использовании восстановленных соединений азота (аммония, мочевины, глутамата и ряда аминокислот) для роста штаммов родов *Chloroflexus* и *Oscillochloris* (Heda, Madigan, 1986; Кеппен и соавт., 1993; Кеппен et al., 2000). Результатам сравнительного геномного анализа соответствуют также ранее полученные данные о неспособности АФНБ рода *Chloroflexus* к фиксации молекулярного азота (Heda, Madigan, 1986) и, наоборот, способности к этому пути метаболизма азота АФНБ рода *Oscillochloris* (Кеппен и соавт., 1989; Ivanovsky, Khatipov, 1994; Кеппен et al., 2000).

**Источники азота, используемые *Osc. trichoides* DG-6.** Источниками азота для *Osc. trichoides* DG-6 могут служить аммоний, N<sub>2</sub>, а также аминокислоты: аспарагин, глицин, глутамат, глютамин (табл. 2).

**Ассимиляция молекулярного азота у *Osc. trichoides* DG-6.** Присутствие гена *nifH*, детермини-

**Таблица 2.** Рост *Osc. trichoides* DG-6 на среде с разными источниками азота (мг белка/л)\*

Источник азота	Накопление биомассы
Аммоний	23.3
Глутамат	22.2
Аспарат	26.0
Аспарагин	11.2
Мочевина	23.4
N <sub>2</sub>	1.2

\* Время культивирования – 48 ч.

рующего ключевой фермент фиксации молекулярного азота, было выявлено ранее в экспериментах по амплификации этих генов не только для типового штамма DG-6, но и для нескольких близких к нему штаммов, также отнесенных к виду *Osc. trichoides* (Tourgova et al., 2006). Функциональная активность нитрогеназы была ранее подтверждена ростом культуры в присутствии N<sub>2</sub>, как единственного источника азота (Кеппен et al., 1989). В данной работе, на основании способности клеточной суспензии к восстановлению ацетилена, показана активность нитрогеназы при росте штамма DG-6 на N<sub>2</sub>, которая репрессируется при добавлении восстановленных соединений азота (табл. 3). Фермент нитрогеназа представлен на карте метаболизма азота в базе данных KEGG на основании данных анализа генома *Osc. trichoides* DG-6 (рис. S2a). Согласно этим данным, ранее обнаруженный ген редуктазы нитрогеназы *nifH* находится в составе генного кластера (OSCT\_0062, OSCT\_0063, OSCT\_0064, OSCT\_0065), включающего также гены субъединиц нитрогеназы (*nifD* и *nifK*) и вспомогательный гена *nifB* (рис. 1). Таким образом, в настоящее время *Osc. trichoides* DG-6 является единственным представителем порядка *Chloroflexales*, способностью к азотфиксации которого доказана как геномными данными, так и экспериментально. Однако геномные данные свидетельствуют о том, что вновь выделенные виды АНФБ “*Candidatus Oscillochloris kuznetsovii*” и “*Candidatus Oscillochloris fontis*”, “*Candidatus Chloroploca asiatica*” и “*Candidatus Viridilinea mediisalina*”, возможно, способны к diazотрофии, благодаря наличию у них кластера генов нитрогеназы (Grouzdev et al., 2018, 2019; Gaisin et al., 2019a, 2019b, 2020), гомологичного кластеру *nifHBDK* штамма *Osc. trichoides* GD-6. Учитывая,

что *nifHBDK* кластеры аннотированы также в геномах других представителей семейства *Oscillochloridaceae*, в том числе, некультивируемых и таксонов-кандидатов, можно предположить, что способность к азотфиксации является свойством, имманентным для всего этого семейства.

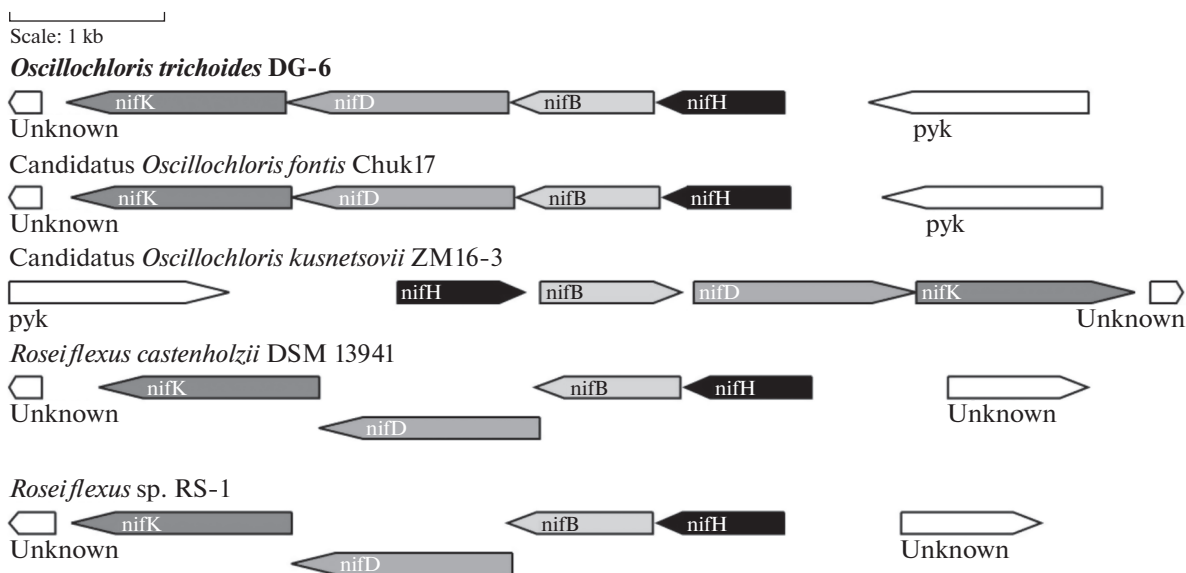
В то же время, в геномах культивируемых штаммов АФНБ рода *Roseiflexus* также аннотирован кластер нитрогеназных генов, сходный по структуре с *nifHBDK*-кластером представителей рода *Oscillochloris*, за исключением обнаруженного в нем перекрытия генов (рис. 1). При этом сведений о функциональной активности нитрогеназы у культивируемых штаммов *Roseiflexus* spp. не имеется, а типовой штамм *Rof. castenholzii* не способен расти на N<sub>2</sub> в качестве единственного источника азота (Thiel et al., 2017). Однако высказанное ранее предположение о том, что это связано с отсутствием других генов, *nifE* и *nifN*, детерминирующих минимальный набор вспомогательных белков для созревания нитрогеназы (Dos Santos et al., 2012), становится сомнительным, принимая во внимание функциональность аналогичного *nifHBDK*-кластера у штаммов *Oscillochloris*. Можно предположить, что перекрытие генов в кластере свидетельствует о мутационном процессе, связанном с потерей функциональности генов нитрогеназы у штаммов рода *Roseiflexus* в связи приспособлением их к термофильным условиям обитания.

Можно отметить, что экспериментальные свидетельства существования экстремально упрощенного, но функционального кластера генов нитрогеназы может быть существенным для потенциальных биотехнологических исследований по имплантации этих генов в геном растений.

**Ассимиляция восстановленных соединений азота у *Osc. trichoides* DG-6.** Как и у большинства фототрофных бактерий, лучший рост *Osc. trichoides* DG-6 наблюдается на средах с восстановленными соединениями азота (табл. 2). Карты путей метаболизма азота и аланина, аспартата и глутамата, основанные на анализе генома *Osc. trichoides* DG-6 в базе данных KEGG, показаны на рис. S2a, S2b. В данной работе исследовалась активность этих ферментов в клетках *Osc. trichoides* DG-6, выросших на средах с разными источниками азота (табл. 2). Полученные результаты показывают, что, несмотря на присутствие в анализируемом геноме всех генов, детерминирующих ферменты путей ассимиляции аммония, реализация этих путей у клеток, выросших с использованием раз-

**Таблица 3.** Активность нитрогеназы у *Osc. trichoides* DG-6 (нмоль/мин мг белка)

Фермент/субстрат в ростовой среде выращивания	Глутамат, 0.1%	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , 0.1% <sup>+</sup>	N <sub>2</sub>
Нитрогеназа	0.9	0.0	3.2



**Рис. 1.** Структура геномных кластеров, содержащих аннотированные *nif*-гены у представителей семейств *Oscillochloridaceae* и *Roseiflexaceae*.

личных источников азота, может различаться (рис. 2). Так же, как и у других АФНБ, аммоний может включаться в метаболизм *Osc. trichoides* DG-6, используя ГС-ГОГАТ путь. Согласно геномным данным, ферменты этого пути глутаминсинтетаза (ГС – ЕС 6.3.1.2) и глутаматсинтаза (ГОГАТ – ЕС 1.4.1.13), детерминированные каждая одним геном (OSCT\_1286 и OSCT\_0551 соответственно), присутствуют на рассматриваемых картах метаболизма (рис. S2a, S2b). Однако активность ГС обнаруживалась только при росте на среде с глутаматом (табл. 4), но не на средах с аммонием, в отличие от *Cfl. aurantiacus*, у которого измеренная активность этого фермента была даже более высокой на средах с аммонием, чем на средах с глутаматом (Kaulen, Klemme, 1983).

Согласно полученным в данной работе данным, штамм *Osc. trichoides* DG-6 при росте на среде с аммонием использует вариант ассимиляции аммония при участии глутаматдегидрогеназы (рис. 2). Глутаматдегидрогеназы (ГДГ – ЕС 1.4.1.2 и 1.4.1.4), детерминируются единственным геном (OSCT\_0145), аннотированном в геноме *Osc. trichoides* DG-6 (рис. S2a, S2b). Продукт экспрессии этого гена имеет двойную субстратную специфичность и может использовать для реализации реакции как НАД, так и НАДФ. Двукратное увеличение активности НАД-зависимой изоформы фермента в экстрактах клеток, выросших на среде с аммонием, может указывать на ее преимущественное участие в ассимиляции данного субстрата (табл. 4).

При росте *Osc. trichoides* DG-6 на среде с глутаматом в качестве единственного источника азота, в клетках обнаруживаются все ферменты, необхо-

димые для реализации ГС-ГОГАТ пути (табл. 4). Однако для осуществления глутаминсинтетазной реакции необходим отсутствующий в среде аммоний, источником которого может служить глутаматдегидрогеназная реакция (рис. 2), поскольку активность обоих изоферментов ГДГ обнаружена и в клетках, выросших на среде с глутаматом (табл. 4).

По-видимому, ГС-ГОГАТ путь у *Osc. trichoides* реализуется также в процессе азотфиксации. Однако для доказательства этого утверждения требуются дополнительные исследования.

Ген аланиндегидрогеназы (АДГ – ЕС 1.4.1.1) у *Osc. trichoides* не аннотирован, что исключает участие

**Таблица 4.** Активность ферментов, участвующих в ассимиляции аммония у *Osc. trichoides* DG-6 (нмоль/мин мг белка)

Фермент/ источник азота	Глутамат, 0.1%	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , 0.1% <sup>+</sup>
ГДГ НАДН	3.2	6.5
ГДГ НАД(Ф)Н	3.2	2.0
ГОГАТ НАДН	1.9	2.0
ГОГАТ НАД(Ф)Н	0.9	2.0
ГС	20.2	0.0
ГА	4.0	4.9
ГОТ	42.1	70.5
ГПТ	47.3	7.8

Примечание. Активность ферментов в клетках, выросших на среде с молекулярным азотом, не измеряли вследствие недостатка биомассы, синтезируемой в этих условиях.

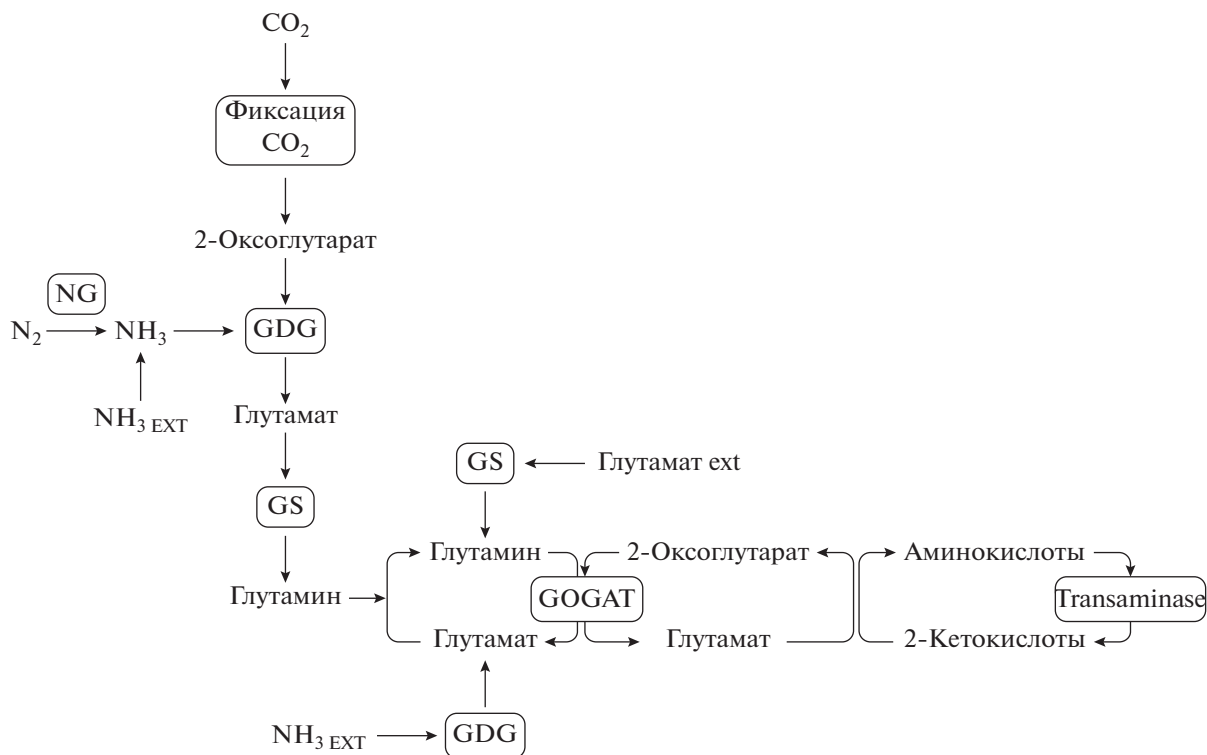


Рис. 2. Азотный метаболизм *Osc. trichoides* DG-6 при использовании различных источников азота.

этого фермента в процессе ассимиляции аммония у этой АФНБ, так же как и у *Cfl. aurantiacus*, в геноме которого этот ген также не аннотирован, а активность фермента не обнаружена (Kaulen, Klemme, 1983). Однако у *Osc. trichoides* аннотирован ген аланинтрансаминазы (ГПТ – ЕС 2.6.1.2) что отличает *Osc. trichoides* от других культивируемых штаммов представителей порядка *Chloroflexales*. Активность этого фермента была более высокой на среде с глутаматом, чем на средах с аммонием, аналогично другому ферменту – аспартаттрансаминазе (ГОТ – ЕС 2.6.1.1) (табл. 4). Высокие активности ферментов трансаминирования согласуются со способностью *Osc. trichoides* использовать для роста аминокислоты в качестве источников азота.

Полученные в данной работе данные об особенностях азотного метаболизма *Osc. trichoides* DG-6 при использовании различных источников азота суммированы в рис. 2.

Можно заключить, что комплексные исследования генетических и ферментативных аспектов органического N-метаболизма позволяют прояснить экологические и эволюционные особенности АФНБ семейства *Oscillochloridaceae* и возможность использования их метаболический потенциал в биотехнологии.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-54-12031 НННО\_а).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кеппен О.И., Лебедева Н.В., Трошина О.Ю., Родионов Ю.В. Нитрогеназная активность нитчатой фототрофной зеленой бактерии // Микробиология. 1989. Т. 58. С. 520–521.
- Кеппен О.И., Лебедева Н.В., Трошина О.Ю., Родионов Ю.В. The nitrogenase activity of filamentous phototrophic green bacterium // Microbiology (Moscow). 1989. V. 58. P. 520–521.
- Кеппен О.И., Баулина О.И., Лысенко А.М., Кондратьева Е.Н. Новая зеленая бактерия, относящаяся к семейству *Chloroflexaceae* // Микробиология. 1993. V. 62. P. 267–275.

- Keppen O.I., Baulina O.I., Lysenko A.M., Kondratieva E.N. A new green bacterium belonging to the *Chloroflexaceae* family // *Microbiology (Moscow)*. 1993. V. 62. P. 179–185.
- Dos Santos P.C., Fang Z., Mason S.W., Setubal J.C., Dixon R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes // *BMC Genomics*. 2012. V. 13. Art. 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-162>
- Gaisin V.A., Burganskaya E.I., Grouzdev D.S., Ashikhmin A.A., Kostrikin N.A., Bryantseva I.A., Koziyeva V.V., Gorlenko V.M. “*Candidatus Viridilinea mediisalina*”, a novel phototrophic *Chloroflexi* bacterium from a Siberian soda lake // *FEMS Microbiol. Lett.* 2019a. V. 366. Art. fnz043. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz043>
- Gaisin V.A., Burganskaya E.I., Grouzdev D.S., Osipova N.S., Ashikhmin A.A., Sinetova M.A., Krutkina M.S., Bryantseva I.A., Sukhacheva M.V., Kochevkova T.V., Koziyeva V.V., Kalashnikov A.M., Gorlenko V.M. “*Candidatus Oscillochloris fontis*”: a novel mesophilic phototrophic *Chloroflexota* bacterium belonging to the ubiquitous *Oscillochloris* genus // *FEMS Microbiol. Lett.* 2019b. V. 366. Art. fnz097. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz097>
- Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Krutkina M.S., Ashikhmin A.A., Sinetova M.A., Osipova N.S., Koziyeva V.V., Gorlenko V.M. “*Candidatus Oscillochloris kuznetsovii*” a novel mesophilic filamentous anoxygenic phototrophic *Chloroflexales* bacterium from Arctic coastal environments // *FEMS Microbiol. Lett.* 2020. V. 367. Art. fnaa158. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa158>
- Grouzdev D.S., Burganskaya E.I., Krutkina M.S., Sukhacheva M.V., Gorlenko V.M. Genome sequence of “*Candidatus Viridilinea halotolerans*” Chok-6, isolated from a saline sulfide-rich spring // *Microbiol. Resour. Announc.* 2019. V. 8. Art. e01614-18. <https://doi.org/10.1128/mra.01614-18>
- Grouzdev D.S., Rysina M.S., Bryantseva I.A., Gorlenko V.M., Gaisin V.A. Draft genome sequences of “*Candidatus Chloroploca asiatica*” and “*Candidatus Viridilinea mediisalina*”, candidate representatives of the *Chloroflexales* order: phylogenetic and taxonomic implications // *Stand. Genom. Sci.* 2018. V. 13. <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0329-8>
- Hanada S. The phylum *Chloroflexi*, the family *Chloroflexaceae*, and the related phototrophic families *Oscillochloridaceae* and *Roseiflexaceae* // *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea* / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 515–532.
- Heda S.D., Madigan M.T. Utilization of amino acids and lack of diazotrophy in the thermophilic anoxygenic phototroph *Chloroflexus aurantiacus* // *J. Gen. Microbiol.* 1986. V. 132. P. 2469–2473. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa158>
- Ivanovsky R.N., Khatipov E.-A.A. Evidence of covalent modification of glutamine synthetase in the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. V. 122. P. 115–119. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07153.x>
- Kaulen H., Klemme J.-H. No evidence of covalent modification of glutamine synthetase in the thermophilic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1983. V. 201. P. 75–79. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00092.x>
- Keppen O.I., Baulina O.I., Kondratieva E.N. *Oscillochloris trichoides* neotype strain DG-6 // *Photosyn. Res.* 1994. V. 41. P. 29–33. <https://doi.org/10.1007/BF02184143>
- Keppen O.I., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Ivanovsky R.N., Gorlenko V.M. Proposal of *Oscillochloridaceae* fam. nov. on the basis of a phylogenetic analysis of the filamentous anoxygenic phototrophic bacteria, and emended description of *Oscillochloris* and *Oscillochloris trichoides* in comparison with further new isolates // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 1529–1537. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1529>
- Klatt C.G., Liu Z., Ludwig M., Kühl M., Jensen S.I., Bryant D.A., Ward D.M. Temporal metatranscriptomic patterning in phototrophic *Chloroflexi* inhabiting a microbial mat in a geothermal spring // *ISME J.* 2013. V. 7. P. 1775–1789. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.52>
- Nishihara A., Thiel V., Matsuura K., McGlynn S.E., Haruta S. Phylogenetic diversity of nitrogenase reductase genes and possible nitrogen-fixing bacteria in thermophilic chemosynthetic microbial communities in Nakabusa hot springs // *Microb. Environ.* 2018. V. 33. P. 357–365. <https://doi.org/10.1264/jsmme2.ME18030>
- Tang K.-H., Barry K., Chertkov O., Dalin E., Han C.S., Hauser L.J., Honchak B.M., Karbach L.E., Land M.L., Lapidus A., Larimer F.W., Mikhailova N., Pitluck S., Pierson B.K., Blankenship R.E. Complete genome sequence of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* // *BMC Genomics*. 2011. V. 12. P. 334. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-334>
- Thiel V., Hügler M., Ward D.M., Bryant D.A. The dark side of the Mushroom Spring microbial mat: Life in the shadow of chlorophototrophs. II. Metabolic functions of abundant community members predicted from metagenomic analyses // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 943. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00943>
- Tourova T.P., Spiridonova E.M., Slobodova N.V., Boulygina E.S., Keppen O.I., Kuznetsov B.B., Ivanovskii R.N. Phylogeny of anoxygenic filamentous phototrophic bacteria of the family *Oscillochloridaceae* as inferred from comparative analyses of the *rrs*, *cbbL*, and *nifH* genes // *Microbiology (Moscow)*. 2006. V. 752. P. 192–200. <https://doi.org/10.1134/S0026261706020135>
- van der Meer M.T.J., Klatt C.G., Wood J., Bryant D.A., Bateson M.M., Lammerts L., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S., Madigan M.T., Ward D.M. Cultivation and genomic, nutritional, and lipid biomarker characterization of *Roseiflexus* strains closely related to predominant *in situ* populations inhabiting Yellowstone hot spring microbial mats // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. P. 3033–3042. <https://doi.org/10.1128/JB.01610-09>

## Nitrogen Metabolism of an Anoxygenic Filamentous Phototrophic Bacterium *Oscillochloris trichoides* Strain DG-6

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

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

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

\*e-mail: mguru@mail.ru

Received February 21, 2021; revised March 23, 2021; accepted March 24, 2021

**Abstract**—The possible nitrogen sources for *Osc. trichoides* DG6, a typical strain of the *Oscillochloridaceae* family, are ammonium, N<sub>2</sub>, glutamate, asparagine, glycine, and glutamine. The assimilation of molecular nitrogen occurs with the participation of nitrogenase, the structural gene of which, *nifH*, is located in the gene cluster which also includes the genes of the *nifD* and *nifK* nitrogenase subunits and the auxiliary *nifB* gene. Considering that *nifHBDK* clusters have been also annotated in the genomes of other members of the *Oscillochloridaceae* family, including uncultured and candidate taxa, it can be assumed that the ability to fix nitrogen is a property immanent for this entire family. The pathways for assimilating ammonium in the cells grown using different nitrogen sources may differ. *Osc. trichoides* DG6 growing in a medium containing ammonium assimilated it with the participation of glutamate dehydrogenase, which is determined by a single gene. The expression product of this gene has dual functionality and can be used to implement the reaction with both NAD and NADP. With the growth of *Osc. trichoides* DG6 on a medium with glutamate as the only nitrogen source all the enzymes necessary for the implementation of the GS–GOGAT pathway were found in the cells. However, for the glutamine synthetase reaction, ammonium, which was absent in the growth medium, was required. The source of ammonium may be glutamate metabolized through glutamate dehydrogenase.

**Keywords:** anoxygenic filamentous phototrophic bacteria, *Oscillochloris*, nitrogen metabolism, assimilation of N<sub>2</sub> and ammonium



## *FERVIDICOCOCUS FONTIS* 3639Fd – ПЕРВАЯ КРЕНАРХЕОТА, СПОСОБНАЯ РАСТИ НА ЛИПИДАХ

© 2021 г. А. И. Карасева<sup>a, b</sup>, А. Г. Ельченинов<sup>b</sup>, А. А. Перевалова<sup>b</sup>, К. С. Заюлина<sup>b</sup>,  
Т. В. Кочеткова<sup>b, \*</sup>, И. В. Кубланов<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Московский физико-технический институт, Физтех-школа биологической и медицинской физики,  
Долгопрудный, 141700 Россия

<sup>b</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: kochetkova.tatiana.v@gmail.com

Поступила в редакцию 11.12.2020 г.

После доработки 13.03.2021 г.

Принята к публикации 15.03.2021 г.

К настоящему времени способность прокариот расти на липидах показана только для представителей бактерий. Единственным исключением является *Thermococcus sibiricus*, представитель филума *Euryarchaeota*, выделенный из высокотемпературной нефтедобывающей скважины и способный расти на оливковом масле. В данной работе из горячего источника Камчатки нами была выделена чистая культура строгой анаэробной археи, штамм 3639Fd (=VKM В-3509, =KСТС 25228), растущей на различных липидах (трибутирине, триолеине, кунжутном, хлопковом и подсолнечном маслах) при 70°C и pH 5.5–6.0. При росте на трибутирине образуется бутират, углекислый газ и водород. Согласно анализу последовательности гена 16S рРНК, а также ДНК–ДНК гибридизации *in silico*, выделенный микроорганизм является штаммом вида *Fervidicoccus fontis*, представителя филума *Crenarchaeota*. В геномах *F. fontis* 3639Fd и типового штамма этого вида, Kam940<sup>T</sup>, были обнаружены гены  $\alpha/\beta$ -гидролаз, ближайшими охарактеризованными гомологами которых являются различные карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1) – ферменты, ответственные за гидролиз липидов. Таким образом, *F. fontis* является первой кренархеотой, способной получать энергию за счет гидролиза липидных субстратов.

**Ключевые слова:** термофильные археи, экстремофилы, липазы, эстеразы, разложение липидов, *Crenarchaeota*, триглицериды, сложные эфиры, *Fervidicoccus fontis*

**DOI:** 10.31857/S0026365621040078

Липиды – сложные органические соединения, являющиеся, наряду с белками, углеводами и нуклеиновыми кислотами, основными компонентами живых клеток. Ферменты, осуществляющие гидролиз липидов, относятся к группе карбоксилэстераз (КФ 3.1.1). Карбоксилэстеразы, расщепляющие сложные эфиры с короткой цепью жирных кислот (C<sub>2</sub>–C<sub>10</sub>) часто называются эстеразами, а расщепляющие сложные эфиры с длинной цепью жирных кислот (более 10 атомов углерода) – липазами. При этом механизм действия обеих групп карбоксилэстераз одинаков: в активном центре располагается аминокислотная триада Ser–Asp(Glu)–His, которая участвует в расщеплении сложноэфирных связей (Bornscheuer, 2002). Более того, зачастую один и тот же фермент обладает обоими типами активностей (Yang et al., 2019). Помимо широкой субстратной специфичности, липазы и эстеразы не нуждаются в кофакторах и проявляют высокую активность в

органических растворителях (López-Iglesias, Gotor–Fernández, 2015).

Липазы и эстеразы имеют широкий потенциал применения: их используют в очистке сточных вод; синтезе оптически чистых соединений (фармацевтических производных, сложных эфиров и аминокислот), биодизеля и биополимеров; в производстве моющих средств, косметики, бумаги, кожи, пищевых продуктов (Bornscheuer, 2002; Anobom et al., 2014; Salihu, Alam, 2015; Cabrera, Blamey, 2018). Продажи липаз на мировом рынке достигли 590.5 млн долларов США к 2020 году при среднегодовом темпе роста 6.5% (Chandra et al., 2020).

Поиск новых липаз и/или микроорганизмов, растущих на липидах, является одним из актуальных вопросов современной биотехнологии и микробиологии. В существующих технологиях источниками этих ферментов чаще всего являются бактерии (представители родов *Bacillus*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* и др.) и

грибы (например, представители родов *Candida*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Thermomucor*). По сравнению с растениями и животными, прокариотические и грибные продуценты предпочтительнее из-за простоты культивирования и проведения генетических модификаций, большого выхода требуемого фермента и его повышенной активности (Chandra et al., 2020). Липолитические археи также являются перспективными для применения, поскольку среди архей встречается большое количество экстремофильных организмов, включая “рекордсменов”, живущих у известных нам границ параметров жизни (температуры, pH, солености, давления и т.д.). Это делает их самих и их ферменты устойчивыми к экстремальным воздействиям (Littlechild, 2015), необходимым во многих производственных процессах. Наиболее изученной группой архей в отношении липолитических свойств являются галофилы (Delgado-García et al., 2018). Что касается термофильных архей, то гены карбоксилэстераз были детектированы в геномах некоторых гипертермофилов: *Pyrococcus furiosus*, *Metallosphaera sedula*, *Pyrobaculum caldifornis*, *Aeropyrum pernix*, *Thermococcus kodakarensis*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Picrophilus torridus* (Soni et al., 2019), большинства видов рода *Sulfolobus* – *S. solfataricus* (Mandrich et al., 2007), *S. acidophilus* (Soni et al., 2019), *S. shibatae* (Huddleston et al., 1995), *S. acidocaldarius* (Sobek, Gorisch, 1988), *S. tokodai* (Suzuki et al., 2004) и *S. islandicus* (Stiefler-Jensen et al., 2017). Эстеразные и липазные активности перечисленных выше архей показаны на экстрактах их клеток, выросших на комплексных пептидных субстратах (триптоне/пептоне/дрожжевом экстракте) или сахарозе, или после экспрессии генов их карбоксилэстераз в *Escherichia coli* (Soni et al., 2019). В качестве субстрата для определения эстеразной и липазной активностей чаще всего используют трибутирин (сложный эфир глицерина и трех остатков масляной кислоты) и триолеин (сложный эфир глицерина и трех остатков олеиновой кислоты) (Hotta et al., 2002). В то же время до сих пор нет работ по культивированию архей на липидных субстратах, за исключением краткого упоминания способности гипертермофильной археи *T. sibiricus* расти на оливковом масле (Mardanov et al., 2009), не включающего четких микробиологических и генетических доказательств этого свойства.

В данной работе описывается экстремально термофильный анаэробный штамм 3639Fd, первый представитель филума *Crenarchaeota*, выделенный на трибутирине и способный расти на различных липидах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение и характеристика объекта исследования.** Штамм 3639Fd был выделен из накопи-

тельной культуры, содержащей осадки и воду из горячего источника Вертолетный (N 54°30.005, E 160°00.732; 59°C, pH 6.5), расположенного в кальдере Узон (Камчатка, Россия), и инкубированной в течение недели *in situ* с добавлением трибутирина (1/100 об./об.) (“Fluka”, США) и дрожжевого экстракта (ДЭ) (0.1 г/л) (“Хеликон”, Россия). Для последующей работы, выделения и характеристики чистой культуры использовали строго анаэробную модифицированную среду Пфеннига (Podosokorskaya et al., 2011). Пробирки со средой автоклавировали при 121°C, 101 кПа в течение 1 ч или, если в среду была добавлена сера, при 50 кПа в течение 40 мин. Растворимые субстраты: глицерин (“Химреактив”, Россия), бутират (“Sigma Aldrich”, США), ДЭ, пептон (“Хеликон”, Россия), триптон (“Диаэм”, Россия), казеин (“Реахим”, Россия), пируват (“AppliChem”, Германия), лактат (“Sigma”, США), фумарат (“Merck”, Германия), тартрат (“Fluka”, США), сукцинат (“Реахим”, Россия), малат (“Sigma Aldrich”, США), глюкозу, ксилозу, рамнозу, мальтозу, сахарозу (все “Реахим”, Россия), целлобиозу (“Sigma Aldrich”, США), галактозу (“Serva”, Германия), арабинозу (“Fluka”, США) – вносили после стерилизации в виде стерильных растворов до конечной концентрации 1 г/л. Жирорастворимые субстраты: триглицериды (трибутирин, триолеин – “Sigma”, США), пищевые масла (кунжутное, хлопковое, оливковое, подсолнечное), эфиры длинноцепочечных жирных кислот (пальмитат и стеарат – “Sigma”, США) – вносили после стерилизации по каплям до конечной концентрации 5–10 мл/л. Нерастворимые субстраты: гуаровую камедь (“CPKelco”, США), ксилан (“Megazyme”, Ирландия), аморфную целлюлозу – вносили до стерилизации до конечной концентрации 1 г/л. Чистая культура штамма 3639Fd была получена методом предельных разведений.

Все эксперименты по описанию чистой культуры проводили в 18-мл пробирках Хангейта (объем среды 10 мл) с плотными резиновыми пробками и завинчивающимися крышками в атмосфере N<sub>2</sub>. Для определения оптимальной температуры роста штамм 3639Fd инкубировали в течение трех–шести дней с трибутирином в качестве субстрата при температурах 50, 55, 60, 65, 70, 78 и 83°C и pH 6.0. Для определения оптимального pH для роста штамм инкубировали при 70°C с использованием следующих буферов: ацетатного (диапазон значений pH 3.0–5.5) (“Sigma Aldrich”, США), бикарбонатного (5.5–6.5), MOPS (7.0–7.5) (“Диаэм”, Россия) и HEPBS (8.0–8.5) (“Sigma”, США) в конечной концентрации 10 мМ. Способность штамма восстанавливать различные акцепторы электронов при росте на трибутирине проверяли с SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> (в виде солей натрия в конечной концентрации 10 мМ) или S<sup>0</sup> (1 г/л).

Параметры роста и субстратные предпочтения определяли в оптимальных для штамма условиях (70°C, pH 5.5–5.6). Для выявления роста на определенном субстрате, штамм 3639Fd последовательно переседали три раза в одних и тех же условиях. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Рост штамма оценивали прямым подсчетом клеток с использованием фазово-контрастного микроскопа Olympus CX-41RF (“Olympus”, Япония). Образование сероводорода определяли колориметрически с N,N-диметилпарафенилендиамином в модификации Трюпера и Шлегеля (Trüper, Schlegel, 1964) с использованием спектрофотометра Beckman (модель 35) при  $\lambda = 670$  нм. Летучие жирные кислоты определяли методом ГЖХ на хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение проводили на капиллярной колонке Zebtron ZB-WAXplus (“Phenomex”, США) в режиме программирования температуры. Определение сахаров и спиртов проводили при помощи ВЭЖХ на хроматографе Стайер (“Аквилон”, Россия). Разделение проводили на колонке Aminex HPLX-87H (“BioRad”, США) в изократическом режиме с элюентом 25 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и расходом 0.6 мл/мин. Регистрацию сигналов проводили двумя детекторами: рефрактометрическим Smartline 2300 (“Кнауер”, Германия) и ультрафиолетовым UVV 104 при 210 нм (“Аквилон”, Россия) по последовательной схеме. Газообразные продукты измеряли с помощью “3700” модифицированного газового хроматографа (“ЗАО РАС”, Россия) с поддержкой аналитического ПО Phoenix v. 3.6.0 (“BSoft”, Россия).

Штамм 3639Fd был депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером ВКМ В-3509 и в Корейской коллекции типовых культур (КСТС) под номером КСТС 25228.

**Выделение геномной ДНК.** Для выделения геномной ДНК штамма 3639Fd клетки, находящиеся на ранней стационарной фазе, собирали центрифугированием при 9000 об./мин в течение 15 мин. Осадок ресуспендировали в буфере TNE (10 мМ Трис-НСl, 10 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА; pH 8.0), добавляли протеиназу К (100 мкг/мл), SDS (0.5% по объему), 0.015 М ЭДТА и инкубировали смесь при 50°C в течение 1 ч. К инкубационной смеси добавляли смесь фенол–хлороформ (1 : 1), перемешивали и центрифугировали при 9000 об./мин в течение 15 мин. Супернатант дважды экстрагировали равным объемом хлороформа, затем к водной фазе добавляли 1/10 часть 3 М ацетата Na (pH 5.2) и 2 части 96% этанола. Полученную слизь (или “медузу”) собирали стерильным шпателем, два раза промывали в 70% этаноле, подсушивали и растворяли в стерильном TE буфере (10 мМ Трис-

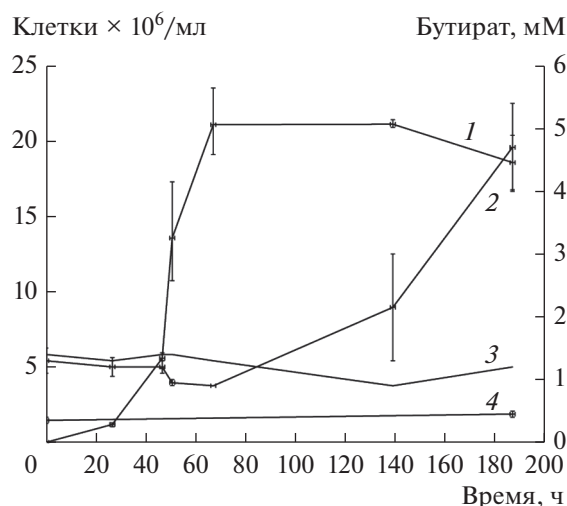
НСl, 1 мМ ЭДТА; pH 8.0). Полученную ДНК обрабатывали раствором РНК-азы А (10 мкг/мл), для этого смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C, затем ДНК дважды экстрагировали равным объемом хлороформа и “высаживали” 96% этанолом, дополнительно промывали 70% этанолом и растворяли в стерильной воде. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (“Invitrogen/Life Technologies”, США).

**Секвенирование и сборка генома** были выполнены с помощью высокопроизводительной технологии Illumina. Геномная ДНК штамма 3639Fd была фрагментирована на участки размером ~500 п.н. с использованием ультразвукового гомогенизатора BioRuptor® UCD-200 (“Diagenode”, Бельгия). Библиотеки были подготовлены с использованием NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep kit for Illumina® (“New England Biolabs”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Библиотеки клонов секвенировали на MiSeq Sequencing System (“Illumina”, США) с помощью 2 × 150 bp reagent kit. После фильтрации по качеству с использованием CLC Genomic Workbench 10.0 (“Qiagen”, Германия) было получено 1307626 прочтений.

Сборку генома проводили с использованием программы SPAdes 3.13.0 (Antipov et al., 2016). На конечном этапе было получено 10 контигов, общий размер которых составлял 1248168 п.н. Последовательность генома была депонирована в GenBank под номером JADEZV000000000.1.

Аннотацию генома проводили с помощью пайплайна NCBI PGAP (Arefiev et al., 2020). Сравнительные анализы, основанные на полной последовательности генома, выполняли следующим образом: среднее сходство по нуклеотидам (ANI) вычисляли с использованием модуля ruani 0.2.8 с выбором метода ANIb (Pritchard et al., 2016); среднее сходство по аминокислотам (AAI) – с помощью скрипта aai.rb (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2016); *in silico* ДНК–ДНК гибридизацию – с использованием сервера GGDC 2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013) с выбором BLAST+ в качестве метода выравнивания.

Для определения пан-геномов штаммов *F. fontis* Kam940<sup>T</sup> и 3639Fd использовали пакет Proteinortho 5.16 (Lechner et al., 2011) со следующими параметрами: 95% сходство последовательностей (нижняя граница для одного вида по AAI), 50% взаимное покрытие. Визуализацию анализа проводили в пакете Venn (<https://cran.r-project.org/web/packages/venn/index.html>). Для уникальных белков определяли распределение по функциональным категориям COG (clusters of orthologous groups) с использованием webMGA (Wu et al., 2011). Выравнивание последовательностей генов проводили с помощью алгоритма Mafft v. 7 (Kato, Standley, 2002).



**Рис. 1.** Рост *Fervidococcus fontis* 3639Fd (1) и образование бутирата (2) на трибутирине в оптимальных условиях (рН 5.6, 70°C, 0.1 г/л ДЭ). Концентрация бутирата в контрольных образцах: на незасеянной среде с трибутирином (3) и на среде, выросшей на 1.0 г/л ДЭ (4).

**Проверка способности представителей рода *Fervidococcus* к росту на липидах.** Типовой штамм *Fervidococcus fontis* Kam940<sup>T</sup> (=DSM 19380<sup>T</sup>, =VKM В-2539<sup>T</sup>), а также имеющиеся в коллекции лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот (ФИЦ Биотехнологии РАН) штаммы этого рода (FoA-16 и 1507) проверяли на способность расти на липидных субстратах на той же минеральной среде (Podosokorskaia et al., 2011) и при оптимальных для каждого отдельного штамма условиях: Kam940<sup>T</sup> — при рН 5.6 с добавлением 0.2 г/л ДЭ при 70°C; FoA-16 — при рН 4.8, с добавлением 0.1 г/л ДЭ при 78°C; штамм 1507 — при рН 6.0 с добавлением 0.1 г/л ДЭ при 70°C. Для выявления роста на определенном субстрате, штаммы последовательно пересеивали три раза в одних и тех же условиях. Все эксперименты проводили в двух повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выделение и характеристика штамма 3639Fd.

Штамм 3639Fd был выделен на трибутирине с добавлением 0.05 г/л ДЭ при 70°C и рН 5.5 методом предельных разведений и представлял собой небольшие кокки правильной формы. Выделенный штамм оказался экстремально термофильным, умеренно ацидофильным микроорганизмом, растущим в диапазоне температур от 55 до 83°C и рН от 4.5 до 6.5 с оптимумом при 70°C и рН 5.5–5.6. Архея облигатно зависела от присутствия в среде дрожжевого экстракта (ДЭ) в оптимальной концентрации 0.1 г/л.

Штамм 3639Fd был способен расти на трибутирине с образованием бутирата (рис. 1), достигая максимального урожая клеток  $2.1 \pm 0.3 \times 10^7$  кл./мл за 67 ч при оптимальных условиях (70°C, рН 5.6, 0.1 г/л ДЭ). Также во время роста на трибутирине наблюдали образование  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$  (данные не показаны). Минимальное время удвоения в данных условиях составило 1.2 ч. Урожай клеток на фоновой среде с 0.1 г/л ДЭ без добавления трибутирина составлял  $0.3 \pm 0.05 \times 10^7$  кл./мл (рис. 2). При росте на трибутирине с серой плотность клеток увеличивалась вдвое ( $5.4 \pm 0.5 \times 10^7$  кл./мл) и отмечалось образование сероводорода. Тиосульфат незначительно стимулировал рост штамма ( $3.2 \pm 0.2 \times 10^7$  кл./мл), присутствие сульфата не оказывало влияния, а сульфит ингибировал рост штамма на трибутирине. 3639Fd также рос на триолеине ( $1.4 \pm 0.03 \times 10^7$  кл./мл) и некоторых маслах: кунжутном ( $1.1 \pm 0.1 \times 10^7$  кл./мл), хлопковом ( $1.1 \pm 0.2 \times 10^7$  кл./мл) и подсолнечном ( $0.9 \pm 0.15 \times 10^7$  кл./мл) (рис. 2). Помимо липидов, штамм 3639Fd сбраживал триптон ( $1.2 \pm 0.3 \times 10^7$  кл./мл), казеин, ДЭ ( $2 \pm 0.5 \times 10^7$  кл./мл); органические кислоты, в том числе бутират ( $1 \pm 0.05 \times 10^7$  кл./мл); моно- и дисахара. Штамм не рос на глицерине, оливковом масле, пептоне, полисахаридах. Неспособность к росту на оливковом масле, при том, что микроорганизм рос на чистом триолеате, возможно, обусловлена присутствием в его составе неизвестных примесей, которые могли ингибировать рост данной археи.

**Филогенетическое и таксономическое положение штамма 3639Fd.** Последовательность гена 16S рРНК штамма 3639Fd оказалась идентичной на 99.93% последовательности гена *Fervidococcus fontis* Kam940<sup>T</sup> (Perevalova et al., 2010). Значения AAI, ANI и *in silico* ДНК–ДНК гибридизации для штамма 3639Fd и *F. fontis* Kam940<sup>T</sup>, составили 99.38, 99.63 и 97.1% соответственно. Такие значения превышают пороговые для отдельных видов — 95% по AAI (Konstantinidis, Tiedje, 2005), 95% по ANI (Kim et al., 2014), 70% по ДДГ (Wayne et al., 1987). Таким образом, основываясь на сходстве последовательностей генов 16S рРНК и полногеномных сравнениях, штамм 3639Fd был отнесен к виду *F. fontis*.

**Анализ генома *Fervidococcus fontis* 3639Fd и генетические доказательства способности гидролизовать липиды.** Согласно аннотации PGAP геном *F. fontis* 3639Fd состоит из 1385 генов, включая 1322 белок-кодирующих генов, 48 РНК (3 рРНК, 43 тРНК, 2 нкРНК) и 15 псевдогенов. Поскольку фенотипически штамм 3639Fd отличается от типового штамма Kam940<sup>T</sup>, а среднее сходство их геномов и протеомов довольно высоко (ANI и AAI = 99.63, 99.38% соответственно), было решено определить общую (core genome) и уни-

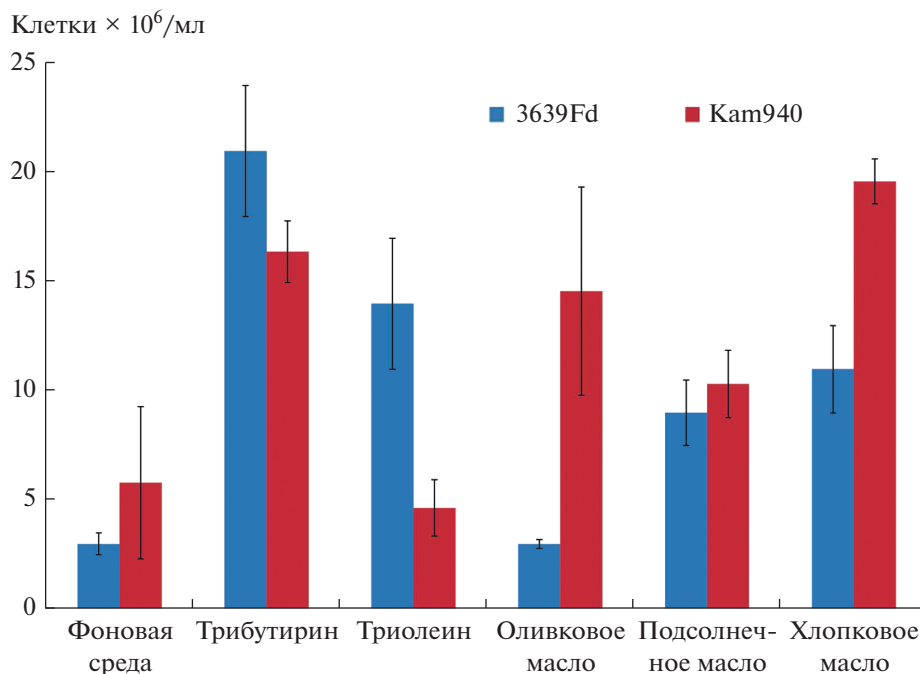


Рис. 2. Рост *Fervidicoccus fontis* Кам940<sup>T</sup> (красные/черные столбики) и 3639Fd (синие/серые столбики) на липидных субстратах.

кальную часть генома вида *F. fontis*. Оказалось, что 1125 белков являются общими; в то же время 159 найдены только у штамма Кам940<sup>T</sup>, 111 – у штамма 3639Fd (рис. 3). Распределение уникальных для каждого из штаммов белков по функциональным категориям COG (рис. 4) показало, что количество белков большинства групп (категории F, I, K, L, M и R) примерно равное. В то же время белки, входящие в категории E (метаболизм и транспорт аминокислот) и H (метаболизм и транспорт кофакторов), более многочисленны у штамма 3639Fd. И, наоборот, белки категории C (образование и запасание энергии), P (метаболизм и транспорт неорганических ионов) и S (неизвестная функция) сильнее представлены в штамме Кам940<sup>T</sup>.

Поскольку в этой работе центральным свойством штамма 3639Fd была способность расти на триглицеридах, нами были предприняты попытки обнаружения в геноме генов, кодирующих липазы/эстеразы. В геноме штамма 3639Fd обнаружен ген  $\alpha/\beta$ -гидролазы 6 семейства, ближайшими охарактеризованными гомологами которой являются различные карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1), включая моноацилглицерол-липазы из эукариот (процент сходства аминокислотной последовательности ~30–33% при покрытии ~60%). При выравнивании последовательности данной карбоксилэстеразы с представителями 15 семейств эстераз (Zarafeta et al., 2016) был определен ее каталитический мотив – GASMGG, который соответствует

семействам III и V эстераз (Zarafeta et al., 2016). Ближайшими неохарактеризованными белками являются  $\alpha/\beta$ -гидролазы из архей, включая гомолога типового штамма *F. fontis* Кам940<sup>T</sup>. В геноме 3639Fd не было обнаружено генов, кодирующих ферменты известных путей окисления глицерина и жирных кислот. Первое подтверждается, а второе не подтверждается ростовыми экспериментами, так как нами было показано, что штамм способен расти на органических кислотах. Таким образом, в

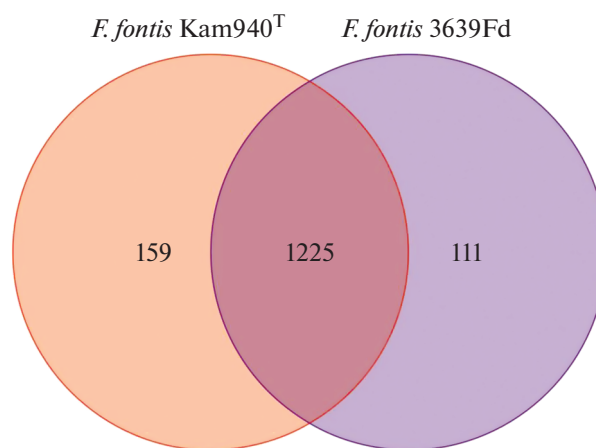


Рис. 3. Количество общих (кор-геном) и уникальных белков между штаммами *Fervidicoccus fontis* Кам940<sup>T</sup> и 3639Fd.

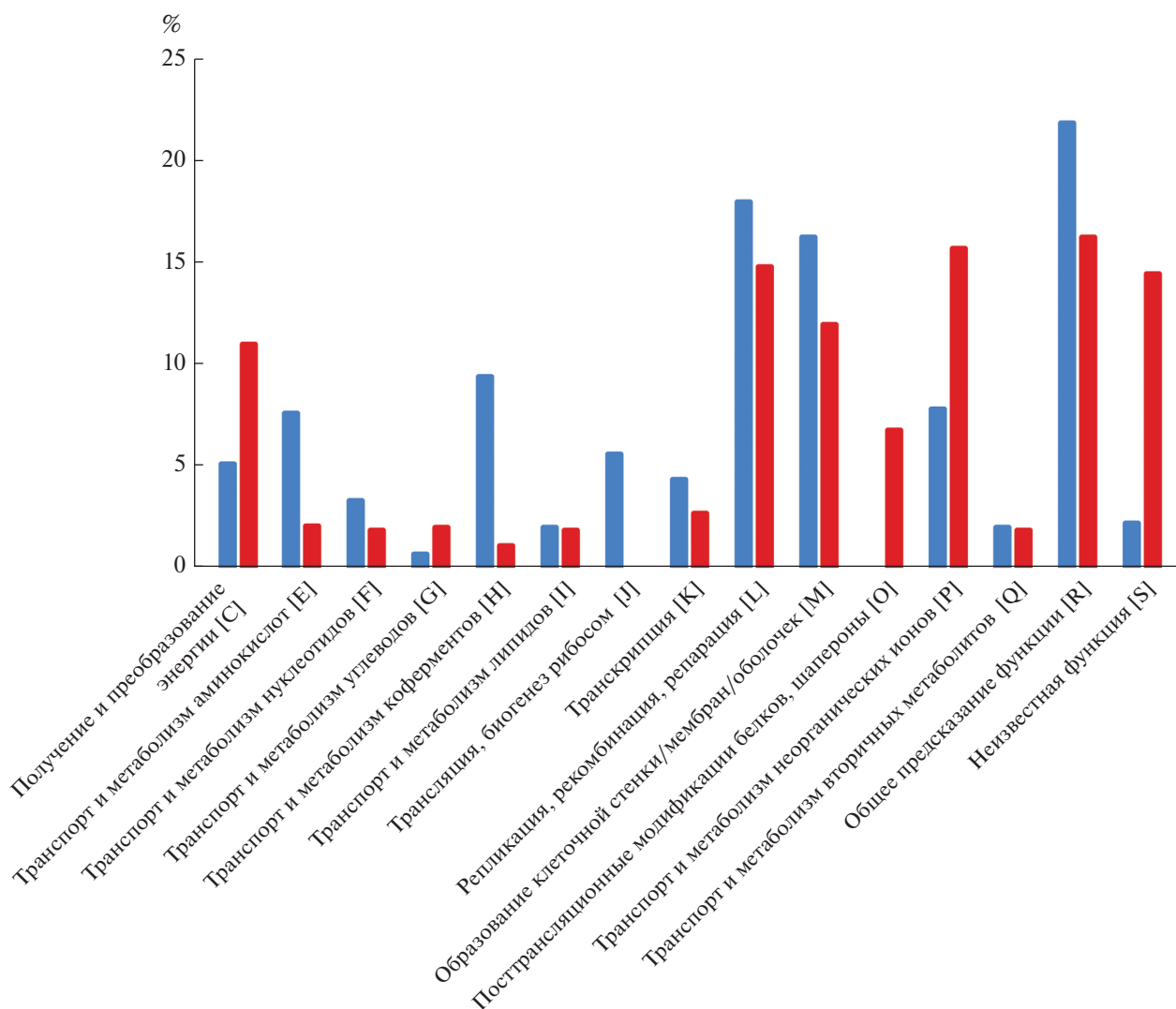


Рис. 4. Распределение уникальных белков штаммов *Fervidicoccus fontis* Kam940<sup>T</sup> (красные столбики) и 3639Fd (синие столбики) по выбранным функциональным категориям COG.

окислении этих субстратов, по-видимому, участвуют другие, пока еще неизвестные ферменты.

**Проверка способности представителей рода *Fervidicoccus* к росту на липидах.** После 4 сут инкубации при 70°C урожай клеток типового штамма *F. fontis* Kam940<sup>T</sup> на трибутирине составил  $1.6 \pm 0.1 \times 10^7$  кл./мл, на триолеине  $0.4 \pm 0.1 \times 10^7$  кл./мл, на оливковом масле  $1.4 \pm 0.4 \times 10^7$  кл./мл, на хлопковом масле  $2.0 \pm 0.1 \times 10^7$  кл./мл, на подсолнечном масле  $1.0 \pm 0.1 \times 10^7$  кл./мл, на контрольной фоновой среде (без субстрата)  $0.8 \pm 0.3 \times 10^7$  кл./мл (рис. 2). Роста штаммов *F. fontis* 1507 и FoA-16 после 7 сут культивирования на трибутирине не наблюдали. Таким образом, было показано, что кроме штамма 3639Fd, только Kam940<sup>T</sup> способен расти на некоторых липидных субстратах, таких как трибутирин и хлопковое масло.

*Fervidicoccus fontis* является единственным видом внутри порядка *Fervidicoccales* филума *Crenarchaeota*. Типовой штамм этого вида, Kam940<sup>T</sup>, был выделен из горячего источника Камчатки и рос при 70°C на белках и пептидах (Perevalova et al., 2010). Молекулярно-экологические исследования показали, что представители этого рода повсеместно встречаются в горячих источниках вулканических регионов Йеллоустонского национального парка, Камчатки, Исландии, Новой Зеландии (Lebedinsky et al., 2013), Китая (Jiang et al., 2016), а также являются преобладающим архейным представителем и в некоторых мезофильных местах обитания, например, в болотных почвах (Lv et al., 2014). Это говорит о значительной экологической роли представителей данного рода в анаэробных экотопах, где он занимает место деструктора ор-



ганики, успешно конкурируя с другими хемоорганотрофными прокариотами.

В данной работе мы показали новое свойство представителей рода *Fervidicoccus*, заключающееся в способности расти на разнообразных триглицеридах. Также в геноме 3639Fd был выявлен ген, кодирующий карбоксилэстеразу, относящуюся к III, V или новому семейству эстераз. Подобный ген был найден и в геноме *F. fontis* Кам940<sup>T</sup>, и, впоследствии, была продемонстрирована способность этого штамма расти на липидных субстратах.

Способность двух штаммов *F. fontis* расти на липидах не только расширяет представления об экологических возможностях рода *Fervidicoccus*, но и выделяет его среди всех известных культивируемых представителей *Crenarchaeota*, для которых роста на липидах не было показано. По имеющимся данным, среди других архей известен лишь один штамм, растущий на липидах (на оливковом масле) – это представитель филума *Euryarchaeota* – *Thermococcus sibiricus*. В геноме этой архей были найдены гены эстераз и липаз (Mardanov et al., 2009). Однако наш анализ четырех предполагаемых эстераз и липаз данного микроорганизма указывает на то, что ни одна из них не относится к карбоксилэстеразам и, таким образом, не может участвовать в гидролизе глицеролипидов. Одной из основных причин подобного недостатка информации о росте архей на липидных субстратах является трудоемкость выделения архей в чистые культуры и их культивирования (Макарова et al., 2019).

Дальнейший детальный анализ карбоксилэстеразы, обнаруженной в данной работе, поможет выявить механизмы липолитической активности архей и способствовать выделению новых штаммов архей-липолитиков с последующей характеристикой новых липаз, обладающих высоким биотехнологическим потенциалом.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов благодарит сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН В.В. Кеврина за помощь в определении продуктов сбраживания трибутирина.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично поддержана Российским научным фондом (грант 18-44-04024) (выделение, культивирование) и Российским фондом фундаментальных исследований и Лондонским Королевским обществом (грант 21-54-10006) (геномный анализ, определение продуктов гидролиза). АГЕ, ААП, КСЗ, ТВК и ИВК выражают признательность за поддержку со стороны Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anobom C.D., Pinheiro A.S., De-Andrade R.A., Aguiaras E.C., Andrade G.C., Moura M.V., Almeida R.V., Freire D.M.* From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases // *BioMed Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 684506.
- Antipov D., Korobeynikov A., McLean J.S., Pevzner P.A.* HybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads // *Bioinformatics.* 2016. V. 32. P. 1009–1015.
- Arefiev V., Kovalenko G., Frant M., Chumachenko T., Polyvianna Y., Pivnenko S., Bolotin V., Mayboroda O., Solodiankin O., Tarasov O., Bezymenni M., Lyon C., Redlinger M., Sapachova M., Mezhenyskiy A.A., Ducluzeau A., Bortz E., Gerilovych A., Drown D.M., Bezymenni M.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kottbus Strain Kharkiv, isolated from a commercial pork production facility in Ukraine // *Microbiol. Resour. Anounc.* 2020. V. 9. e01171-20.
- Bornscheuer U.T.* Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis // *FEMS Microbiol. Rev.* 2002. V. 26. P. 73–81.
- Cabrera M.Á., Blamey J.M.* Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments // *Biol. Resh.* 2018. V. 51. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0186-3>
- Chandra P., Singh E.R., Arora P.K.* Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review // *Microbial Cell Factories.* 2020. V. 19. P. 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Delgado-García M., Rodríguez J.A., Mateos-Díaz J.C., Aguilar C.N., Rodríguez-Herrera R., Camacho-Ruiz R.M.* Halophilic archaeal lipases and esterases: activity, stability, and food applications // *Enzymes in Food Technology.* Singapore: Springer, 2018. P. 243–262.
- Hotta Y., Ezaki S., Atomi H., Imanaka T.* Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 3925–3931.
- Huddleston S., Yallop C.A., Charalambous B.M.* The identification and partial characterization of a novel inducible extracellular thermostable esterase from the archaeon *Sulfolobus shibatae* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 216. P. 495–500.
- Jiang Z., Li P., Jiang D., Dai X., Zhang R., Wang Y., Wang Y.* Microbial community structure and arsenic biogeochemistry in an acid vapor-formed spring in Tengchong geothermal area, China // *Publ. Library Sci.* 2016. V. 11. P. e0146331.

- Katoh K., Standley D.M.* MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 772–780.
- Kim M., Oh H.S., Park S.C., Chun J.* Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 346–351.
- Konstantinidis K.T., Tiedje J.M.* Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes // *J. Bacteriol. ASM.* 2005. V. 187. P. 6258–6264.
- Lebedinsky A.V., Mardanov A.V., Kublanov I.V., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Perevalova A.A., Bidzhieva S.Kh., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G., Ravin N.V.* Analysis of the complete genome of *Fervidococcus fontis* confirms the distinct phylogenetic position of the order *Fervidococcales* and suggests its environmental function // *Extremophiles.* 2014. V. 18. P. 295–309.
- Lechner M., Findeiß S., Steiner L., Marz M., Stadler P.F., Prohaska S.J.* Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis // *BMC Bioinform.* 2011. V. 12. P. 124.
- Littlechild J.A.* Archaeal enzymes and applications in industrial biocatalysts // *Archaea.* 2015. V. 2015. P. 10.
- López-Iglesias M., Gotor-Fernández V.* Recent advances in biocatalytic promiscuity: Hydrolase-catalyzed reactions for nonconventional transformations // *Chem. Rec.* 2015. V. 15. P. 743–759.
- Ly X., Yu J., Fu Y., Ma B., Qu F., Ning K., Wu H.* A meta-analysis of the bacterial and archaeal diversity observed in wetland soils // *Sci. World J.* 2014. Art. 437684.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V.* Towards functional characterization of archaeal genome dark matter // *Biochem. Soc. Trans.* 2019. V. 19. P. 389–398.
- Mandrigh L., Pezzullo M., Rossi M., Manco G.* SSoNΔ and SsoNΔlong: two thermostable esterases from the same ORF in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*? // *Archaea.* 2007. V. 2. P. 109–115.
- Mardanov A.V., Ravin N.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G.* Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 4580–4588.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Göker M.* Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinform.* 2013. V. 14. P. 60.
- Perevalova A.A., Bidzhieva S.K., Kublanov I.V., Hinrichs K.-U., Liu X.L., Mardanov A.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A.* *Fervidococcus fontis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of *Fervidococaceae* fam. nov. and *Fervidococcales* ord. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 2082–2088.
- Pinheiro A.S., De-Andrade R.A., Aguiéiras E.C., Andrade G.C., Moura M.V., Almeida R.V., Freire D.M.* From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases // *BioMed Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 684506.
- 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.
- Pritchard L., Glover R.H., Humphris S., Elphinstone J.G., Toth I.K.* Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens // *Anal. Methods.* 2016. V. 8. P. 12–24.
- Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T.* The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // *PeerJ Preprints.* 2016. e1900v1.
- Salihu A., Alam M.Z.* Solvent tolerant lipases: A review // *Proc. Biochem.* 2015. V. 50. P. 86–96.
- Sobek H., Görisch H.* Purification and characterization of a heat-stable esterase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. // *Biochem. J.* 1988. V. 250. P. 453–458.
- Soni S., Sathe S.S., Sheth R.R., Tiwari P., Vadgama R.K.N., Odaneth A.A., Lali A.M., Chandrayan S.K.* N-terminal domain replacement changes an archaeal monoacylglycerol lipase into a triacylglycerol lipase // *Biotechnol. Biofuels.* 2019. V. 12. P. 110.
- Stiefler-Jensen D., Schwarz-Linnet T., de Lichtenberg C., Nguyen T.T., Rand K.D., Huang L., She Q., Teilum K.* The extraordinary thermal stability of EstA from *S. islandicus* is independent of post translational modifications // *Protein Sci.* 2017. V. 26. P. 1819–1827.
- Suzuki Y., Miyamoto K., Ohta H.* A novel thermostable esterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7 // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. V. 236. P. 97–102.
- Trüper H.G., Schlegel H.G.* Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae* I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1964. V. 30. P. 225–238.
- Wayne L.G., Moore W.E.C., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Murray G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., Truper H.G.* Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1987. V. 37. P. 463–464.
- Wu S., Zhu Z., Fu L., Niu B., Li W.* WebMGA: A customizable web server for fast metagenomic sequence analysis // *BMC Genomics.* 2011. V. 12. P. 444.
- Yang D., Li S., Stabenow J., Zalduondo L., Kong Y.* *Mycobacterium tuberculosis* LipE has a lipase/esterase activity and is important for intracellular growth and *in vivo* infection // *Infect. Immun.* 2019. V. 88. e00750–19.
- Zarafeta D., Moschidi D., Ladoukakis E., Gavrilov S., Chrysinina E.D., Chatziioannou A., Kublanov I., Skretas G., Kolisis F.N.* Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases // *Sci. Rep. Nature.* 2016. V. 6. P. 1–16.



***Fervidicoccus fontis* Strain 3639Fd, the First Crenarchaeon Capable of Growth on Lipids****A. I. Karaseva<sup>1,2</sup>, A. G. Elcheninov<sup>2</sup>, A. A. Perevalova<sup>2</sup>, K. S. Zayulina<sup>2</sup>,  
T. V. Kochetkova<sup>2, \*</sup>, and I. V. Kublanov<sup>2</sup>**<sup>1</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology, Phystech School of Biological and Medical Physics, Dolgoprudny, 141700 Russia*<sup>2</sup>*Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia**\*e-mail: kochetkova.tatiana.v@gmail.com*

Received December 11, 2020; revised March 13, 2021; accepted March 15, 2021

**Abstract**—Up to now, ability of prokaryotes to grow on lipids has been shown only for bacteria. *Thermococcus sibiricus*, member of the phylum *Euryarchaeota* isolated from a high-temperature oil well and capable of growth on olive oil, is the only exception. The present work reports isolation of a pure culture of a strictly anaerobic archaeon, strain 3639Fd (=VKM B-3509, =KCTC 25228) from a Kamchatka thermal spring, capable of growth on various lipids (tributylin, triolein, and sesame, cottonseed, and sunflower oil) at 70°C and pH 5.5–6.0. Growth on tributyrin resulted in formation of butyrate, CO<sub>2</sub>, and hydrogen. According to the results of the 16S rRNA gene sequencing and *in silico* DNA–DNA hybridization, the isolate was a strain of *Fervidicoccus fontis*, a species of the phylum *Crenarchaeota*. The closest characterized homologs of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase genes revealed in the genomes of *F. fontis* 3639Fd and of the type strain of this species, Kam940<sup>T</sup>, were various carboxyl esterases (EC 3.1.1), the enzymes responsible for lipid hydrolysis. Thus, *F. fontis* is the first crenarchaeon able to obtain energy by hydrolysis of lipid substrates.

**Keywords:** thermophilic archaea, extremophiles, lipases, esterases, lipid degradation, *Crenarchaeota*, triglycerides, esters, *Fervidicoccus fontis*

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА И МЕТАНОЛА  
НА СОСТАВ МЕТАНОТРОФНЫХ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР  
ИЗ ОСАДКА МЕТАНОВОГО СИПА ОЗЕРА БАЙКАЛ© 2021 г. О. В. Шубенкова<sup>а, \*</sup>, А. С. Захаренко<sup>а</sup>, Ю. П. Галачьянц<sup>а</sup>, **Г. В. Калмычков<sup>б</sup>**,  
В. Г. Иванов<sup>а</sup>, А. В. Хабуев<sup>а</sup>, Т. В. Погодаева<sup>а</sup>, С. М. Черницына<sup>а</sup>, Т. И. Земская<sup>а</sup><sup>а</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033 Россия<sup>б</sup>Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН, Иркутск, 650033 Россия

\*e-mail: olya@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 21.01.2021 г.

После доработки 16.03.2021 г.

Принята к публикации 17.03.2021 г.

Методом высокопроизводительного секвенирования V2–V3 участка гена 16S рРНК исследовано разнообразие метано- и метилотрофных бактерий при культивировании окисленного слоя донных отложений при температуре 10°C на минеральных средах с соединениями азота ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) и метанолом. В донном осадке метанотрофы представлены бактериями порядка *Methylococcales*, с доминированием рода *Methylobacter*: 6.4 и 4.6% от общего числа последовательностей соответственно. Метилотрофное сообщество состоит из представителей рода *Methylotenera* (сем. *Methylophilaceae*). Накопительные культуры, полученные на среде с аммонием и метаном, характеризовались самым высоким разнообразием метанотрофов и содержали 22 ОТЕ семейства *Methylococcaceae*, девять из которых не были обнаружены в других условиях культивирования. В целом, только 6 из 28 ОТЕ метанотрофных бактерий продемонстрировали сходство с культивируемыми *Methylobacter*, *Metyloglobulus* и *Methylomicrobium*, а остальные показали разную степень сходства (94–99%) с некультивируемыми представителями сем. *Methylococcaceae*. Присутствие в среде метанола в концентрации 0.01% привело к развитию, в основном, метилотрофных бактерий, а при концентрации метанола в среде 0.5% отмечено угнетение развития метанотрофных бактерий независимо от добавленного источника азота.

**Ключевые слова:** донные осадки, метан, метанотрофные бактерии, метилотрофные бактерии, озеро Байкал

DOI: 10.31857/S0026365621040157

Аэробные метанооксиляющие бактерии (МОБ) являются уникальной группой микроорганизмов, способных использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Это возможно благодаря наличию у них специфической ферментативной системы – метанмонооксигеназ (ММО) (Fox et al., 1989), которая существует в двух формах – растворимой (рММО), локализованной в цитоплазме, и мембранной (мММО), связанной с мембранами. ММО осуществляют первичную атаку молекулы  $\text{CH}_4$ , затем с помощью специализированных ферментов происходит его дальнейшая поэтапная трансформация через образование метанола, формальдегида и формиата в качестве интермедиатов до углекислого газа и воды (Троценко, Хмеленина, 2008).

МОБ потребляют до 80% образующегося в пресноводных и морских экосистемах  $\text{CH}_4$  (Reeburg, 2007), и являются, таким образом, мощным биологическим фильтром, препятствующим по-

ступлению этого парникового газа в водную толщу и атмосферу. В присутствии кислорода метан окисляется метанотрофными представителями *Gamma*- (МОБ I типа) и *Alphaproteobacteria* (МОБ II типа), которые широко распространены в природе (Hanson, Hanson, 1996; Гальченко, 2001), а также некоторыми представителями филума *Verrucomicrobia* (Op den Camp et al., 2009).

При исследовании природных метанотрофных сообществ показано существенное влияние на их состав и активность температуры, концентрации метана, кислорода и доступности источников азота (He et al., 2012; Grevesoeur et al., 2017). В лабораторных экспериментах отмечено, что тип источника азота оказывает влияние на формирование состава сообществ метанотрофных бактерий (Воробьев, Дедыш, 2008; Tays et al., 2018).

Азот является ключевым регулятором метанотрофии и метилотрофии в ассимиляционном и

диссимилиационном метаболизме (Kalyuzhnaya, Xing, 2018). Большинство метанотрофов ассимилируют аммоний и нитрат в качестве источников азота, некоторые представители этой группы обладают способностью связывать  $N_2$  (Tays et al., 2018). Из всех типов азотных соединений на сегодняшний день наибольшее внимание привлекает аммоний, поскольку, как полагают, он сильно влияет на активность аэробного окисления метана (Yang et al., 2020). Работы в этой области показали противоречивые результаты: ингибирование процесса окисления метана (Murase, Sugimoto, 2005), отсутствие влияния (Liikanen, Martikainen, 2003), стимуляция процесса (Bodelier et al., 2000). Метан и аммоний имеют структурное сходство, что приводит к конкурентному ингибированию ключевых ферментов окисления метана – метанмонооксигеназ и соокислению аммиака в цитотоксические продукты: гидроксилламин и нитрит (Yang et al., 2020). В работе (Dam et al., 2014) показана дифференциальная экспрессия генов, кодирующих мММО. Таким образом, влияние аммония на окисление метана в природных экосистемах является сложным процессом и во многом зависит от характеристик экосистемы и окружающей среды *in situ*.

Как отмечено выше, на начальном этапе процесса окисления метана образуется метанол. В природной среде метанол также может образовываться в результате деградации лигнина и пектина (Троценко, Хмеленина, 2008). Для морских и океанических экосистем с использованием  $^{14}C$ -меченного метанола отмечена высокая микробная ассимиляция углерода метанола в прибрежных апвеллинговых водах (Dixon et al., 2013). Показано, что в лабораторных условиях метанотрофы способны расти в присутствии метанола (Tays et al., 2018), но имеющиеся в литературе данные об отношении облигатных метанотрофов к метанолу, в силу его токсичности, весьма противоречивы (Гальченко, 2001; Tays et al., 2018).

Озеро Байкал является крупнейшим резервуаром ультрапресных поверхностных вод, составляющих около 20% мировых запасов. Как и в других пресноводных озерах, метан является конечным продуктом деструкции органического вещества (Намсараев, Земская, 2000). В последние десятилетия на дне озера обнаружены многочисленные геологические структуры, включая грязевые вулканы, нефтяные и метановые сипы (De Batist et al., 2002; Khlystov et al., 2013). Донные осадки и придонная вода в таких местах характеризуются высоким содержанием метана (Земская и соавт., 2008; Zakharenko et al., 2019), наличием кислорода, проникающего в осадок на глубину 2–3 см (Martin et al., 1998), а также повышенной минерализацией поровых вод (Погодаева и соавт., 2019). В зонах с повышенными концентрациями метана создаются

благоприятные условия для развития метанотрофных бактерий (Kadnikov et al., 2012; Zakharenko et al., 2019). С использованием метагеномного анализа геномов (MAG) в сообществе глубинного слоя водной толщи Южного Байкала выявлена значительная доля метанотрофов I типа. К настоящему времени аннотировано два генома метанотрофов порядка *Methylococcales* и один – *Methyloglobulus* sp. Baikal-deep-G142, филогенетически близкий виду *Methyloglobulus morosus*, но отличающийся от него небольшим размером генома – менее 2.5 Мб (Cabello-Yeves et al., 2020). Наши попытки получения чистой культуры *M. morosus* из озера Байкал при условиях, указанных для этого вида (Deutzmann et al., 2014), не привели к успешному результату, что, скорее всего, обусловлено особенностью его метаболизма. Однако получение чистых культур метанотрофов из холодноводного озера Байкал остается актуальной задачей.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния минеральных источников азота ( $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ ) на разнообразие метанотрофных бактерий при культивировании на средах с метаном и метанолом из окисленного слоя осадка метанового сипа Посольская Банка (Южный Байкал).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Отбор проб.** Образцы окисленного слоя поверхностных донных осадков (0–5 см) были отобраны с помощью грейфера в июле 2015 г с борта НИС “Г.Ю. Верещагин” в районе глубоководной разгрузки метана, расположенной на подводной возвышенности Посольская Банка (Южный Байкал; N 52.03568°, E 105.84337°). Пробы донных осадков для выделения ДНК упаковывали в стерильную фольгу и помещали в жидкий азот до момента их анализа в лаборатории. Поровые воды отжимали непосредственно после отбора проб, химический анализ проводили в ЦКП “Ультрамикрoанализ” (ЛИН СО РАН) с помощью жидкостного хроматографа Милихром-А-02 (Россия, Новосибирск) по методикам, описанным ранее (Zemskaya et al., 2010).

**Культивирование.** Накопительные культуры получали инкубированием образца донного осадка во флаконах объемом 120 мл, содержащих 40 мл жидкой минеральной среды Whittenbury (Whittenbury et al., 1970) следующего состава: раствор № 1 (г/л):  $MgSO_4$  – 1.0;  $CaCl_2$  – 0.2; комплекс солей железа – 0.004;  $NH_4Cl$  ( $KNO_3$ ) – 0.5 (1.0); раствор микроэлементов (Кузнецов, Дубинина, 1989); раствор № 2 (г/300 мл):  $KH_2PO_4$  – 15;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  – 15. Конечное значение pH среды 7.5. Использовали два варианта среды с разным источником азота: аммонийным (AMS) и нитратным (NMS). В среду вносили 1 см<sup>3</sup> пробы донного осадка. В качестве источника углерода в газовую

**Таблица 1.** Источники углерода и связанного азота, добавляемые в минеральную среду для культивирования

Номер образца	Минеральная среда	Источник азота и углерода в образце
1	AMS	$\text{NH}_4^+ + \text{CH}_4$
2	AMS	$\text{NH}_4^+ + \text{CH}_4 + \text{CH}_3\text{OH}$ (0.01%)
3	AMS	$\text{NH}_4^+ + \text{CH}_4 + \text{CH}_3\text{OH}$ (0.5%)
4	NMS	$\text{NO}_3^- + \text{CH}_4$
5	NMS	$\text{NO}_3^- + \text{CH}_4 + \text{CH}_3\text{OH}$ (0.01%)
6	NMS	$\text{NO}_3^- + \text{CH}_4 + \text{CH}_3\text{OH}$ (0.5%)
7	—	Без добавления источников азота и углерода Нативный осадок

фазу вводили метан 4 об. % (3 ммоль/л). Данные значения соответствуют концентрациям метана в осадках фоновых районов Байкала (Земская и соавт., 2008), а также позволяют производить измерения метана без разбавления образца, избегая большей ошибки (5%). Определение концентраций метана в газовой фазе в экспериментальных флаконах выполняли методом фазово-равновесной дегазации Head–Space Technique (Большаков, Егоров, 1987) на хроматографе “ЭХО–ПИД” (Россия). Первичное измерение концентрации метана во флаконах проводилось непосредственно на НИС “Г.Ю. Верещагин”. В качестве дополнительного источника  $\text{C}_1$ -соединений добавляли метанол в концентрациях, рекомендованных для развития большинства метанотрофов I и II типов, 0.01 и 0.5% соответственно (Гальченко, 2001). Всего исследовали 7 вариантов образцов, перечень которых представлен в табл. 1. Эксперименты проводили в трех повторностях. Для поддержания психрофильных условий культивирование проводили при 10°C в течение 5 недель в стационарных условиях на базе УНУ “Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов” ЛИИ СО РАН. О росте метанотрофных бактерий в экспериментальных культурах судили по убыли метана и образованию пленок.

**Выделение ДНК и высокопроизводительное секвенирование.** Повторности накопительных культур, в которых отмечалась убыль метана, объединяли для дальнейшего выделения ДНК. Суммарная ДНК из образца нативного донного осадка и экспериментальных накопительных культур была выделена (август 2015 г.), используя метод фенол-хлороформной экстракции (Шубенкова и соавт., 2005). До момента секвенирования (январь 2016 г.) образцы ДНК сохранялись при температуре –70°C. Для ПЦР-амплификации фрагментов гена 16S рРНК бактерий использовали праймеры 16S\_BV2f (5'-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA-3') и 16S\_BV3r

(5'-CCGCGGCTGCTGGCAC-3'), специфичные к участкам бактериальной рибосомной РНК, охватывающим гипервариабельную область V2–V3 16S рРНК. Секвенирование проводили на приборе MiSeq в ЦКП “Геномика”, г. Новосибирск.

**Биоинформатический анализ.** Обработка последовательностей 16S рРНК была выполнена с использованием программного обеспечения Mothur v.1.39.5 (Schloss et al., 2009) в соответствии с рекомендациями MiSeq SOP (Kozich et al., 2013). После фильтрации последовательностей было проведено их выравнивание, кластеризация и таксономическая идентификация с использованием базы данных SILVA 132 (<http://www.arb-silva.de>). Таксономическую сложность сообществ оценивали путем анализа кривых разрежения, отображающих зависимость числа обнаруженных флотипов от количества анализируемых последовательностей на уровне сходства 97%. Для характеристики молекулярно-генетического разнообразия были рассчитаны количество ОТЕ, Coverage (Chao) и индексы альфаразнообразия Chao1, ACE, Shannon, Simpson's Inverse Index.

Филогенетические деревья были построены с использованием метода объединения ближайших соседей (NJ) с Kimura two-parameters алгоритмом в программе MEGA версия 5.1. Данные, полученные в работе, были депонированы в архив GenBank, секцию SRA, под номерами SRR8224213–SRR8224218.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Физико-химическая характеристика исследуемого образца осадка.** Изучаемые донные отложения представлены биогенно-терригенными тонкими алевритовыми илами. На границе раздела вода–дно осадки окислены (толщина окисленного слоя около 5 см,  $E_h = 110$  мВ). Содержание кислорода в придонном слое воды составляло 11.5 мг/л,

pH 7.78. Осадок был насыщен метаном (536 ммоль/л). Температура поверхностных слоев глубоководных донных осадков постоянная 3.4°C (Голубев, 1981). В поровых водах исследованного слоя осадка ионы аммония и нитрата не выявлены.

**Статистический анализ и оценка разнообразия микробного сообщества на основе анализа библиотек генов 16S рРНК.** В результате секвенирования фрагментов региона V2–V3 гена 16S рРНК после выравнивания, кластеризации, удаления химер и удаления ОТЕ, содержащих менее 3 последовательностей, было получено 192074 последовательности со средней длиной 430 п.н. Анализ библиотек ампликонов гена 16S рРНК выявил 830 ОТЕ на уровне сходства 97%. Количество ОТЕ в образцах накопительных культур изменялось от 16 до 336, максимальное количество отмечено в сообществе природного осадка (образец 7) – 488 ОТЕ. Кривые разрежения, построенные для исследуемых библиотек на уровне сходства 97%, выходят на плато.

Индексы видового богатства (ACE, Chao) и видового разнообразия (Shannon и Invsimpson) были максимальными в образце 1. Наименее разнообразно сообщество из образца 6. Степень покрытия изменялась от 99.64% (образец 1) до 99.95% (образец 6).

**Разнообразие генов 16S рРНК представителей домена *Bacteria* в нативном образце донного осадка.** В полученной библиотеке генов 16S рРНК поверхностного осадка значительную долю всех последовательностей составляли представители филума *Proteobacteria* (63.2%) (рис. 1а, 1б). Большая их часть принадлежала классу *Gamma*proteobacteria (38%), доля представителей порядка *Methylococcales* составила 6.4%, из них 4.8% принадлежали роду *Methylobacter* (рис. 1в). Представители рода *Methylothermobacter*, являющиеся облигатными метилотрофами, в исходном образце были малочисленны (рис. 1в). Следует отметить, что последовательности *Alphaproteobacteria*, к которому относятся МОБ II, в данном образце не обнаружены.

В микробном сообществе исследуемого осадка также выявлены представители *Deltaproteobacteria* (25.2%), *Acidobacteria* (12.9%), *Actinobacteria* (10.1%), *Nitrospirae* (3.5%), *Bacteroidetes* (2%), *Nitrospinae* (1.2%), *Rocubacteria* (1.2%), *Verrucomicrobia* (1%); 4.9% составили филы, представленные в минорных количествах (рис. 1а).

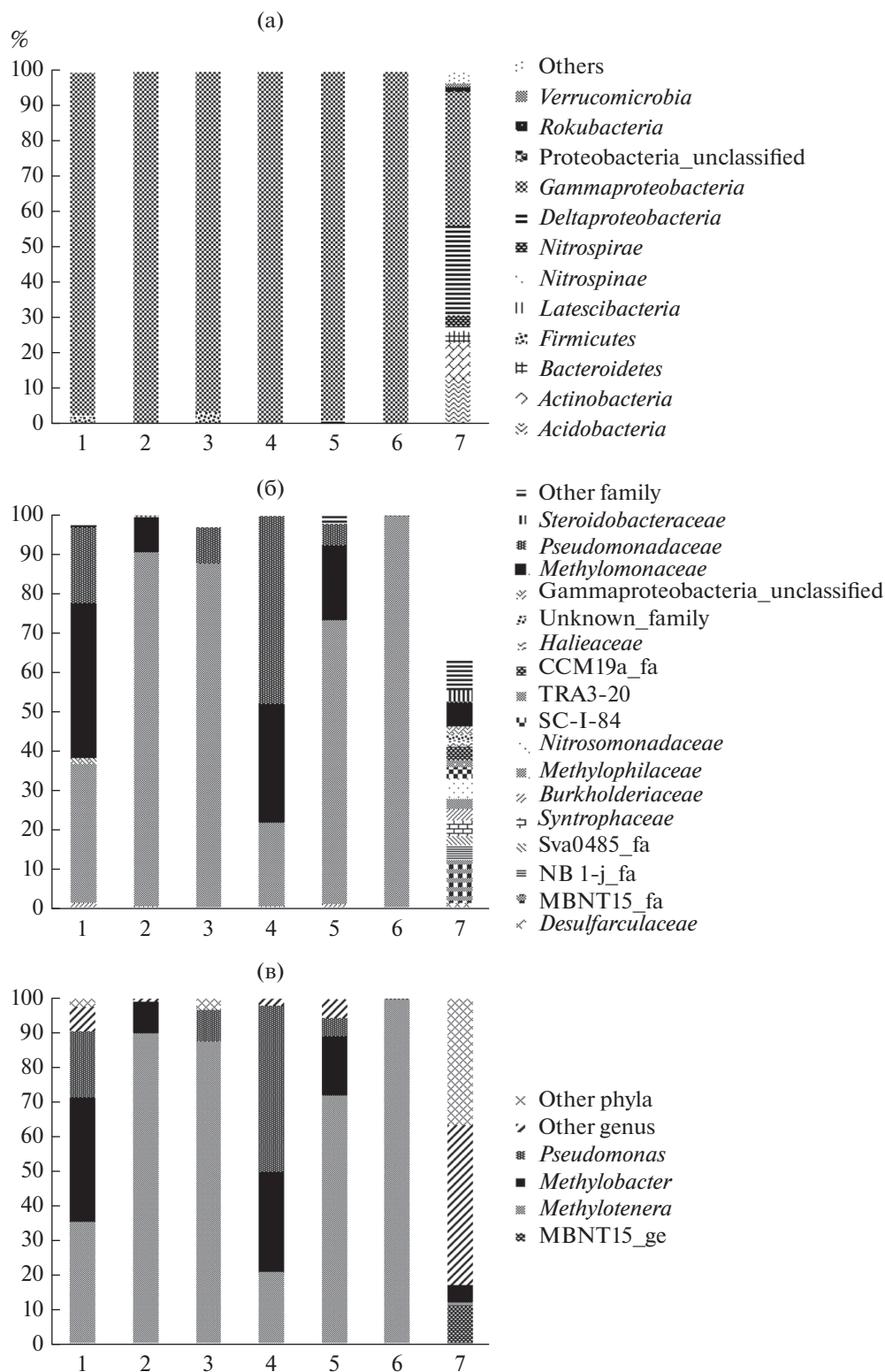
**Структура и таксономический состав микробного сообщества, полученного в условиях культивирования с различными субстратами.** При культивировании на среде с добавлением аммонийного источника азота и метана (в качестве единственного источника углерода) (образец 1) и нитратного азота и метана (образец 4) последовательности филума *Proteobacteria* составляли основную долю 97.5 и 99.8% соответственно (рис. 1а, 1б). Все они

принадлежат классу *Gamma*proteobacteria. В образце 1 процент представителей порядка *Methylococcales* выше (39.5%), чем в образце 4 (29.6%). Доля последовательностей, принадлежащих роду *Methylothermobacter*, в образце 1 также выше (35.2%), чем в образце 4 (21.1%) (рис. 1в). В образце 1 обнаружено 2.6% последовательностей, принадлежащих неклассифицированным представителям семейства *Methylococcaceae* (*Methylomonaceae*) SILVA 132 ([http:// www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)).

При культивировании на среде с добавлением аммонийного азота, метана и метанола (образец 2) и нитратного азота, метана и метанола (образец 5) в структуре сообщества наблюдалось заметное увеличение доли метилотрофных бактерий. Так в образце 2 лишь 9.2% составляли последовательности порядка *Methylococcales*, и 89.9% последовательностей принадлежало семейству *Methylophilaceae* (рис. 1б). В образце 5 процент *Methylococcales* и *Methylophilaceae* составил 18.7 и 72.4% соответственно. Также в сообществе на среде с нитратным азотом (образец 5) (рис. 1а) отмечено наличие последовательностей, принадлежащих *Deltaproteobacteria* (1%), *Pseudomonadales* (5.4%), и неклассифицированным представителям *Methylococcaceae* (1.5%). В данных образцах филогенетическое разнообразие метанотрофных бактерий было незначительным, в образце 5 детектировано 10 ОТЕ МОБ, а в образце 2 всего лишь 3 ОТЕ (рис. 2).

Культивирование на средах с содержанием метанола 0.5%, как с добавлением аммонийного азота (образец 3), так и нитратного азота (образец 6) (рис. 1а) привело к полному вытеснению метанотрофов независимо от используемого источника азота в среде. В образце 3 микробное сообщество представлено последовательностями класса *Gamma*proteobacteria (*Betaproteobacteriales* 87.6%, *Pseudomonadales* 9%) и филумом *Firmicutes* (3.4%). В образце 6 – 99.6% последовательностей принадлежало облигатному метилотрофу рода *Methylothermobacter* (рис. 1в).

Филогенетический анализ 28 ОТЕ метанотрофных бактерий, полученных для всех 7 образцов, показал, что все последовательности принадлежат семейству *Methylococcaceae* (тип I) (рис. 2). Следует отметить, что в образце 1, где был использован аммонийный источник азота и метан в качестве единственного источника углерода, развивалось более разнообразное метанотрофное сообщество. При этих условиях культивирования выявлено 22 ОТЕ (рис. 2), причем 9 из них не детектировались в других экспериментальных образцах. Мы также провели сравнение полученных последовательностей с последовательностями метанотрофных бактерий семейства *Methylococcaceae*, обнаруженных ранее в осадках и водной толще других районов Байкала (рис. 3). Филогенетический анализ показал, что полученные в эксперименте



**Рис. 1.** Сравнение таксономического состава бактериальных сообществ нативного поверхностного осадка из района метанового сипа Посольская Банка оз. Байкал и сообществ, полученных при культивировании на средах с аммонийным и нитратным источниками азота при различных концентрациях метанола: (а) на уровне филумов, (б) на уровне семейств (протеобактерии), (в) на уровне родов (протеобактерии). Данные анализа фрагментов генов 16S рРНК (SILVA 132).

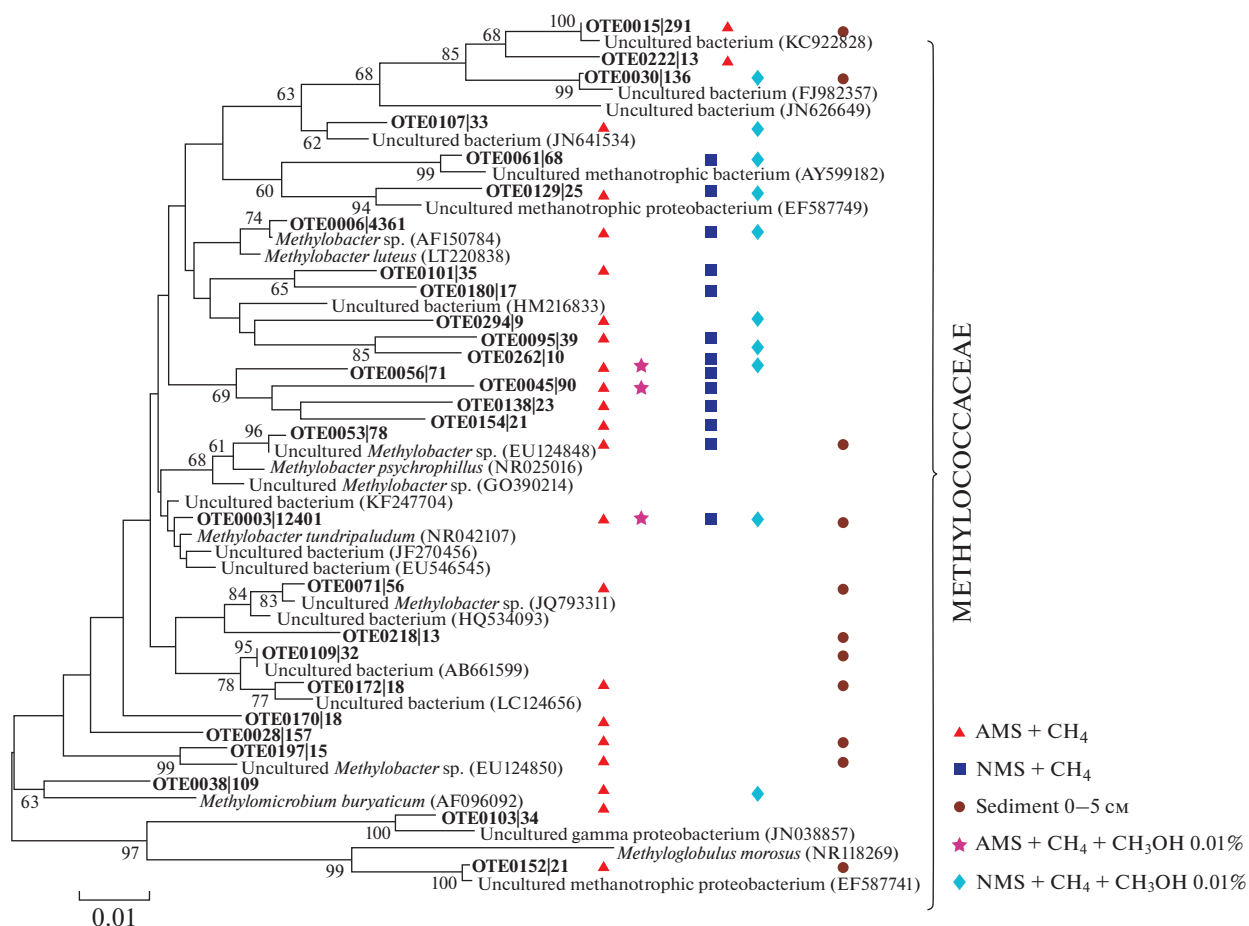


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (регион V2–V3) метанотрофных бактерий, полученных в ходе данного эксперимента. Использован метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter (500 альтернативных последовательностей).

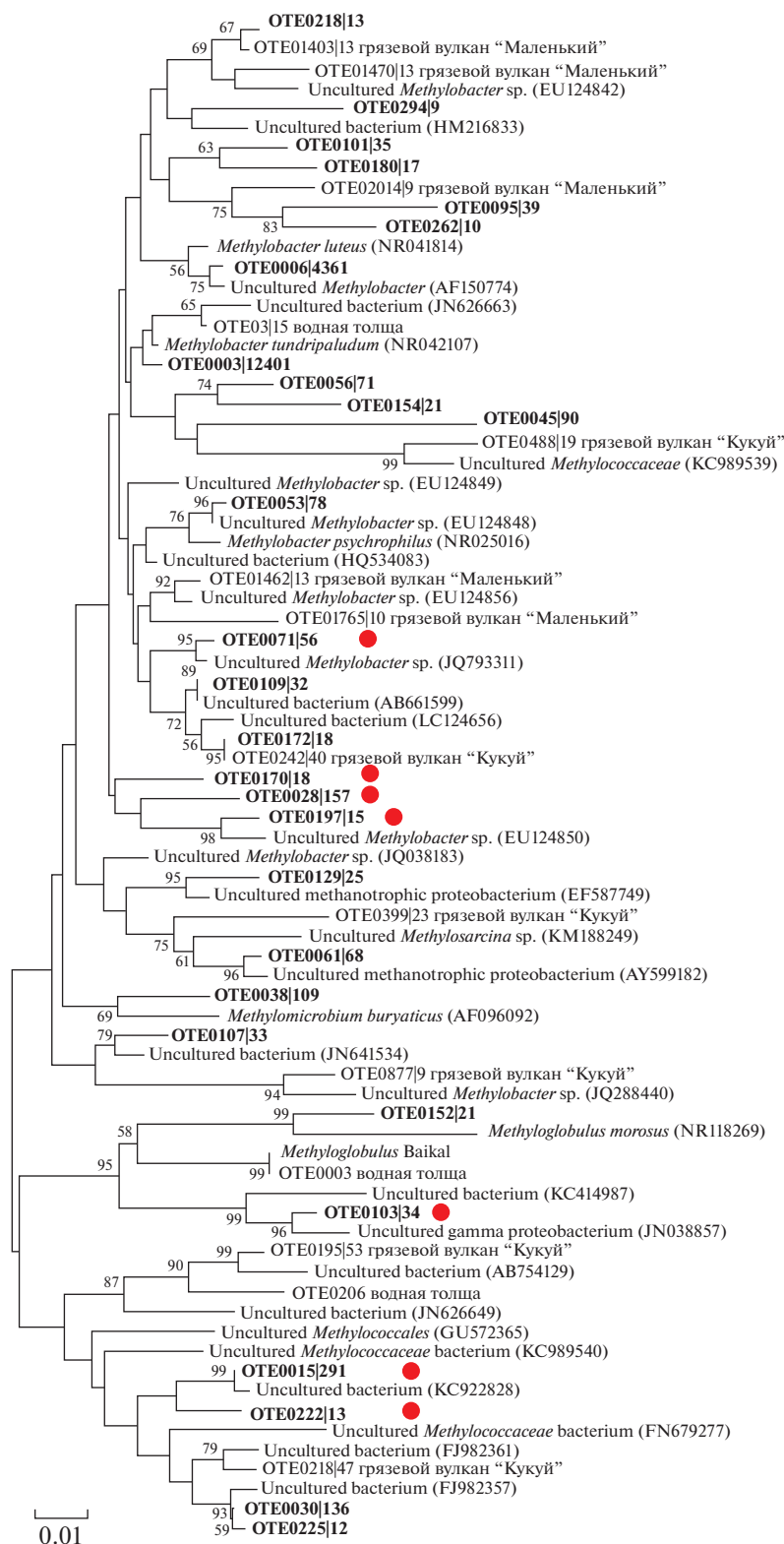
последовательности входят в кластеры байкальских метанотрофов, но 7 из 9 ОТЕ не проявили высокого сходства с байкальскими МОБ и кластеризовались с некультивируемыми *Methylococcaceae*, выявленными ранее в арктических пресноводных осадках и вечной мерзлоте.

Только 6 из 28 ОТЕ метанотрофных бактерий, выявленных нами в эксперименте, обнаружили сходство с культивируемыми МОБ (табл. 2): ОТЕ0003 (*Methylobacter tundripaludum*), ОТЕ0006 (*Methylobacter luteus*), ОТЕ0180 (*Methylobacter marinus*), ОТЕ0152 (*Methyloglobulus morosus*), ОТЕ0053 (*Methylobacter psychrophilus*) и ОТЕ0038 *Methylomicrobium buryaticum*). Остальные 22 ОТЕ проявили разную степень идентичности (94–99%) с некультивируемыми представителями рода *Methylobacter* и некультивируемыми метанотрофными бактериями сем. *Methylococcaceae*, выявленными в природных образцах пресноводных озер Вашингтон, Констанц, арктического олиготрофного озера Чар, осадков озера Бива. ОТЕ0003 была самой много-

численной (12401 последовательность), она присутствовала во всех экспериментальных образцах и принадлежала психротолерантному метанотрофу *Methylobacter tundripaludum* (сходство 99%).

В ходе филогенетического анализа библиотек генов 16S рРНК выявлено 14 ОТЕ метилотрофных бактерий, принадлежащих семейству *Methylophilaceae*. Следует отметить, что условия, где был использован аммонийный азот и метан в качестве единственного источника углерода (образец 1), также оказались более благоприятными и для развития этой группы микроорганизмов. Из 14 ОТЕ двенадцать было получено при данных условиях (рис. 4). Последовательность только одной ОТЕ принадлежала культивируемому метилотрофу *Methylotenera versatilis* (сходство 99%), изолированному из пресноводного озера Вашингтон (табл. 2), для остальных 13 ОТЕ ближайшими гомологами были некультивируемые представители *Methylophilaceae* (95–99% сходства). Самой многочисленной в метилотрофном





**Рис. 3.** Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (регион V2–V3) метанотрофных бактерий, полученных в ходе данного эксперимента (выделены жирным шрифтом) и метанотрофов, полученных ранее из осадков других районов оз. Байкал (грязевой вулкан “Маленький”, “Кукуй”) и водной толща. Знаком ● обозначены последовательности метанотрофных бактерий, которые были выявлены при культивировании на субстрате  $\text{NH}_4^+ + \text{CH}_4$ , не обнаруживались в условиях культивирования на других субстратах и не проявили высокой гомологии с последовательностями МОБ других районов оз. Байкал. Использован метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter (500 альтернативных последовательностей).

Таблица 2. Таксономическое разнообразие метанотрофов и метилотрофов в экспериментальных образцах

Номер ОТЕ/ количество прочтений	Ближайший родственник	Откуда изолирован	Сходство, %
<b>Метанотрофы</b>			
0003/12401	<i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96T (NR042107)	Арктические болота, Россия	99
0006/4361	<i>Methylobacter luteus</i> (NR041814)	Типовой штамм	99
0015/291	Uncultured bacterium (KC922828)	Подземные воды, Канада	99
0028/157	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. (GU108569)	Вода (гл. 145 м), Черное море	97
0030/136	Uncultured bacterium (FJ982357)	Метановый гидротермальный источник, оз. Йеллоустон	99
0038/109	<i>Methylomicrobium buryaticum</i> 5G (AF096092)	Содовое озеро, Тува	97
0045/90	Uncultured <i>Methylobacter</i> (JQ038188)	Заболоченные почвы, Северо-Восточный Китай	95
0053/78	<i>Methylobacter psychrophilus</i> (NR025016)	Типовой штамм	99
0056/71	<i>Methylobacter tundripaludum</i> SV96T (NR042107)	Арктические болота	97
0061/68	Uncultured methanotrophic bacterium (AY599182)	Почва, Австрия	99
0071/56	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. (JQ793311)	Арктические пресноводные осадки	99
0095/39	Uncultured bacterium (HM216833)	Осадки озера Штехлин, Германия	95
0101/35	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. (JQ793045)	Арктическое озеро Чар, Канада	97
0103/34	Uncultured bacterium (KC414987)	Песочный фильтр на водопроводной станции, Китай	97
0107/33	Uncultured bacterium (JN641534)	Осадки, США	99
0109/32	Uncultured bacterium (AB661599)	Осадки оз. Бива, Япония	100
0129/25	Uncultured methanotrophic proteobacterium (EF587749)	Осадки оз. Констанц, Германия	98
0138/23	Uncultured <i>Methylobacter</i> sp. (GQ390214)	Осадки оз. Павин, Франция	95
0152/21	Uncultured methanotrophic proteobacterium (EF587741)	Осадки оз. Констанц, Германия	99
0154/21	Uncultured bacterium (JF270456)	Осадки арктического озера, Аляска	97
0170/18	Uncultured bacterium (KF247704)	Пресноводные осадки болот, Китай	98
0172/18	Uncultured bacterium (LC124656)	Осадки оз. Маруван	99
0180/17	<i>Methylobacter</i> sp. (AF150784)	Осадки оз. Вашингтон	96
0197/15	<i>Methylobacter</i> sp. (EU124850)	Почва, дельта р. Лены, Сибирь	99
0218/13	Uncultured bacterium (HQ534093)	Арктические болота	98
0222/13	Uncultured bacterium (JN626649)	Арктические озера, Аляска	98
0262/10	<i>Methylobacter</i> sp. (AF150784)	Осадки оз. Вашингтон	97
0294/9	Uncultured bacterium (EU546545)	Осадки оз. Вашингтон	97
<b>Метилотрофы</b>			
0002/58590	Uncultured bacterium (LC124528)	Осадки оз. Бива, Япония	98
0005/4969	Uncultured <i>Methylphilaceae</i> bacterium (FN679079)	Осадки оз. Женева, Швейцария	97
0007/4264	<i>Methylotenera</i> sp. (LC368136)	Почва рисового поля, Япония	99
0008/3647	Uncultured bacterium (KC925540)	Осадки реки Уцзян, Китай	99
0009/2203	<i>Methylotenera versatilis</i> (NR074693)	Типовой штамм <i>Methylotenera versatilis</i> 301	99
0036/121	Uncultured bacterium (KJ424846)	Угленосные осадки, Германия	99

Таблица 2. Окончание

Номер ОТЕ/ количество прочтений	Ближайший родственник	Откуда изолирован	Сходство, %
0049/85	Uncultured bacterium (KP098594)	Почва рисового поля, Китай	97
0052/78	Uncultured <i>Methylophilaceae</i> bacterium (JX114343)	Почва, национальный парк, Испания	96
0057/69	Uncultured bacterium (KC922564)	Осадки в зоне разрузки подземных вод, Канада	98
0076/50	Uncultured bacterium (LC124528)	Осадки оз. Бива, Япония	98
0083/44	Uncultured bacterium (KP742409)	Горячий источник, Словакия	95
0086/43	Uncultured bacterium (JF323728)	Осадки оз. Киннерет	97
0098/37	Uncultured bacterium (KT900509)	Сточные воды, Южная Корея	95
0130/25	Uncultured bacterium (KC605970)	Подземная вода, США	95

сообществе была ОТЕ0002, формирующая на филогенетическом дереве отдельную кладу. Последовательности этой ОТЕ на 98% идентичны некультивируемой бактерии, выявленной в осадках озера Бива. ОТЕ0049, 0083, 0098 также формировали кластер с некультивируемой бактерией (КТ900509), выявленной в сточных водах (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

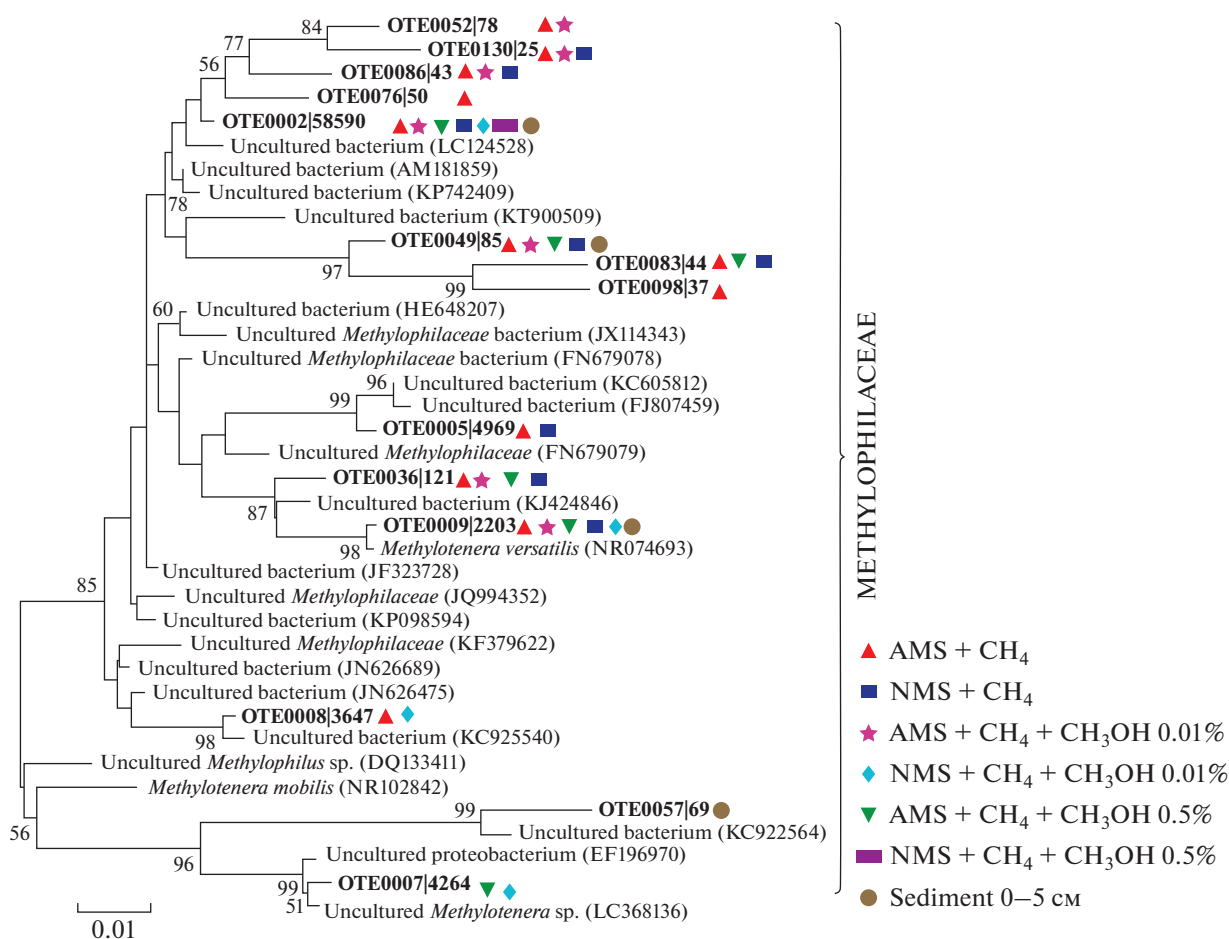
Как показано в ряде работ, источники углерода (метана и метанола) и связанного азота (аммония и нитрата) по-разному влияют на физиологию и рост метанокисляющих бактерий (Воробьев, Дедыш, 2008; Nyerges et al., 2009; TaYS et al., 2018), что подтверждается и нашими данными. Как показали эксперименты, развитие байкальского метанотрофного сообщества зависело от добавляемых в минеральную среду субстратов. Наиболее разнообразные представители *Methylococcaceae* отмечались на средах с добавлением достаточно высоких концентраций аммонийного азота (10 мМ), превышающих его содержание в осадках исследуемого района (Pogodaeva et al., 2012; Черницына и соавт., 2016). Тем не менее, это не привело к угнетению развития байкальских МОБ, а напротив, способствовало развитию более широкого спектра ОТЕ.

Известно, что в донных осадках глубоководной зоны озера Байкал концентрации азотных соединений достаточно низки (Muller et al., 2005; Pogodaeva et al., 2017), что предполагает конкуренцию микроорганизмов за их использование. В работе (Lomakina et al., 2018) высказано предположение, что в осадках озера Байкал недостаток нитрат-иона может восполняться благодаря активности архей филума *Thaumarchaeota*. Аммоний-окисляющие представители этого филума в разных районах оз. Байкал составляли значитель-

ную часть от всех архей (до 100% в районах нефтяных сипов, 40% в районах метановых сипов и 20% придонной области глубоководных районов) (Lomakina et al., 2018; Cabello-Yeves et al., 2020). Вполне вероятно, что эта группа архей может быть сопряжена с *Methylococcaceae* либо в качестве конкурента за аммоний, либо как продуцент нитратов в поверхностных осадках. Следует также учитывать способность метанотрофных бактерий семейства *Methylococcaceae* к диазотрофии, что может обеспечивать им преимущество перед *Thaumarchaeota*, позволяя выбирать разные жизненные стратегии в зависимости от доступности азотных соединений.

Следует отметить широкий спектр полученных нами ОТЕ метанотрофных бактерий в пределах сем. *Methylococcaceae*. Часть из них проявили высокую степень идентичности с *M. psychrophilus* и *M. tundripaludum*, другие ОТЕ формировали отдельный кластер. Ранее было показано, что в донных осадках Байкала, где отмечаются высокие концентрации метана, доминировали представители рода *Methylobacter* (Kadnikov et al., 2012; Zemskaya et al., 2015), а в водной толще при более низких его концентрациях – представители рода *Methyloglobulus* (Cabello-Yeves et al., 2020). Представители семейства *Methylococcaceae* имеют широкий ареал обитания, они выявлены в арктических, субарктических озерах и тундровых почвах, где отмечается сезонное изменение температуры, концентраций растворенного кислорода и метана, связанных с динамикой ледяного покрова и оттепели.

Метанотрофные бактерии разных таксономических групп чувствительны к метанолу (Гальченко, 2001; TaYS et al., 2018), что подтверждается и нашими результатами. Даже при небольших концентрациях метанола в среде (0.01%) наблюдалось увеличение доли метилотрофных бакте-



**Рис. 4.** Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (регион V2–V3) метилотрофных бактерий, полученных в ходе данного эксперимента. Использован метод объединения ближайших соседей. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Kimura 2-parameter (500 альтернативных последовательностей).

рий в сообществах, хотя, согласно Гальченко (2001), данная концентрация благотворно влияет на рост метанотрофных бактерий I типа. Увеличение концентрации метанола до 0.5% привело к полному подавлению развития байкальского метанотрофного сообщества. Биогеохимия метанола и его значение в качестве источника углерода для микроорганизмов озера Байкал не изучены. Ранее метилотрофное сообщество отмечалось при исследовании филогенетического разнообразия гена *mxaF* в придонной зоне и поверхностных осадках районов разгрузки углеводородов (Zemskaya et al., 2015; Zakharenko et al., 2019). Согласно (Букин и соавт., 2018), в поверхностных осадках с различным химическим составом поровых вод происходит активное образование метана по метилотрофному пути. Таким образом, в этой зоне осадка метанол может активно потребляется аэробными и анаэробными микроорганизмами и не влияет на развитие метанотрофов сем. *Methylococcaceae*. Можно отметить, что в наших экспери-

ментах метилотрофы принадлежали роду *Methylotenera*. Представители этого же рода отмечались при изучении *in situ* окисленных слоев осадков пресноводных водоемов, таких как озеро Вашингтон, арктических и субарктических озер, пресноводных болот вблизи озера Эри (США) с помощью <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> и метагеномного анализа (Kalyuzhnaya et al., 2008; He et al., 2012; Beck et al., 2013). Как показано в этих работах, в сообществах главную роль в ассимиляции C<sub>1</sub>-соединений выполняют представители облигатных метанотрофов рода *Methylobacter* (сем. *Methylococcaceae*) и облигатных метилотрофных представителей рода *Methylotenera* (сем. *Methylophilaceae*). Последние являются основными утилизаторами метанола в пресноводном озере Вашингтон (Kalyuzhnaya et al., 2008). Тем не менее, на сегодняшний день характер сотрудничества представителей видов *Methylobacter* и *Methylotenera* остается до конца не изученным и требует дальнейших исследований. Есть предположения, что *Methylophilaceae* могут

быть вовлечены в детоксикацию форм азота, к которым чувствительны члены семейства *Methylococcaceae* (Nyerges, Stein, 2009), либо они вовлекают в свой метаболизм соединения, возникающие в результате лизиса *Methylococcaceae* (Beck et al., 2013).

Наше исследование свидетельствует о присутствии в поверхностных слоях осадка широкого спектра метанотрофных бактерий, приспособленных к существованию в условиях с широким диапазоном концентраций азотных минеральных соединений, что позволяет им участвовать в окислении метана и ограничивать его поступление из донных осадков в водную толщу озера Байкал.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Иркутскому суперкомпьютерному центру СО РАН за предоставленный доступ к НРС-кластеру “Академик В.М. Матрозов”.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы госзадания № 0279-2021-0006 и при финансовой поддержке гранта РФФИ офи\_м 17-29-05040.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Большаков А.М., Егоров А.В. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометрических исследованиях в акваториях // *Океанология*. 1987. Т. 37. С. 861–862.
- Букин С.В., Павлова О.Н., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Погодаева Т.В., Галачьянц Ю.П., Букин Ю.С., Хабеев А.В., Земская Т.И. Субстратная специфичность метаногенных сообществ из донных отложений оз. Байкал, ассоциированных с разгрузками углеводородных газов // *Микробиология*. 2018. Т. 87. С. 409–420.
- Bukin S.V., Pavlova O.N., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Galachyants Yu.P., Bukin Yu.S., Khabuev A.V., Zemskaya T.I. Substrate specificity of methanogenic communities from Lake Baikal bottom sediments associated with hydrocarbon gas discharge // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V. 87. P. 549–558. <https://doi.org/10.1134/S0026261718040045>
- Воробьев А.В., Дедыш С.Н. Использование накопительных культур для оценки структуры сообществ метанотрофов в торфяной почве: проблема репрезентативности результатов // *Микробиология*. 2008. Т. 77. С. 566–569.
- Vorob'ev A.V., Dedysh S.N. Inadequacy of enrichment culture technique for assessing the structure of methanotrophic communities in peat soil // *Microbiology (Moscow)*. 2008. V. 77. P. 504–507.
- Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500 с.
- Голубев В.А. Температурная структура и статистическая устойчивость придонных вод озера Байкал // *Водные ресурсы*. 1981. № 6. С. 75–89.
- Земская Т.И., Хлыстов О.М., Егоров А.В., Погодаева Т.В., Калмычков Г.В., Шубенкова О.В., Черницына С.М., Воробьева С.С., Грачев М.А. Комплексные исследования проявлений газовых гидратов в осадках грязевых вулканов озера Байкал. Изменение окружающей среды и климата: природные и связанные с ними техногенные катастрофы. М.: ИФЗ РАН, 2008. 268 с.
- Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.
- Намсараев Б.Б., Земская Т.И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал. Новосибирск: Издательство СО РАН, филиал “ГЕО”, 2000. 160 с.
- Погодаева Т.В., Сыпачев Р.И., Ахманов Г.Г., Хлыстов О.М. Геохимия газонасыщенных флюидов грязевых вулканов и метановых сипов (озеро Байкал) // VIII Межд. научно-практ. конф. “Морские исследования и образование. Maresedu-2019”. Москва, Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН. Тверь: Издание ООО “ПолиПРЕСС”, 2019. Т. 2. С. 71–73.
- Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремальные метанотрофы. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2008. 206 с.
- Шубенкова О.В., Земская Т.И., Черницын С.М., Хлыстов О.М., Трибой Т.И. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана // *Микробиология*. 2005. Т. 74. С. 370–377.
- Shubenkova O.V., Zemskaya T.I., Chernitsyna S.M., Khlystov O.M., Triboy T.I. The first results of an investigation into the phylogenetic diversity of microorganisms in Southern Baikal sediments in the region of subsurface discharge of methane hydrates // *Microbiology (Moscow)*. 2005. V. 74. P. 370–377.
- Черницына С.М., Мамаева Е.В., Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Галачьянц Ю.П., Букин С.В., Пименов Н.В., Хлыстов О.М., Земская Т.И. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ в донных отложениях Посольской банки, оз. Байкал // *Микробиология*. 2016. Т. 85. С. 652–662.
- Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Galach'yants Y.P., Bukin S.V., Khlystov O.M., Zemskaya T.I., Pimenov N.V. Phylogenetic diversity of microbial communities of the Posolsk bank bottom sediment, Lake Baikal // *Microbiology (Moscow)*. 2016. V. 85. P. 672–680. <https://doi.org/10.1134/S0026261716060060>
- Beck D.A.C., Kalyuzhnaya M.G., Malfatti S., Tringe S.G., Glavina del Rio T., Ivanova N., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. A metagenomic insight into freshwater methane-utilizing communities and evidence for cooperation between the

- Methylococcaceae* and the *Methylophilaceae* // PeerJ. 2013. V. 1. e23–e23.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.23>
- Bodelier P.L.E., Roslev P., Henckel T., Frenzel P.* Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots // *Nature*. 2000. V. 403. P. 421–424.  
<https://doi.org/10.1038/35000193>
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Zakharenko A.S., Sakirko M.V., Ivanov V.G., Ghai R., Rodriguez-Valera F.* Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat // *Limnol. Oceanogr.* 2020. V. 65. P. 1471–1488.  
<https://doi.org/10.1002/lno.11401>
- 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. P. 1–22.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188223>
- Dam B., Dam S., Kim Y., Liesack W.* Ammonium induces differential expression of methane and nitrogen metabolism-related genes in *Methylocystis* sp. strain SC2 // *Environ. Microbiol.* 2014. V. 16. P. 3115–3127.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12367>
- De Batist M., Klerkx J., Rensbergen V., Vanneste M., Poort J., Golmshok A.Y., Kremlev A., Khlystov O.M., Krinitsky P.* Active Hydrate Destabilisation in Lake Baikal, Siberia // *Terra Nova*. 2002. V. 14. P. 436–442.  
[https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2002\)030<0631:SMVAMS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2002)030<0631:SMVAMS>2.0.CO;2)
- Deutzmann J.S., Hoppert M., Schink B.* Characterization and phylogeny of a novel methanotroph, *Methyloglobulus morosus* gen. nov., spec. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 2014. V. 37. P. 165–169.  
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.02.001>
- Dixon J.L., Sargeant S., Nightingale P.D., Murrell J.C.* Gradients in microbial methanol uptake: productive coastal upwelling waters to oligotrophic gyres in the Atlantic Ocean // *Int. Soc. Microb. Ecol.* 2013. V. 7. P. 568–580.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2012.130>
- Fox B.G., Froland J.E., Dege J., Lipscomb J.D.* Methane monooxygenase from *Methylosimilis trichosporiwn* OB3b: Purification and properties of a three component system with high specific activity from a type II methanotroph // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 10023–10033.
- Hanson R., Hanson T.* Methanotrophic Bacteria // *Microbiol. Rev.* 1996. V. 60. P. 439–471.
- He R., Wooller M., Pohlman J., Catranis C., Quensen J., Tiedje J., Leigh M.* Identification of functionally active aerobic methanotrophs in sediments from an Arctic lake using stable isotope probing // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. P. 1403–1419.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02725.x>
- Kadnikov V.V., Mardanov A.B., Beletsky A.V., Shubenkova O.V., Pogodaeva T.N., Zemskaya T.I., Ravin N.V., Skryabin K.G.* Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2012. V. 79. P. 348–358.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01221.x>
- Kalyuzhnaya M.G., Lapidus A., Ivanova N., Copeland A.C., McHardy A.C., Szeto E., Salamov A., Grigoriev I.V., Suciú D., Levine S.R., Markowitz V.M., Rigoutsos I., Tringe S.G., Bruce D.C., Richardson P.M., Lidstrom M.E., Chistoserdova L.* High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities // *Nature Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1029–1034.
- Kalyuzhnaya M.G., Xing X.H.* Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability. 2018. 312 p.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.1488>
- Khlystov O., De Batist M., Shoji H., Hachikubo A., Nishio S., Naudts L., Poort J., Khabuev A., Belousov O., Manakov A., Kalmychkov G.* Gas hydrate of Lake Baikal: Discovery and varieties // *J. Asian Earth Sci.* 2013. V. 62. P. 162–166.  
<https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2012.03.009>
- Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D.* Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 5112–5120.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Liikanen A., Martikainen P.J.* Effect of ammonium and oxygen on methane and nitrous oxide fluxes across sediment–water interface in a eutrophic lake // *Chemosphere*. 2003. V. 52. P. 1287–1293.
- Lomakina A., Mamaeva E., Pogodaeva T., Kalmychkov G., Khalzov I., Zemskaya T.* Anaerobic methane oxidation in enrichment cultures from deep sediments of a mud volcano Peschanka (South Baikal) // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V.87. P. 317–325.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261718030049>
- Martin P., Granina L.Z., Martens K., Goddeeris B.* Oxygen concentration profiles in sediments of two ancient lakes: Lake Baikal (Siberia, Russia) and Lake Malawi (East Africa) // *Hydrobiologia*. 1998. V. 367. P. 163–174.
- Muller B., Maerki M., Schmid M., Vologina E.G., Wehrli B., Wuest A., Sturm M.* Internal carbon and nutrient cycling in Lake Baikal: sedimentation, upwelling, and early diagenesis // *Global Planet. Change*. 2005. V. 46. P. 101–124.
- Murase J., Sugimoto A.* Inhibitory effect of light on methane oxidation in the pelagic water column of a mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan) // *Limnol. Oceanogr.* 2005. V. 50. P. 1339–1343.
- Nyerges G., Stein L.Y.* Ammonia cometabolism and product inhibition vary considerably among species of methanotrophic bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009. V. 297. P. 131–136.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01674.x>
- Op den Camp H., Islam T., Stott M., Harhangi H., Hynes A., Schouten S., Jetten M., Birkeland N., Pol A., Dunfield P.* Minireview: Environmental, genomic, and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia* // *Environ. Microbiol. Rep.* 2009. V. 1. P. 293–306.
- Pogodaeva T.V., Lopatina I.N., Khlystov O.M., Egorov A.V., Zemskaya T.I.* Background composition of pore waters in Lake Baikal bottom sediments // *J. Great Lakes Res.* 2017. V. 43. P. 1030–1043.  
<https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.09.003>
- Pogodaeva T.V., Zemskaya T.I., Khlystov O.M.* Preliminary estimate of dissolved components flowing through water-bottom interface at sites of oil and gas discharge in Lake Baikal // The 11th Conference of Gas in Marine Sediments. Nice, 2012. P. 74.
- Reeburgh W.S.* Oceanic methane biogeochemistry // *Chem. Rev.* 2007. V. 107. P. 486–513.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R. A., Oakley B.B., Parks D.H.,*

- Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van orn D.J., Weber C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Tays C., Guarnieri M.T., Sauvageau D., Stein L.Y. Combined effects of carbon and nitrogen source to optimize growth of proteobacterial methanotrophs // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02239>
- Whittenbury R., Philips K., Wilkinson J. Enrichment isolation and some properties of methaneutilizing bacteria // *Ibid.* 1970. V. 61. P. 205–218.
- Yang Y., Tong T., Chen J., Liu Y., Xie S. Ammonium impacts methane oxidation and methanotrophic community in freshwater sediment // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 20. P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00250>
- Zakharenko A.S., Galachyants Y.P., Morozov I.V., Shubenkova O.V., Morozov A.A., Ivanov V.G., Pimenov N.V., Krasnopeev A.Y., Zemskaya T.I. Bacterial communities in areas of oil and methane seeps in pelagic of Lake Baikal // *Microb. Ecol.* 2019. V. 78. P. 269–285. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1299-5>
- Zemskaya T.I., Lomakina A.V., Shubenkova O.V., Pogodaeva T.V., Morozov I.V., Chernitsina S.M., Sitnikova T.Ya., Khlystov O.M., Egorov A.V. Jelly-like microbial mats over subsurface fields of gas hydrates at the St. Petersburg methane seep (Central Baikal) // *Geomicrobiol. J.* 2015. V. 32. P. 89–100. <https://doi.org/10.1080/01400451.2014.910572>
- Zemskaya T.I., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V., Chernitsina S.M., Dagurova O.P., Buryukhaev S.P., Namsaraev B.B., Khlystov O.M., Egorov A.V., Krylov A.A., Kalmychkov G.V. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky mud volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of Archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3 // *Geo-Mar. Lett.* 2010. V. 30. P. 411–425. <https://doi.org/10.1007/s00367-010-0199-6>

## Effect of Methanol and Mineral Nitrogen Compounds on the Composition of Methanotrophic Enrichments from the Sediments of a Lake Baikal Methane Seep

O. V. Shubenkova<sup>1, \*</sup>, A. S. Zakharenko<sup>1</sup>, Yu. P. Galach'yants<sup>1</sup>, G. V. Kalmychkov<sup>2, †</sup>, V. G. Ivanov<sup>1</sup>, A. V. Khabuev<sup>1</sup>, T. V. Pogodaeva<sup>1</sup>, S. M. Chernitsyna<sup>1</sup>, and T. I. Zemskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

<sup>2</sup>*Vinogradov Institute of Geochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 650033 Russia*

\*e-mail: olya@lin.irk.ru

Received January 21, 2021; revised March 16, 2021; accepted March 17, 2021

**Abstract**—Diversity of methano- and methylotrophic bacteria in enrichments from the sediment oxidized layer maintained at 10°C in mineral media with nitrogen compounds (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and methanol was studied using high-throughput sequencing of the V2–V3 region of the 16S rRNA gene. Methanotrophs of the bottom sediment belonged to the order *Methylococcales*, with predominance of the genus *Methylobacter* (6.4 and 4.6% of the total number of sequences, respectively). Members of the methylotrophic community belonged to the genus *Methylothera* (family *Methylophilaceae*). Enrichments in the medium with methane were characterized by the highest diversity of methanotrophs, containing 22 OTUs of the family *Methylococcaceae*, 9 of which were not detected under other cultivation conditions. In general, only 6 out of 28 OTUs of methanotrophic bacteria exhibited similarity to cultured members of *Methylobacter*, *Metyloglobulus*, and *Methylomicrobium*, while others showed different values of similarity (94–99%) to uncultured members of the family *Methylococcaceae*. In the presence of methanol (0.01%), preferential development of methylotrophic bacteria occurred, while at 0.5% methanol growth of methanotrophic bacteria was suppressed independent on the nitrogen source added.

**Keywords:** bottom sediments, methane, methanotrophic bacteria, methylotrophic bacteria, Lake Baikal



---



---

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ**


---



---

## ДЕЛИМИТАЦИЯ ВИДОВ И АНАЛИЗ КРИПТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КЛАДЫ *PARACHLORELLA* (*CHLOROPHYTA*)<sup>1</sup>

© 2021 г. Е. С. Кривина<sup>а, \*</sup>, А. Д. Темралеева<sup>а</sup>, Ю. С. Букин<sup>б</sup>

<sup>а</sup>ФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушино, 142290 Россия

<sup>б</sup>Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664003 Россия

\*e-mail: pepelisa@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.01.2021 г.

После доработки 17.03.2021 г.

Принята к публикации 22.03.2021 г.

В статье рассматривается система зеленых микроводорослей клады *Parachlorella*, построенная на основании морфологических, экологических и молекулярно-генетических данных. Обсуждаются диагностические признаки выделенных родов и видов, а также систематическое положение некоторых таксонов. Молекулярно-филогенетический анализ клады *Parachlorella* показал, что, несмотря на относительную простоту морфологии, для нее характерно высокое криптическое разнообразие. Показана полифилетичность рода *Dictyosphaerium*, а также ряда видов: *D. libertatis*, *D. ehrenbergianum*, *Compactochlorella kochii*, *Mucidosphaerium pulchellum*, *M. palustre*, *Closteriopsis acicularis*. Использование интрона в качестве критерия разделения близкородственных видов эффективно для представителей групп II, IV, VII, VIII, а также для штаммов видов *Compactochlorella kochii* и *D. libertatis*. Применение классического СВС-подхода, основанного на поиске СВС в консервативных регионах ITS2, было успешным только для группы II. Результаты анализа генетических дистанций и алгоритмов делимитации видов GMYC, PTP, ABGD не являются универсальными инструментами для обнаружения видовых границ и нуждаются в подтверждении другими признаками, такими как форма клеток, способность формировать колонии, способ крепления клеток к гиалиновым тяжам, тип хлоропласта, количество пиреноидов, присутствие слизи, наличие интронов, уровень генетических различий, наличие СВС в ITS1 и ITS2, среда обитания. Благодаря совместному использованию морфологических, экологических и генетических характеристик, удалось охарактеризовать II групп и 2 филогенетические линии в рамках клады *Parachlorella* и выдвинуть предположения о разделении родов и видов внутри выделенных групп.

**Ключевые слова:** микроводоросли, морфология, экология, филогения, фрагмент 18S–ITS1–5.8S–ITS2, разграничение видов

**DOI:** 10.31857/S002636562104011X

Клада *Parachlorella*, сестринская кладе *Chlorella*, была выделена Krienitz и соавт. в 2004 г., когда, исходя из различий в нуклеотидных последовательностях гена 18S рРНК и внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2, *C. kessleri* была перенесена в отдельный род *Parachlorella*. Впоследствии это разделение было подтверждено Yamamoto и соавт. (2005) на основании биохимических и ультраструктурных исследований синтеза клеточных стенок автоспор. Кроме микроводорослей с одиночными шаровидными и овальными клетками к *Parachlorella*-кладе также принадлежат организмы с удлинёнными или игловидными клетками — *Diclostera* и *Closteriopsis*, а также колониальные роды, традиционно определяемые как *Dictyosphaerium*

Nägeli (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2010; Bock et al., 2010; Krienitz et al., 2010; Škaloud et al., 2014; Song et al., 2018b). В настоящее время в составе клады *Parachlorella* описано 12 родов: *Closteriopsis* (Lemmertmann, 1899), *Compactochlorella* (Krienitz et al., 2012), *Coronacoccus* (Song et al., 2018b), *Diclostera* (Jao, 1975), *Dictyosphaerium* (Nägeli, 1849), *Kalenjinia* (Krienitz et al., 2012), *Marasphaerium* (Krienitz et al., 2012), *Marinichlorella* (Aslam et al., 2007), *Masaia* (Krienitz et al., 2012), *Mucidosphaerium* (Bock et al., 2011b), *Parachlorella* (Krienitz et al., 2004), *Planktochlorella* (Škaloud et al., 2014). Представители клады являются свободноживущими организмами, большинство из которых входят в состав планктона пресных и морских вод, и лишь некоторые встречаются в почвах.

Цель данной работы заключалась в комплексном исследовании морфологии, экологии и фило-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S002636562104011X для авторизованных пользователей.

гении представителей клады *Parachlorella*, включая штаммы Альгологической коллекции ACSSI, для разграничения близкородственных таксонов на уровне вида и рода. Впервые для всех описанных представителей клады (за исключением *Marinichlorella*, для которой внутренние транскрибируемые спейсеры не секвенированы) были обобщены морфологические и экологические характеристики, проанализированы результаты филогенетического анализа фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2, включая наличие интронов и их характеристики, значения генетических дистанций, оценены различия во вторичных структурах ITS1 и ITS2, в том числе присутствие компенсаторных замен (СВС), и определены видовые границы с помощью методов GMYC, PTP и ABGD. На основании проведенного анализа были выдвинуты предположения о критериях разделения родов и видов внутри данной клады.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** Объектами данного исследования стали штаммы зеленых микроводорослей коллекции ACSSI, являющиеся субкультурами Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS: *Parachlorella kessleri* ACSSI 334 (=IPPAS C-9), *P. kessleri* ACSSI 336 (=IPPAS C-62) и *P. kessleri* ACSSI 337 (=IPPAS C-100) (рис. ESM\_1).

**Культивирование штаммов ACSSI 334, ACSSI 336, ACSSI 337** проводили на твердой среде BG-11 (Гайсина и соавт., 2008).

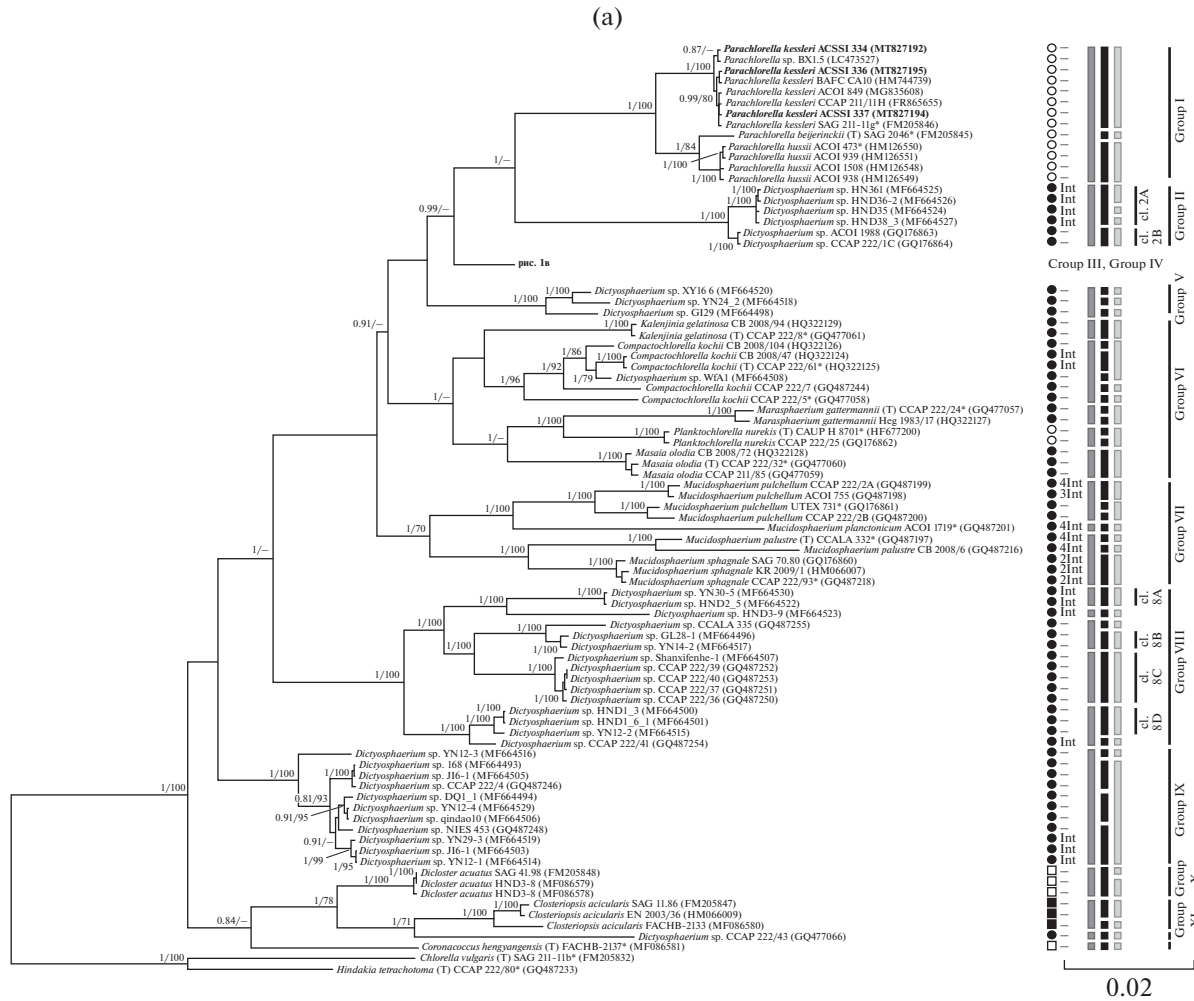
**Микроскопия, выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК** проводились по стандартным протоколам, описанным ранее (Кривина, Темралева, 2020). Праймеры для ПЦР генов 18S, 5.8S рРНК, спейсеров ITS1, ITS2 и условия амплификации приведены в табл. ESM\_2.

**Молекулярно-филогенетический анализ.** Для анализа филогении и уточнения таксономического положения штаммов ACSSI 334, ACSSI 336, ACSSI 337 был осуществлен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Отбор последовательностей осуществляли исходя из критериев максимального родства (сходство  $\geq 95\%$ ), качества прочтения, длины прочтения (не менее 2300 п.н.) и принадлежности к типовым видам и аутентичным штаммам. В состав выборки для филогенетического анализа вошли 117 штаммов (табл. ESM\_3). Названия таксонов приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2021). При наличии интронов в гене 18S рРНК они удалялись до выравнивания, информация о них указана на рис. 1. Филогенетический анализ клады *Parachlorella* производили по стандартным протоколам (Temraleeva et al., 2018). В

качестве внешней группы при филогенетических реконструкциях выбрали представителей сестринской клады *Chlorella* (класс *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) – *Chlorella vulgaris* и *Hindakia tetrachotoma*. Генетические различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических дистанций, вычисление которых проводили в программе MEGA 6.0. Боксплот генетических дистанций построен в среде статистического программирования R 3.4.4 (<https://www.R-project.org/>). Для сравнения топологии деревьев использовали данные статей Bock и соавт. (2011a, 2011b), Krienitz и соавт. (2004, 2010, 2012), Škaloud и соавт. (2014), Song и соавт. (2018a, 2018b).

Фолдинг вторичной структуры ITS1 проводили с помощью веб-сервера RNAfold web server (<http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) в соответствии с принципом минимальной энергии. При оценке правильности фолдинга ITS1 ориентировались на работу A. Coleman (2015). Для анализа вторичной структуры ITS2 была выполнена аннотация спейсера в ITS2-DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) и фолдинг также с помощью веб-сервера RNAfold web server по принципу минимальной энергии. Правильность фолдинга ITS2 оценивали, ориентируясь на работу Caisová и соавт. (2013). Сравнение вторичной структуры ITS1 и ITS2 между штаммами, поиск консервативных мотивов и компенсаторных замен (СВС) осуществляли в программе 4SALE. При анализе вторичных структур ITS2 для разделения видов особое внимание уделено подходу A. Coleman (2000, 2009), согласно которому наличие даже одной СВС в консервативных регионах ITS2 (5 п.н. I шпильки, 10 п.н. II шпильки, вся III шпилька) у двух микроводорослей коррелирует с их половой несовместимостью. Вторичные структуры спейсеров визуализированы в программе PseudoViewer3.

**Делимитация видов.** Реконструированное методом максимального правдоподобия (ML) филогенетическое дерево было использовано для делимитации видов с помощью алгоритма “Poisson tree processes” (PTP) на онлайн-сервере <https://species.h-its.org/>. Для делимитации видов в массиве данных применяли метод автоматического поиска межвидового пробела/разрыва (gap) в генетических дистанциях (automatic barcode gap discovery – ABGD) (Puillandre et al., 2012) на онлайн сервере <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>. Для анализа ABGD использовалась матрица генетических дистанций, рассчитанная в программе IQ-TREE. Третьим методом была обобщенная смешанная модель Юла с учетом целостности видов (general mixed Yule coalescent model, GMYC) (Fujisawa, Barraclough, 2013), реализованная в пакете “splits” для языка программирования R. Для GMYC анализа использовалось ультраметриче-



**Рис. 1.** (а) — Укорененное филогенетическое дерево клады *Parachlorella*, построенное методом Байеса (В), на основе последовательностей генов 18S и 5.8S рРНК и спейсеров ITS1 и ITS2 (2644 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны апостериорные вероятности (PP) и бутстреп-значения (BP) соответственно; значения  $<0.7$  для В и  $<70\%$  для ML не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. (б) — Фрагмент укорененного филогенетического дерева зеленых микроводорослей клады *Parachlorella* (группа III и IV). Обозначения: жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI, исследуемые в рамках данной работы, \* — аутентичные штаммы; (Т) — типовой вид, белый круг — *Chlorella*-подобный морфотип, черный круг — *Dictyosphaerium*-подобный морфотип, белый квадрат — *Scenedesmus*-подобный морфотип, черный квадрат — *Actinastrum*-подобный морфотип, Int — наличие интронов, рядом указано количество интронов; “—” — нет интрона. Серый прямоугольник — кластеризация ABGD, белый прямоугольник — кластеризация GMYS, светло-серый прямоугольник — кластеризация РТР.

ское дерево, реконструированное в программе BEAST.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ показал, что лучшей моделью эволюции ДНК для исследуемого набора комплексных нуклеотидных последовательностей (18S—ITS1—5.8S—ITS2) является GTR с инвариантной и гамма-коррекцией (GTR + I + G) (AIC = 36846.9), эта модель использовалась для всех дальнейших расчетов. Результаты “path sampling” анализа показали, что наилучшей моделью для реконструкции филогенетического дерева является модель видо-

образования рождения—гибели видов с расслабленными молекулярными часами со скоростями эволюции, распределенными по логнормальному распределению (наименьшее значение показателя маргинального правдоподобия  $\text{Ln}(L) = -18996.049$ ). Эта модель видообразования использовалась для расчетов в программе BEAST.

Клада *Parachlorella* включает 11 групп и 2 самостоятельные филогенетические линии с высокими статистическими поддержками (апостериорные вероятности (PP) — 0.81—1.00, бутстреп-поддержки ML (BP) — 70—100%). Все представители данной клады характеризовались коккоидной организацией таллома. В рамках клады выделено 4 морфоти-

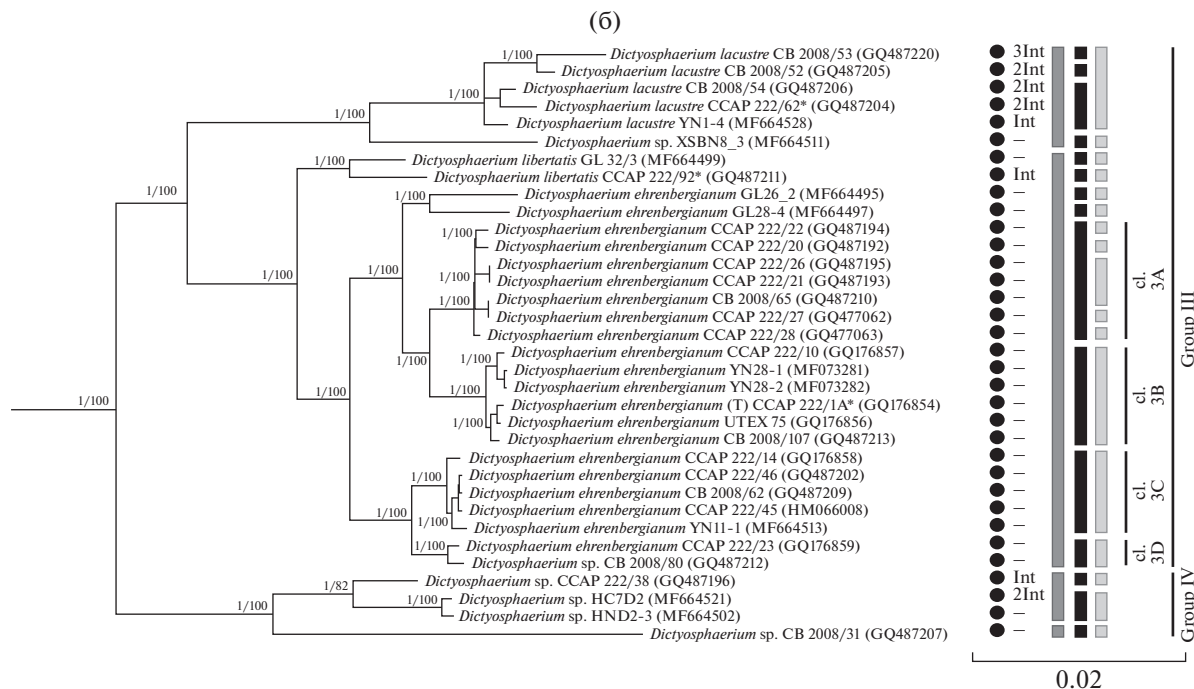


Рис. 1. Окончание

па: *Chlorella*-подобный (группа I), *Dictyosphaerium*-подобный (группы II–IX), *Scenedesmus*-подобный (группа X, р. *Coronacoccus*), *Actinastrum*-подобный (группа XI). Хлоропласт пристенный. Пиреноид с фрагментированной крахмальной оберткой, как правило, один, кроме представителей рода *Diclostera*, у которых количество пиреноидов может варьировать до 5 или отсутствует (табл. 1). Размножение бесполое – автоспорами. Рассмотренные представители являются свободноживущими организмами; большинство из них – обитатели пресноводных водоемов, и лишь некоторые встречаются в почвах (Krienitz et al., 2004, 2012; Bock et al., 2010, 2011a, 2011b; Škaloud et al., 2014; Song et al., 2018a, 2018b). Длина ITS1 у членов *Parachlorella*-клады варьировала от 230 до 335 н., длина ITS2 – от 241 до 273 н. Вторичные структуры ITS1 и ITS2 в целом соответствовали моделям, предложенным Coleman (2003, 2009, 2015) для эукариотических организмов.

Метод делимитации видов ABGD в составе клады *Parachlorella* выделил 24 кластера видового уровня, не считая внешнюю группу. Дистанция разделения видов составила 0.0164. С помощью метода GMYC выделено 57 кластеров видового уровня (дистанция разделения видов 0.00343). Статистическая поддержка результатов делимитации  $P = 6.979972e-13 < 0.05$ , следовательно, в массиве достаточно данных для получения достоверных результатов делимитации. С помощью метода РТР выделено 55 видов, что близко к результатам делимитации GMYC. Результаты дели-

митации видов методами ABGD, GMYC и РТР приведены на филогенетическом дереве (рис. 1а, 1б). Все кластеры видового уровня, выделенные методами делимитации, имеют высокие статистические поддержки (PP – 0.95–1.00, BP – 90–100%). По сравнению с другими методами ABGD выделил в кладе *Parachlorella* наименьшее количество видов при наибольшей дистанции их разделения. Количество выделенных кластеров разными методами делимитации видов ABGD, GMYC и РТР согласуется с работами Zou и соавт. (2016a, 2016b) и Zhu и соавт. (2017), в которых ABGD также разделял массив данных на меньшее количество предполагаемых видов, чем GMYC и РТР. Это связано с тем, что в качестве исходных данных метод ABGD использует матрицу генетических дистанций и поэтому является менее чувствительным (“грубым”) методом для разделения видов. Алгоритмы GMYC и РТР в качестве исходных данных используют филогенетические деревья, которые обычно строятся совершенными дискретными методами филогенетического анализа (ML или BI). Поэтому методы GMYC и РТР могут идентифицировать более “тонкие” генетические различия между штаммами в исследуемом наборе данных и выделяют большее количество предполагаемых видов.

Далее мы приводим отличительные морфологические, молекулярно-генетические и экологические характеристики каждой из групп. Отметим, что, исходя из работ Škaloud и соавт. (2014) и Song и соавт. (2018b), изначально пороги внутриви-

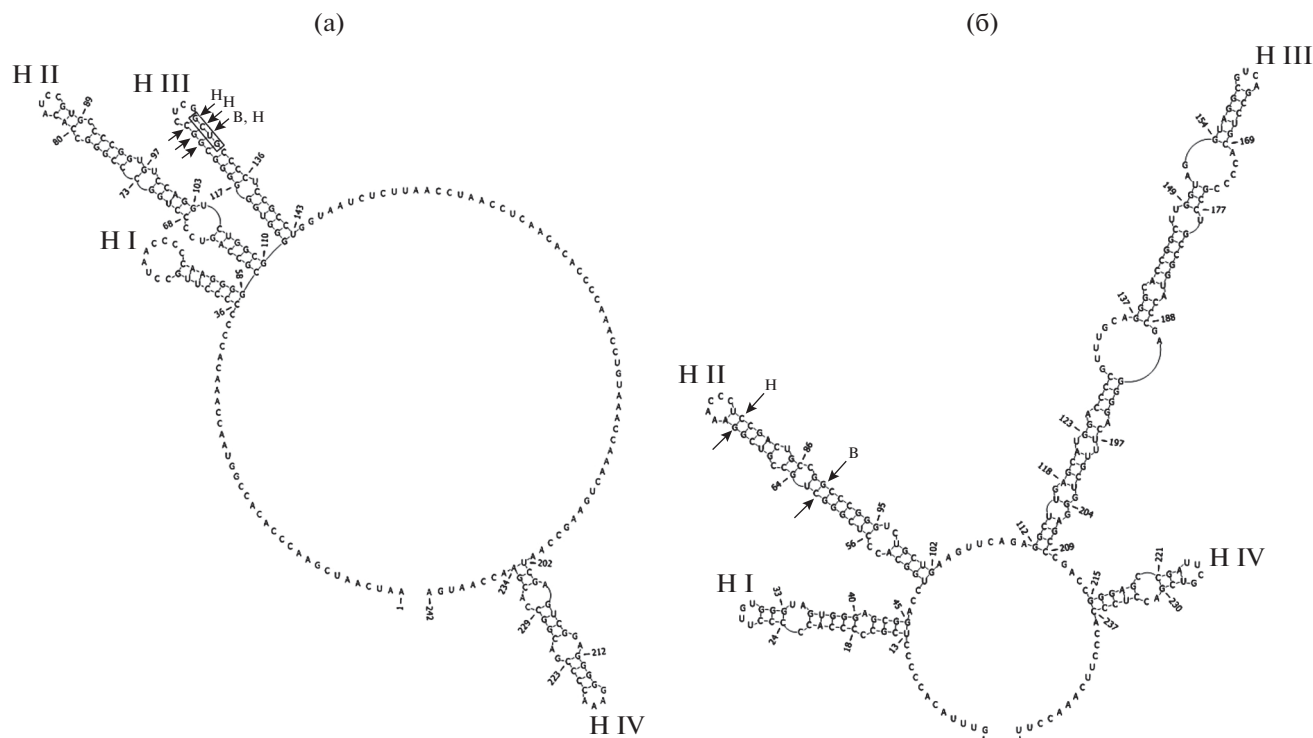
Таблица 1. Основные морфологические характеристики представителей клалды *Parachlorella*

Группа	Кластер/линия	A*	B	C	D	Ey	Ead	F	G
I	<i>Parachlorella kessleri</i>	2	1	–	1	2, 3	1, 2	3, 6	1
	<i>P. beijerinckii</i>	2	1	–	2	2, 3	1, 2	2, 4	1
	<i>P. hussii</i>	2	1	–	1	2, 3	1, 2	1	1
II	<i>Dictyosphaerium</i> sp. кластеры 2A, 2B	1	6	1	1	2, 3	1, 2	1	1
III	<i>D. lacustre</i>	1	6	2	1	3, 6	1, 3	1, 2	1
	<i>Dictyosphaerium</i> sp. XSBN8_3	1	6	2	1	2, 3	2, 3	1, 2	1
	<i>D. libertatis</i>	1	6	2	1	3, 4	3	1, 2	1
	<i>D. ehrenbergianum</i>	1	6	2	1	3	3	1, 2	1
IV	<i>Dictyosphaerium</i> sp. CСAP 222/38, HC7D2, HND2-3, CB 2008/31	1	6	2	1	3	3	1, 2	1
V	<i>Dictyosphaerium</i> sp. XY16-6, YN24_2	1	6	2	1	3	3	1, 2	1
	<i>Dictyosphaerium</i> sp. G129	1	6	1	1	3	3	1, 2	1
VI	<i>Kalenjinia gelatinosa</i>	1	2	2	1	1, 3, 4, 5	1, 3, 4, 5	1	1
	<i>Compactochlorella kochii</i>	1	2	1	1	1, 3, 4	1, 3, 4	1	1
	<i>Dictyosphaerium</i> sp. WfA1	1	2	1	1	1, 3, 4	1, 3, 4	1	1
	<i>C. dohrmannii</i>	1	2	1	1	1, 3, 4	1, 3, 4	1	1
	<i>Marasphaerium gattermannii</i>	1	2	1	1	1, 2	1, 2	1	1
	<i>Planktochlorella nurekis</i>	2	1	–	2	1, 2	1	1	1
	<i>Masaia oloidia</i>	1	3	2	1	1, 3, 4	1, 3, 4	1	1
VII	<i>Mucidosphaerium pulchellum</i>	1	6	1	1	3, 4	1, 3	1, 2	1
	<i>M. planctonicum</i>	1	6	1	1	2, 3	1	1, 7	1
	<i>M. spagnale</i>	1	5	1	1	3, 7	1, 2	1, 7	1
	<i>M. palustre</i>	1	6	1	1	3	1	1, 7	1
VIII	<i>Dictyosphaerium</i> sp. кластеры 8A–8D, штаммы HND3-9, CСALA 335, CСAP 222/41	1	5	2	1	2, 3	2, 3	1	1
IX	<i>Dictyosphaerium</i> sp. YN12-3, I68, JI8-2, CСAP 222/4, DQ1_1, YN12-4, qingdao10, NIES 453, YN29-3, JI6-1, YN12-1	1	6	2	1	1, 3	1, 3	1	1
X	<i>Dicloster acutus</i>	3	2	–	2	7	7	8	0, 1, 2, 3
XI	<i>Closteriopsis acicularis</i>	1, 2	4	–	1	8	8	5	0, 1, 2
	<i>Dictyosphaerium</i> sp. CСAP 222/43	1	–	1	1	1, 3	1, 3	1	1
	<i>Coronacoccus hengyangensis</i>	1	3	–	1	1, 2, 3, 4, 9	1, 2, 3, 4, 9	1	1

\* А – Форма: 1 – колонии; 2 – одиночные клетки; 3 – ценобий. В – количество клеток: 1 – 1; 2 – до 4; 3 – до 8; 4 – до 16; 5 – до 32; 6 – до 64. С – крепление клеток к гиалиновым тязам: 0 – нет тязей; 1 – узкой стороной; 2 – широкой стороной. D – слизь: 1 – есть; 2 – нет. E – форма клеток: Ey – форма молодых клеток, Ead – форма взрослых клеток: 1 – шаровидная; 2 – широкоовальная; 3 – овальная; 4 – яйцевидная; 5 – каплевидная; 6 – почковидная; 7 – изогнутая с заостренными концами; 8 – веретеновидная; 9 – четырехгранная. F – тип хлоропласта: 1 – чашевидный; 2 – блюдцевидный; 3 – мантиевидный; 4 – корытовидный; 5 – желобовидный; 6 – шаровидный; 7 – поясковидный; 8 – пристенный. G – количество пиреноидов: 0 – нет пиреноида; 1 – 1; 2 – 2; 3 – от 3 до 5. Прочерк означает отсутствие информации.

довых, межвидовых и межродовых дистанций были установлены на основании представителей родов *Parachlorella*, *Kalenjinia*, *Planktochlorella*, *Masaia*, монофилетичность которых не вызывала сомне-

ний. Минимальная внутривидовая генетическая дистанция (на базе штаммов вида *P. hussii*) – 0%, минимальная межвидовая дистанция (на основе различий между *P. hussii* и *P. beijerinckii*) – 0.4%,



**Рис. 2.** Вторичная структура ITS1 (а) и ITS2 (б) штаммов *Parachlorella kessleri* ACSSI 334, ACSSI 336, ACSSI 337. Стрелками показаны СВС, В – *P. beijeinckii*, Н – *P. hussii*. Черный прямоугольник – молекулярная подпись.

межродовая (между родами *Kalenjinia* и *Masaia*) – 1.2%. Далее нами был проведен комплексный анализ остальных видов и родов, который позволил уточнить границы генетических различий (см. ниже).

**Группа I** объединяет представителей рода *Parachlorella*, которые имеют *Chlorella*-подобный морфотип (табл. 1). Они широко распространены в водной, почвенной и наземно-воздушной средах (Krienitz et al., 2004; Bock et al., 2011a; Song et al., 2018b). В состав группы входят три самостоятельных вида: типовой вид рода *P. beijeinckii*, *P. kessleri*, *P. hussii*. Отличительными морфологическими признаками являются тип хлоропласта и слизистой оболочки. Уровень генетических различий между видами варьирует от 0.4 до 0.8% (ESM\_4). Последовательности ITS1 и ITS2 для трех штаммов *P. kessleri* ACSSI 334, 336 и 337 были идентичны, различия с аутентичным штаммом SAG 211-11g также отсутствовали. Анализ вторичной структуры ITS1 представителей данных видов выявил мотив, расположенный сразу после вершины III шпильки с 3'-стороны, который можно рассматривать как молекулярную подпись: для *P. kessleri* – мотив GCUG, для *P. beijeinckii* – AGCC, для *P. hussii* – GAAA (рис. 2а). Между видами *P. beijeinckii* и *P. hussii* СВС не обнаружено. *P. kessleri* отличается от других видов на 1 СВС в III шпильке ITS2 от двух других видов и на 2 дополнительных

СВС в этой же шпильке от *P. hussii* (табл. ESM\_5). СВС между видами в консервативных регионах ITS2 отсутствовали (рис. 2б). В неконсервативных регионах каждый из видов *P. beijeinckii* и *P. hussii* по сравнению с другими видами группы имели по 1 СВС (табл. ESM\_6). Анализы GMYC и РТР, в отличие от метода ABGD, подтвердили видовой статус всех 3 видов. Таким образом, разделение видов внутри рода *Parachlorella* подтверждается морфологическими отличиями (тип хлоропласта, слизь), величиной генетических дистанций (0.4–0.8%), наличием молекулярных подписей и СВС во вторичной структуре ITS1 и ITS2, результатами делимитации видов методом GMYC и РТР.

**Группа II** является близкородственной группе I; в нее вошли штаммы микроводорослей с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом. Колонии состоят из 16–64 клеток, которые крепятся к гиалиновым тяжам узкой стороной (табл. 1). Все представители – обитатели пресноводных водоемов (Song et al., 2018b). Группа включает 2 кластера (рис. 1а). Члены кластера 2А, в отличие от кластера 2В, в составе гена 18S рРНК имеют интрон длиной 457 н. Генетические дистанции внутри вышеописанных кластеров были менее 0.1%, между ними – 0.4% (межвидовой уровень), с представителями сестринской группы I – 3.4%–3.7% (межродовой уровень) (табл. ESM\_7). У штаммов кла-



стеров 2А и 2В была обнаружена 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в консервативном регионе ITS2 (табл. ESM\_8, ESM\_9). Метод ABGD объединяет оба кластера в один вид, метод GMYC, напротив, разделяет их на 2 самостоятельных вида. Метод РТР подтверждает самостоятельный видовой статус кластера 2В и дополнительно разделяет кластер 2А на 3 вида, но последнее не подтверждается другими признаками.

Обобщая все изученные характеристики, мы предполагаем, что кластеры 2А и 2В являются криптическими видами со сходной морфологией, но отличающиеся присутствием интрона в составе гена 18S рРНК у штаммов кластера 2А; наличием 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в консервативном регионе ITS2. Генетические дистанции между кластерами соответствовали межвидовому уровню (0.4%), разделение кластеров также было подтверждено двумя методами делимитации видов – GMYC и РТР. Оба вида не вошли в группу “истинных” *Dictyosphaerium*, включающую аутентичный штамм типового вида *D. ehrenbergianum* ССАР 222/1А (группа III), т.е. являются членами нового неопищенного рода с *Dictyosphaerium*-подобной морфологией.

**Группа III** объединяет штаммы, кластеризующиеся с *D. ehrenbergianum* – типовым видом рода *Dictyosphaerium* – и являющиеся, вероятно, его “истинными” представителями (рис. 16). В колониях обычно от 4 до 32 клеток, реже – до 64, которые, в отличие от группы II, крепятся к гиалиновым тяжам широкой стороной (табл. 1). Форма молодых клеток варьирует в зависимости от видовой принадлежности. Взрослые клетки преимущественно овальные. Все представители – обитатели пресноводных водоемов (Bock et al., 2011b). В состав группы входят 30 штаммов, которые образуют несколько кластеров:

1) отличительной чертой *D. lacustre* является почковидная форма молодых и шаровидная форма зрелых клеток (Bock et al., 2011b). Штаммы имели разное количество интронов в составе гена 18S рРНК: у штамма СВ 2008/53 – 3 интрона (356 н., 465 н., 503 н.), у СВ 2008/52, СВ 2008/54 и аутентичного штамма ССАР 222/62 – 2 интрона (467 н., 503 н.), у штамма YN 1-4 – 1 интрон (501 н.). Генетические различия между ССАР 222/62, СВ 2008/54 и YN 1-4 соответствовали внутривидовому уровню ( $\leq 0.3\%$ ), в остальных случаях – межвидовому ( $\geq 0.4\%$ ) (табл. ESM\_10). СВС между указанными штаммами в ITS1 и в ITS2 не были обнаружены (табл. ESM\_11, ESM\_12). Алгоритмы ABGD и РТР объединили штаммы *D. lacustre* в один вид. Согласно результатам GMYC они относятся к 3 разным видам: 1) штамм СВ 2008/53; 2) штамм СВ 2008/52; 3) аутентичный штамм ССАР 222/62, штаммы СВ 2008/54, YN1-4. Это согласуются со значением генетических дистанций (0.4–0.9%),

однако не подтверждается результатами анализа интронов, поиска СВС и методами ABGD и РТР. Поэтому для уточнения таксономического статуса и точного разграничения криптических видов, штаммы *D. lacustre* нуждаются в дополнительном изучении;

2) отдельную филогенетическую линию образует штамм *Dictyosphaerium* sp. XSBN8\_3, имеющий типичную для представителей группы III морфологию (Song et al., 2018b). Генетические дистанции между штаммом XSBN8\_3 и сестринским кластером *D. lacustre* колебались от 1 до 1.6% (межвидовой уровень) (табл. ESM\_10). Также у штамма XSBN8\_3 по сравнению с *D. lacustre* обнаружено 2 СВС в ITS1 (табл. ESM\_11, ESM\_12). Методы делимитации видов GMYC и РТР подтвердили его самостоятельный видовой статус. Таким образом, штамм *Dictyosphaerium* sp. XSBN8\_3 является представителем нового вида в рамках группы “истинных” *Dictyosphaerium*;

3) отличительной чертой штаммов *D. libertatis* от других представителей группы является наличие молодых клеток яйцевидной формы (Bock et al., 2011b). В составе гена 18S рРНК у ССАР 222/92 в отличие от GL 32/3 присутствует интрон длиной 403 н. Уровень генетических различий между ними – 0.5% (межвидовой уровень) (табл. ESM\_10). Между указанными штаммами найдена 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2. От остальных представителей группы оба штамма отличались на 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM\_11, ESM\_12). Методы GMYC и РТР подтвердили принадлежность этих штаммов к разным видам. Метод ABGD, напротив, объединил представителей *D. libertatis* и *D. ehrenbergianum* в один кластер. Таким образом, о том, что *D. libertatis* может быть разделен на 2 вида свидетельствуют наличие/отсутствие интрона (403 н.), уровень генетических различий (0.5%), 1 СВС в ITS2, результаты делимитации видов методами GMYC и РТР;

4) голотип рода *Dictyosphaerium* – *D. ehrenbergianum*. В отличие от *D. libertatis* и *D. lacustre*, диаметр колоний его представителей может достигать 80 мкм; кроме чашевидного, в клетках встречается поясковидный хлоропласт (табл. 1) (Nägeli, 1849; Bock et al., 2011b). *D. ehrenbergianum* является полифилетичным видом, представители которого формируют 2 филогенетические линии и 4 кластера видового уровня согласно алгоритмам делимитации GMYC (рис. 16). Морфологические различия между ними не были обнаружены. Уровень генетических различий каждого из штаммов GL 26\_2 и GL 28\_4 по сравнению с остальными от 0.5% и выше (межвидовой уровень) (табл. ESM\_10). Штамм GL 26\_2 отличается от родственного штамма GL 28\_4 на 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2. Метод РТР также



подтверждает их видовую специфичность. Генетические дистанции внутри кластеров 3А, 3В, 3С, 3D составляла 0–0.2% (внутривидовой), между кластерами 3С и 3D – 0.3% (внутривидовой уровень), в остальных случаях – 0.5–1.1% (межвидовой). В неконсервативном регионе ITS2 у штаммов кластера 3В была найдена 1 специфическая СВС по сравнению с остальными, у штаммов кластеров 3С и 3D – 2 СВС (табл. ESM\_11, ESM\_12). Анализ РТР разделяет кластер 3А на 5 видов, однако это дробление ничем более не подтверждается. В остальном результаты соответствуют GMYC. Кластеры 3С и 3D, выделенные методом GMYC и РТР, следует рассматривать как представителей одного вида, поскольку уровень генетических различий между кластерами соответствует внутривидовому уровню (0.3%), СВС или иных существенных различий в строении ITS1 и ITS2 между ними не найдено. Таким образом, самостоятельный видовой статус каждого из штаммов GL 26\_2, GL 28\_4, а также кластеров 3А, 3В и объединенной подгруппы 3С и 3D, подтверждены генетическими дистанциями ( $\geq 0.5\%$ ), наличием СВС в ITS1 и/или ITS2 по сравнению с сестринскими филогенетическими линиями, методами делимитации видов РТР и/или GMYC.

**Группа IV** выделена на основании уникального филогенетического положения и объединяет 4 штамма с *Dictyosphaerium*-подобной морфологией, у которых гиалиновые тяжи в колониях крепятся к широкой стороне клеток (табл. 1) (Song et al., 2018b). Штамм ССАР 222/38 в составе гена 18S рРНК имеет интрон длиной 542 н., штамм НС7D2 – 2 интрона длиной 349 н. и 402 н. Генетические дистанции между НС7D2 и ННD2-3 соответствовали внутривидовому уровню (0.2%), между ними и штаммом ССАР 222/38 – межвидовому (0.6–0.7%), между штаммом СВ 2008/31 и остальными представителями группы – межродовому (2.5%) (табл. ESM\_13). Уровень генетических различий с сестринской группой III – 3.1–3.6% (межродовой). Штаммы НС7D2 и ННD2-3 отличались от ССАР 222/38 на 1 СВС в ITS1. Штамм СВ2008/31 отличался от других представителей на 2 СВС в неконсервативных регионах ITS2 (табл. ESM\_14, ESM\_15). Самостоятельный видовой статус штамма СВ2008/31 подтвержден всеми методами делимитации видов. Остальные штаммы согласно анализу АВGD относятся к одному кластеру, тогда как РТР и GMYC выделяет еще 2. Таким образом, вероятно, группа IV объединяет 2 криптических рода. Первый род состоит из двух видов (1-й вид – штамм ССАР 222/38; 2-й вид – штаммы НС7D2 и ННD2-3). Второй род представлен только штаммом СВ 2008/31.

**Группа V** содержит 3 штамма с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, которые различаются способом прикрепления клеток к гиалиновым тяжам (Song et al., 2018b). У штаммов ХУ16-6,

YN24\_2 клетки крепятся к ним широкой стороной, у штамма G129 – узкой (табл. 1). Генетические дистанции между штаммами группы соответствовали межвидовому уровню (0.5–0.8%) (ESM\_16). При анализе ITS1 у штаммов были выявлены различия в длине шпильки III. У штамма ХУ16-6 она составляла 40 н., у штамма YN24\_2 – 33 н., у штамма G129 – 27 н. СВС не были обнаружены ни в ITS1, ни в ITS2. Согласно анализам GMYC и РТР все исследуемые штаммы являются представителями неописанных видов, тогда как метод АВGD объединял их в один кластер. Видовой статус штамма G129 подтверждают особенности морфологии (крепление клеток штамма к гиалиновым стеблям узкой стороной), уровень генетических дистанций ( $\geq 0.5\%$ ), результаты анализа GMYC и РТР. Разделение штаммов ХУ16-6, YN24\_2 на 2 самостоятельных вида, помимо алгоритмов делимитации, подтверждено только уровнем генетических различий. Однако для понимания таксономического статуса данные штаммы нуждаются в дополнительном исследовании.

**Группа VI** микроводоросли с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, у которых колонии состоят, как правило, из 2–4 клеток, соединяющихся с гиалиновыми стеблями узкой стороной (табл. 1). Все представители группы обитатели пресноводных водоемов (Krienitz et al., 2012; Škaloud et al., 2014; Song et al., 2018b). В ее состав входят (рис. 1a):

1) монотипный род *Kalenjinia*. Он представлен типовым видом *K. gelatinosa*. Генетические дистанции между штаммами 0.1%, с другими родами – 1.2–2.5% (межродовой уровень) (табл. ESM\_17). Между штаммами СВС нет (табл. ESM\_18, ESM\_19). Видовой статус *K. gelatinosa* подтвержден всеми методами делимитации;

2) отдельный кластер формируют представители рода *Compactochlorella* и штамм *Dictyosphaerium* sp. WfA1. Типовой вид рода *C. kochii* образует подгруппу с *Dictyosphaerium* sp. WfA1. Она характеризуется генетической неоднородностью. Так, только у штаммов ССАР 222/61, СВ 2008/47 в составе гена 18S рРНК имеется интрон длиной 708 н. Генетическая дистанция между этими штаммами –  $< 0.1\%$  (внутривидовой уровень), между ними и *Dictyosphaerium* sp. WfA1, штаммом СВ 2008/14 – 0.4% (межвидовой), штаммом ССАР 222/7 – 1.2% (табл. ESM\_17). Штаммы ССАР 222/61, СВ 2008/47 отличаются от остальных членов подгруппы на 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM\_18, ESM\_19). Согласно методу GMYC, штаммы данной подгруппы относятся к 4 видам, РТР – к 2 видам. Полифилетичность вида *C. kochii* подтверждают наличие/отсутствие интронов, уровень генетических дистанций (0.4–1.2%), СВС в ITS2, результаты анализа GMYC и РТР. Истинными представителями вида *C. kochii* являются, вероятно, аутентичный штамм

ССАР 222/61 и близкородственный ему СВ 2008/47. Таксономический статус остальных штаммов подгруппы нуждается в уточнении. Сестринской филогенетической линией к *C. kochii* является аутентичный штамм *C. dohrmannii* ССАР 222/5. Уровень генетических различий между *C. dohrmannii* ССАР 222/5 и подгруппой, объединяющей штаммы *C. kochii* и *Dictyosphaerium* sp. WfA1, колебался в пределах от 1.2 до 1.8% (табл. ESM\_17). От всех представителей сестринской подгруппы *C. dohrmannii* ССАР 222/5 отличается 1 СВС в ITS1 и на 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2. Кроме того, по сравнению с ССАР 222/61 и СВ 2008/47 он имеет еще по 1 СВС в ITS1 и неконсервативном регионе ITS2, с ССАР 222/7 – 1 СВС в ITS1, с *Dictyosphaerium* sp. WfA11 – 1 дополнительную СВС в неконсервативной части ITS2 (табл. ESM\_18, ESM\_19). Таким образом, видовой статус *C. dohrmannii* подтвержден генетическими дистанциями ( $\geq 1.2\%$ ), СВС в ITS2, результатами анализов ГМУС и РТР;

3) род *Marasphaerium*, включающий типовой вид *M. gattermannii*, в отличие от остальных имеет преимущественно шаровидную форму взрослых клеток (Krienitz et al., 2012). Генетические дистанции между штаммами ССАР 222/24 и Heg 1983/17 – 0.1% (внутривидовой уровень) (табл. ESM\_17). Аутентичный штамм ССАР 222/24 по сравнению со штаммом Heg 1983/17 имел 3 СВС в неконсервативных регионах ITS2 (табл. ESM\_18, ESM\_19). АВГД и РТР относят их к одному виду, ГМУС – к разным. Поэтому мы считаем, что штаммы ССАР 222/24 и Heg 1983/17 принадлежат одному виду – *M. gattermannii*;

4) сестринский кластер к роду *Marasphaerium* образует монотипный род *Planktochlorella*. Голотип рода *P. nurekis* представлен аутентичным штаммом САУР Н8701 и штаммом ССАР 222/25. Диакритические признаки: клетки одиночные, имеют двуслойную клеточную стенку, не формируют колоний. Однако сами авторы отмечают, что, возможно, способность формировать колонии может проявиться у данного вида при определенных условиях, например, при интенсивной “пастбищной” нагрузке (Škaloud et al., 2014). Генетические дистанции внутри вида составляли 0.2%, межродовые варьировали от 1.8 до 2.9% (табл. ESM\_17). СВС между штаммами не обнаружено (табл. ESM\_18, ESM\_19). Анализ ГМУС отнес штаммы к разным видам, АВГД и РТР к одному виду. Самостоятельный видовой статус подтверждают все методы делимитации. Исходя из уровня генетических различий, отсутствия СВС, результатов АВГД и РТР, можно сказать, что штаммы САУР Н8701 и ССАР 222/25 относятся к одному виду *P. nurekis*;

5) род *Masaia*, представленный типовым видом *M. oloidia* (3 штамма, в т.ч. аутентичный штамм

ССАР 222/32), в отличие от других членов группы способен формировать 8-клеточные колонии (Krienitz et al., 2012). Уровень генетических дистанций между штаммами был равен  $\leq 0.2\%$ , с представителями других родов – 1.2–2.2% (табл. ESM\_17). СВС между штаммами не обнаружены ни в ITS1, ни в ITS2 (табл. ESM\_18, ESM\_19). На основании вышесказанного, а также результатов АВГД, ГМУС и РТР, все три штамма принадлежат к виду *M. oloidia*.

**В группу VII** входят представители рода *Mucidosphaerium*. Они морфологически идентичны группе III и встречаются в сходных экологических условиях (табл. 1) (Bock et al., 2011b). Морфологически виды внутри рода различаются формой молодых клеток (рис. 1):

1) *M. pulchellum* от других представителей рода отличается яйцевидной или овальной формой молодых клеток (табл. 1) (Bock et al., 2011b). Между штаммами имеются расхождения в составе гена 18S рРНК. Так штамм АСОИ 755 имеет 3 интрона (355 н., 518 н., 497 н.), штамм ССАР 222/2А – 4 интрона (355 н., 732 н., 513 н., 497 н.). Генетические дистанции между штаммами ССАР 222/2А и АСОИ 755, а также между UTEX 731 и ССАР 222/2В – 0.2–0.3% (внутривидовой уровень), между этими подгруппами – 0.8% (межвидовой), с другими видами – 2.0–3.9% (табл. ESM\_20). Штаммы ССАР 222/2А и АСОИ 755 по сравнению с остальными имели 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM\_21, ESM\_22). Анализ АВГД отнес все штаммы к одному виду, ГМУС выделил 2 вида, а РТР – 3. Результаты ГМУС подтверждаются генетическими дистанциями, отсутствием интронов у UTEX 731, ССАР 222/2В, 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в ITS2. Таким образом, вид *M. pulchellum*, вероятно, является полифилетичным и включает в себя 2 вида (1-й вид – ССАР 222/2А, АСОИ 755, 2-й вид – UTEX 731, ССАР 222/2В);

2) аутентичный штамм *M. planctonicum* АСОИ 1719, характерной особенностью которого являются исключительно овальная форма молодых клеток (Bock et al., 2011b). В составе нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК присутствует 4 интрона длиной 368 н., 428 н., 440 н., 498 н. Уровень генетических различий от других видов группы VII – 2.2–4.5% (табл. ESM\_20). Между *M. planctonicum* и штаммами *M. pulchellum* ССАР 222/2А, АСОИ 755 была найдена 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM\_21, ESM\_22). Видовой статус был подтвержден всеми методами делимитации;

3) типовой вид рода *Mucidosphaerium* – *M. palustre*, у которого форма молодых клеток варьирует от овальной до почковидной (Bock et al., 2011b). Аутентичный штамм ССАЛА 332 отличается от штамма СВ2008/6 строением и длиной интронов

в гене 18S рРНК (штамм ССАЛА 332 – 4 интрона длиной 422 н., 440 н., 462 н., 429 н., штамм СВ2008/6 – 4 интрона длиной 422 н., 356 н., 447 н., 429 н.). Уровень генетических дистанций между ними – 2.2%, с другими видами – 2.2–3.9% (табл. ESM\_20). СВС между штаммами *M. palustre* не были обнаружены ни в ITS1, ни в ITS2 (табл. ESM\_21, ESM\_22). От родственного *M. sphagnale* они отличаются на 2 СВС в неконсервативных участках ITS2. Анализы GMYC и РТР, в отличие от АВГД, относят штаммы к разным видам, что подтверждается расхождением в составе и длине интронов и высокими значениями генетических дистанций (2.2%);

4) *M. sphagnale*, характерной чертой которого является узкоовальная или полулунная форма молодых клеток (Vock et al., 2011b). Все представители вида в составе гена 18S рРНК имеют два интрона, длина которых составляет 356 н. и 447 н. Генетическая дистанция между штаммами *M. sphagnale* – 0–0.2%, с другими членами группы – 1.9–3.1% (табл. ESM\_20). СВС в ITS1 и ITS2 между данными штаммами не обнаружено (табл. ESM\_21, ESM\_22). Объединение всех трех штаммов в один кластер видовой группы подтверждено методами делимитации GMYC и РТР, метод АВГД объединяет данный вид с представителями *M. palustre*. Однако расхождения в форме молодых клеток, количестве и составе интронов, наличие 2 СВС в ITS2 по сравнению с *M. palustre*, результаты GMYC и РТР позволяют утверждать, что *M. sphagnale* – самостоятельный вид. Таким образом, таксономически признанный род *Mucidosphaerium* характеризуется высоким генетическим полиморфизмом.

**Группа VIII** объединяет штаммы с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, у которых гиалиновые стебли крепятся к широкой стороне клеток (табл. 1) (Krienitz et al., 2012; Song et al., 2018b). Несмотря на морфологию, данная группа с “истинными” представителями рода *Dictyosphaerium* (группа III) не группируется. В состав входят 7 кластеров предположительно видовой группы, выделенных на основании анализов GMYC и РТР (рис. 1а):

1) кластер 8А объединяет штаммы, имеющие в составе гена 18S рРНК интрон длиной 660 п.н. Генетические дистанции между штаммами – 0.2% (внутривидовой), с другими кластерами – 1.3–1.6% (межвидовой) (табл. ESM\_23). Между кластером 8А и сестринским штаммом HND 3-9 обнаружена 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM\_24, ESM\_25). Все методы делимитации подтвердили видовой статус кластера. Таким образом, доказательствами валидности видовой группы кластера 8А являются наличие интрона, уровень генетических дистанций ( $\geq 0.6\%$ ), результаты алгоритмов АВГД, GMYC и РТР;

2) штамм *Dictyosphaerium* sp. HND 3-9, имеющий в гене 18S рРНК интрон длиной 506 п.н. Уровень генетических различий с другими членами группы – 1.4–1.6% (межвидовой уровень) (табл. ESM\_23). Между HND 3-9 и штаммом ССАЛА 335 имел 3 СВС в неконсервативных регионах ITS2, с кластером 8В – 3 СВС в ITS1 и 5 СВС в неконсервативных регионах ITS2, с кластером 8D – 4 СВС в неконсервативных регионах ITS2, со штаммом ССАП 222/41 – 4 СВС в неконсервативных регионах ITS2 (табл. ESM\_24, ESM\_25). Наличие интрона, генетические дистанции  $\geq 0.7\%$ , СВС в ITS2, анализы АВГД, GMYC и РТР подтверждают то, что штамм HND 3-9 относится к новому виду неопisanного *Dictyosphaerium*-подобного рода;

3) уровень генетических дистанций штамма ССАЛА 335 от других представителей группы VIII варьировал от 1.4–1.8% (межвидовой уровень) (табл. ESM\_23). У данного штамма была найдена 1 специфическая СВС в ITS1, отличающая его от остальных членов группы. Штамм ССАЛА 335 отличается от кластера 8А и штамма HND 3-9 на 1 СВС в консервативном регионе ITS2. В неконсервативной части ITS2 штамм ССАЛА 335 по сравнению с кластером 8В и 8С имеет по 1 СВС, кластером 8D – 5 СВС, от штамма ССАП 222/41 – 2 (табл. ESM\_24, ESM\_25). Таким образом, самостоятельный видовой статус штамма ССАЛА 335 подтверждают генетические дистанции  $\geq 1.4\%$ , наличие СВС в ITS1 и ITS2, результаты GMYC и РТР;

4) генетические дистанции между штаммами кластера 8В – 0.2% (внутривидовой уровень), с другими членами группы VIII – 0.6–1.6% (межвидовой) (табл. ESM\_23). Кластер 8В имеет уникальную для группы VIII СВС в I шпильке и 2 СВС в IV шпильке ITS1, по сравнению со всеми штаммами, кроме HND 3-9. Кроме того, между кластером 8В и штаммом ССАП 222/41 найдено 2 СВС в неконсервативных регионах ITS2 (табл. ESM\_24, ESM\_25). Итак, уровень генетических различий ( $\geq 0.6\%$ ), наличие СВС в ITS1 и ITS2, результаты GMYC и РТР указывают, что штаммы кластера 8В относятся к самостоятельному виду;

5) внутри кластера 8С генетические дистанции соответствовали внутривидовому уровню ( $\leq 0.2\%$ ), с остальными представителями группы межвидовому – 1.2–1.7% (табл. ESM\_23). Кроме СВС, приведенных ранее, представители кластера 8С отличались на 1 СВС в консервативной III шпильке ITS2 от остальных членов группы, за исключением *Dictyosphaerium* sp. ССАЛА 335 и штаммов кластера 8В (табл. ESM\_24, ESM\_25). Таким образом, видовой статус штаммов кластера 8С подтверждают генетические дистанции ( $\geq 1.2\%$ ), СВС в ITS2, анализы АВГД, GMYC и РТР;

6) штаммы кластера 8D в отличие от сестринской филогенетической линии *Dictyosphaerium* sp. ССАР 222/41 в составе гена 18S рРНК не имеют интрона. Генетические дистанции внутри кластера 8D – 0–0.1% (внутривидовой уровень), между кластером 8D и штаммом ССАР 222/41 – 0.3% (внутривидовой), между ними и остальными кластерами – 1.0–1.7% (межвидовой) (табл. ESM\_23). СВС между кластером 8D и штаммом ССАР 222/41 ни в ITS1, ни в ITS2 не обнаружено (табл. ESM\_24, ESM\_25). Вероятно, кластер 8D и штамм ССАР 222/41 относятся к одному и тому же криптическому виду, принадлежащему *Dictyosphaerium*-подобному роду, о чем свидетельствуют единая морфология, уровень генетических различий, отсутствие СВС в ITS1 и ITS2.

**Группа IX** объединяет микроводоросли с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, у которых гиалиновые стебли крепятся к широкой стороне клеток (табл. 1) (Krienitz et al., 2012; Song et al., 2018b). Члены группы XI также к “истинным” *Dictyosphaerium* не относятся. В состав группы входят (рис. 1a):

1) штамм *Dictyosphaerium* sp. YN12-3;

2) кластер, включающий 10 штаммов. Данный кластер характеризуется гетерогенностью в строении гена 18S рРНК: штаммы YN29-3, J16-1, YN12-1 имеют интрон длиной 403 н. Уровень генетических различий внутри кластера – 0.1 до 0.2% (внутривидовой уровень), между кластером и штаммом *Dictyosphaerium* sp. YN12-3 – 0.4–0.5% (межвидовой уровень) (табл. ESM\_26). Штамм *Dictyosphaerium* sp. YN12-3 отличался от других представителей группы на 2 СВС в ITS1, от штаммов I68, J18-2, ССАР 222/4 – на еще 1 дополнительную СВС в ITS1 (табл. ESM\_27). СВС в ITS2 отсутствовали. Согласно методу АВGD все штаммы группы относятся к одному виду, согласно РТР – к 2 видам, GMYC – к 4. Видовой статус штамма *Dictyosphaerium* sp. YN12-3 подтверждают уровень генетических различий ( $\geq 0.4$ ), 2 СВС в ITS1, результаты GMYC, РТР. Все остальные представители группы относятся к другому виду. Генетические дистанции между ними невелики и соответствуют внутривидовому уровню ( $\leq 0.2\%$ ), СВС в ITS1 и ITS2 не найдены. Наличие интрона у некоторых из них может указывать на начавшиеся процессы видообразования, но пока происходящие на популяционном уровне (Gaonkar et al., 2018).

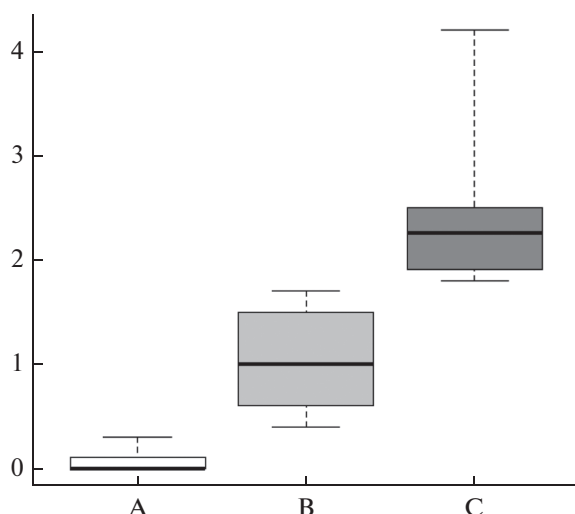
**Группа X** состоит из монотипного рода *Dicloster* и включает в себя 3 штамма типового вида *Dicloster acutus* (рис. 1a). Нуклеотидные последовательности аутентичного штамма в GenBank отсутствуют. Отличительными признаками являются *Scenedesmus*-подобный морфотип, клетки изогнутые, с длинными сужающимися, заостренными концами, хлоропласт чаще всего с 1–2 пиреноидами

(реже отсутствует или от 3 до 5) (табл. 1). Кроме того, может активно развиваться в кислых водах, в т.ч. в болотах (Jao et al., 1975). Генетические дистанции между штаммами были не более 0.1% (внутривидовой уровень). Межродовые различия с сестринской группой XI, включающей род *Closteriopsis*, составляли 2.1–2.2%. СВС внутри группы отсутствовали. Методы делимитации видов GMYC и АВGD в отличие от РТР подтвердили принадлежность всех штаммов группы к одному виду.

**Группа XI** представлена видом *Closteriopsis acicularis* (рис. 1a). К сожалению, информация о нуклеотидных последовательностях типового вида рода *C. longissima* и аутентичного штамма *C. acicularis* отсутствует в GenBank. Характерные черты: *Actinastrum*-подобный морфотип, клетки веретеновидные, прямые или изогнутые, одиночные или в небольших скоплениях, хлоропласт желобовидный с 1, 2 или без пиреноида, размножение автоспорами (табл. 1). Представители данной группы – обитатели пресноводных водоемов (Belcher, Swale, 1962). Генетические дистанции между штаммами SAG 11.86 и EN 2003/36 были менее чем 0.1% (внутривидовой уровень), между подгруппой штаммов SAG 11.86, EN 2003/36 и штаммом FACHB-2133 –  $\geq 0.5\%$  (межвидовой уровень). Между штаммами SAG 11.86, EN 2003/36, FACHB-2133 выявлена 1 СВС в ITS1 (H III: G→U→C→G, 11 п.н.). Анализы GMYC и РТР, в отличие от метода АВGD, подтвердили разделение группы на 2 вида. Таким образом, учитывая генетические дистанции ( $\geq 0.5\%$ ), наличие СВС в ITS1, результаты GMYC и РТР, можно предположить, что вид *Closteriopsis acicularis* состоит из двух независимых видов: 1-й вид – штаммы SAG 11.86, EN 2003/36; 2-й вид – штамм FACHB-2133.

**Сестринскую к группе XI филогенетическую линию** образует штамм *Dictyosphaerium* sp. ССАР 222/43. Имеет типичный *Dictyosphaerium*-подобный морфотип (табл. 1) (Song et al., 2018b). Генетические дистанции с представителями группы X составляли 2.7%, группы XI – 2.3–2.5%. Методы делимитации видов GMYC, РТР и АВGD подтвердили, что *Dictyosphaerium* sp. ССАР 222/43 является представителем нового, пока не описанного вида, принадлежащего *Dictyosphaerium*-подобному роду.

**Самостоятельную филогенетическую линию** образует род *Coronacoccus*, представленный типовым видом рода *C. henyangensis* (рис. 1a). Характеризуется способностью формировать 4- реже 8-клеточные колонии, *Scenedesmus*-подобные, покрытые аморфной слизью (табл. 1). Форма молодых и взрослых клеток внутри колоний варьирует. Иногда встречаются четырехгранные клетки или слегка асимметричные (Song et al., 2018a). Уровень генетических различий данного вида с груп-



**Рис. 3.** Генетические дистанции (%) внутри видов (А), между видами (В) и между родами (С). Границы бокса показывают первый и третий квартили, жирная горизонтальная линия – медианное значение, “усы” – размах. Таксоны с неясным систематическим положением, требующие дополнительных исследований, не учтены.

пами X, XI и *Dictyosphaerium* sp. ССАР 222/43 составляли 3–4.1%, а методы делимитации видов GMYC, РТР и ABGD подтвердили его самостоятельный таксономический статус.

Топология дерева, представленного в работе, соответствовала более ранним исследованиям (Bock et al., 2011b; Krienitz et al., 2012; Škaloud et al., 2014; Song et al., 2018a, 2018b). Группы II, IV, V, VIII, IX, объединяющие штаммы, идентифицированные как *Dictyosphaerium* sp., соответствовали линиям, выделенным Song и соавт. (2018b). Увеличение выборки представителей клады *Parachlorella*, используемых в анализе (Krienitz et al., 2012 – 36 штаммов, Škaloud et al., 2014 – 30 штаммов, Song et al., 2018a – 67 штаммов, Song et al., 2018b – 105 штаммов, данная работа – 115 штаммов) позволило уточнить филогенетическое положение этих групп, а также способствовало тому, что представители родов с преимущественно *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, колонии которых состояли не более чем из 8 клеток, вошли в состав группы VI. Сравнение рассчитанных генетических дистанций с другими диакритическими признаками (форма клеток, способность формировать колонии, способ крепления клеток к гиалиновым тяжам, тип хлоропласта, количество пиреноидов, присутствие слизи, наличие интронов, уровень генетических различий, наличие СВС в ITS1 и ITS2, среда обитания, кластеризация методами ABGD, GMYC, РТР) позволило уточнить внутривидовые, межвидовые и межродовые уровни различий (рис. 3).

На сегодняшний день в составе клады *Parachlorella* описано с применением совокупности морфологических и молекулярно-генетических методов всего 12 родов и порядка 20 видов, но по результатам проведенного анализа истинное видовое и родовое богатство данной группы оказалось существенно выше – не менее 20 родов и 46 видов. К диакритическим морфологическим признакам, обеспечивающим таксономическое разделение микроводорослей внутри клады, можно отнести размер и форму молодых и взрослых клеток, способ крепления клеток к гиалиновым тяжам, диаметр колоний, наличие и толщина слизи, тип хлоропласта, наличие и количество пиреноидов. Дополнительной экологической характеристикой также может служить специфическое местообитание, например, болота или поверхность почвы. По итогам анализа генетических дистанций нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 можно предположить, что внутривидовые различия, как правило, находятся в пределах 0–0.2%, межвидовые – в пределах 0.4–2.6%, межродовые – 1.2–4.2%. Представители группы VII (род *Mucidosphaerium*) отличались высоким генетическим полиморфизмом: генетические различия между таксономически признанными видами в этой группе соответствовали диапазону 1.9–4.5%, который являлся межродовым уровнем для других групп клады. Использование интрона в качестве критерия разделения близкородственных видов было эффективно для представителей групп II, IV, VIII, рода *Mucidosphaerium*, а также для штаммов видов *Compactochlorella kochii* и *D. libertatis*. Применение классического СВС-подхода, основанного на поиске СВС исключительно в консервативных регионах ITS2 (Coleman, 2003, 2009, 2015), было успешным только для представителей группы II. Низкую эффективность СВС-подхода для *Parachlorella*-клады отмечали также в своей работе Song и соавт. (2018a, 2018b). В связи с этим, в остальных группах в роли вспомогательного инструмента для разграничения видов были использованы СВС в ITS1 и в неконсервативных регионах ITS2. Кроме того, в качестве молекулярной подписи видов рода *Parachlorella* можно рассматривать мотив, расположенный сразу после вершины III шпильки ITS1: для *P. kessleri* – мотив GCUG, для *P. beijerinckii* – AGCC, для *P. hussii* – GAAA. Используемые алгоритмы делимитации видов имели различные результаты по количеству выделенных кластеров потенциально видового уровня: дистанционный метод ABGD является менее “чувствительным” и выделит 24 кластера, в то время как более совершенные топологические алгоритмы GMYC и РТР – 57 и 55 кластеров соответственно. Следует отметить, что выделенные кластеры по своей сути являются молекулярными оперативными таксономическими единицами (molecular operational taxonomic units, MOTUs), т.е. представ-



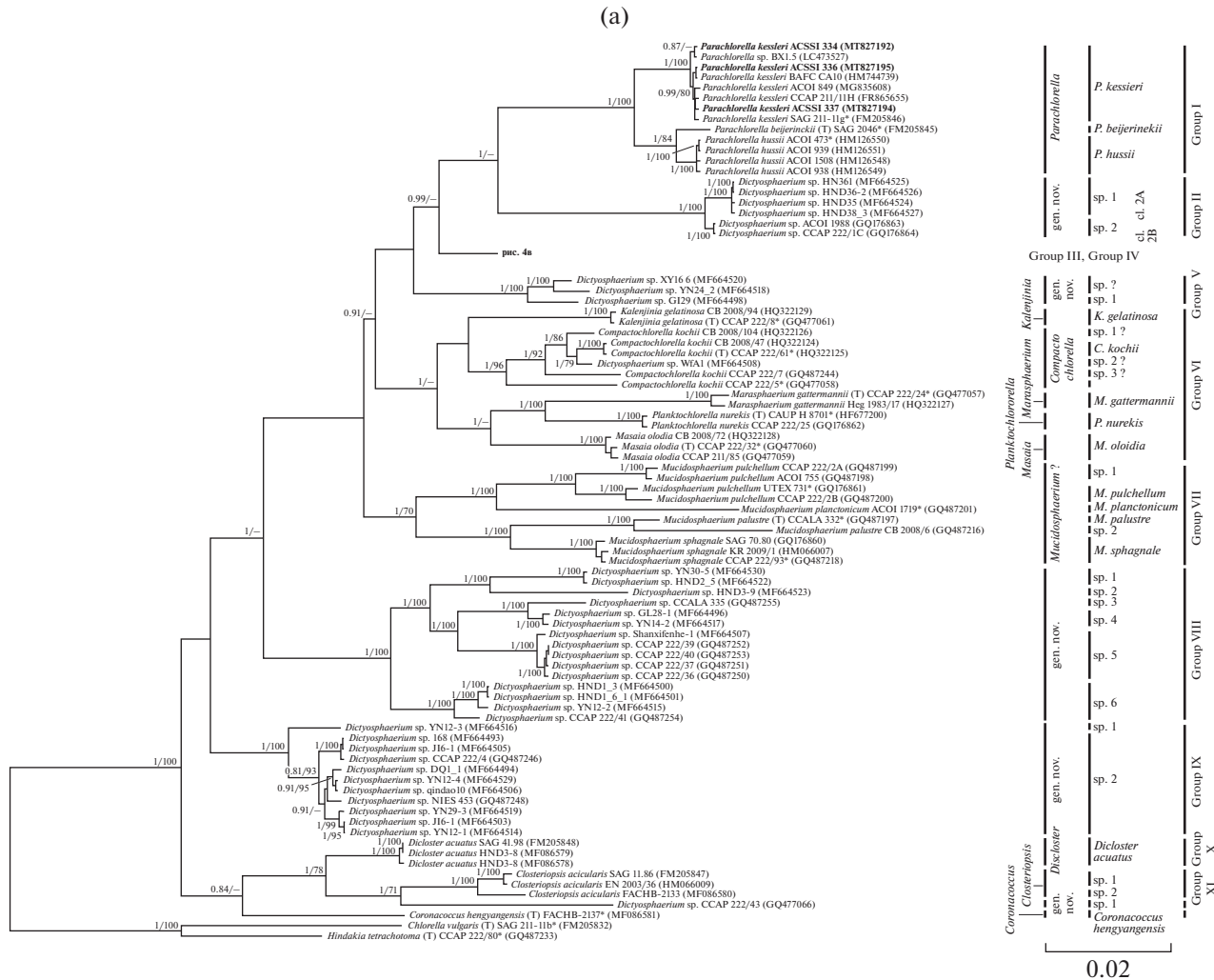


Рис. 4. Предполагаемое разделение родов и видов внутри клады *Parachlorella*. (а) — Клада *Parachlorella*; (б) — группа III и IV. Обозначения: жирным шрифтом выделены штаммы ACSS1, исследуемые в рамках данной работы, \* — аутентичные штаммы; (Т) — типовой вид, ? — таксономический статус нуждается в уточнении.

ляют собой предварительные гипотезы о валидности вида, нуждающиеся в подтверждении другими характеристиками. На наш взгляд, GMYC и PTP более реалистично отражают систематику клады *Parachlorella*, являясь эффективным вспомогательным инструментом для разграничения видов, валидность которых была подтверждена также и другими дополнительными признаками.

Таким образом, по результатам кластеризации методами делимитации видов GMYC, PTP и ABGD, наличию/отсутствию интронов и их характеристикам, значению генетических дистанций, сравнению вторичных структур ITS1 и ITS2, нам удалось охарактеризовать 11 групп и 2 филогенетические линии в рамках клады *Parachlorella* и выдвинуть предположения о разделении родов и видов внутри выделенных групп. Предположена полифилетичность видов *D. libertatis*, *D. ehrenbergianum*, *Compactochlorella*

*relli kochii*, *Mucidosphaerium pulchellum*, *M. palustre*, *Closteropsis acicularis*. Истинными представителями рода *Dicyosphaerium* могут считаться виды группы III, которые объединились с типовым видом рода — *D. ehrenbergianum*, что согласуется с результатами Song et al. (2018b). Остальные представители рода, определенные как *Dicyosphaerium* sp., но вошедшие в состав групп II, IV, V, VII, VIII, IX, а также штамм CCAP 222/45, формирующие отдельные филогенетические линии, по-видимому, “истинными” членами рода *Dicyosphaerium* не являются, и их таксономическая принадлежность нуждается в дальнейшем изучении и уточнении (рис. 4).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность руководителю коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS

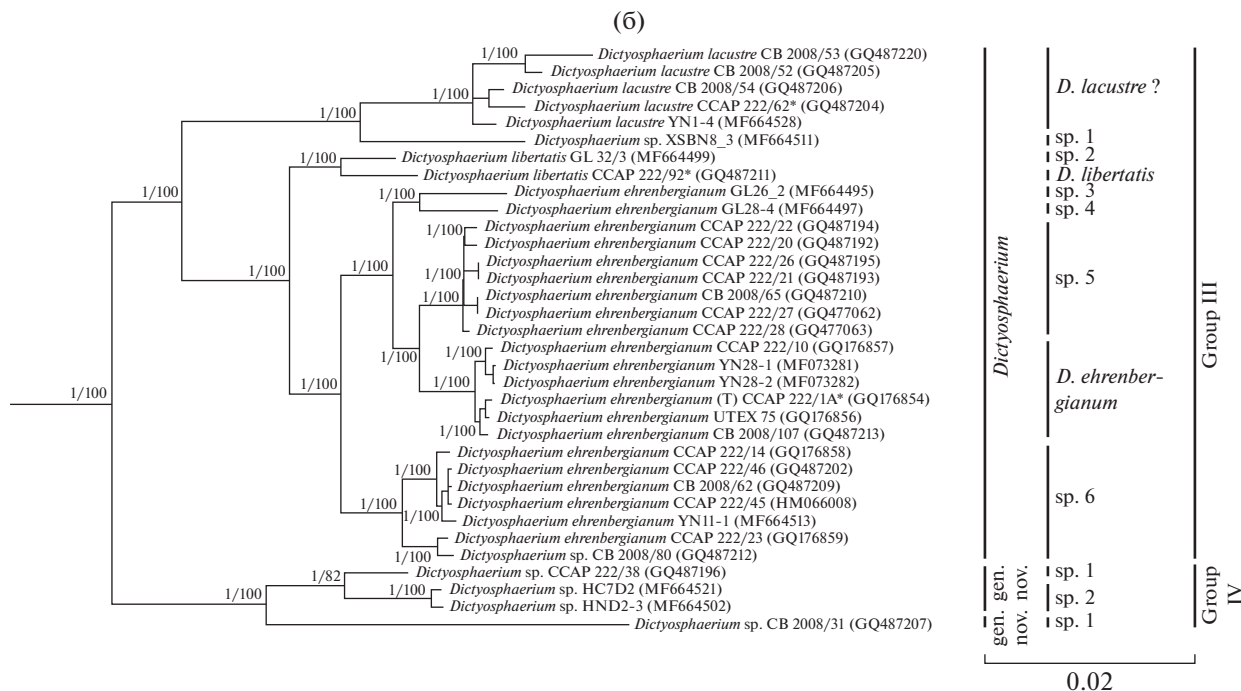


Рис. 4. Окончание

ИФР РАН к. б. н. М.А. Синетовой за предоставление штаммов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Культивирование, микроскопия штаммов АСССИ и анализ литературы выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60002, молекулярно-филогенетические работы выполнены при поддержке РНФ в рамках проекта № 19-74-00030.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учеб. пособие. Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. 152 с.  
Кривина Е.С., Темралева А.Д. Проблема идентификации и криптическое разнообразие микроводорослей клады *Chlorella* (*Chlorophyta*) // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 714–727.

Krivina E.S., Temraleeva A.D. Identification problems and cryptic diversity of *Chlorella*-clade microalgae (*Chlorophyta*) // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 720–732.

Aslam Z., Shin W., Kim M.K., Im W.-T., Lee S.-T. *Marinichlorella kaistiae* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) based on polyphasic taxonomy // J. Phycol. 2007. P. 576–584.

Belcher J.H., Swale, E.M.F. Some *Chlorococcales* new to Britain // Brit. Phycol. Bull. 1962. V. 2. P. 121–125.

Bock C., Pröschold T., Krienitz L. Two new *Dictyosphaerium*-morphotype lineages of the *Chlorellaceae* (*Trebouxiophyceae*): *Heynigia* gen. nov. and *Hindakia* gen. nov. // Eur. J. Phycol. 2010. V. 45. P. 267–277.

Bock C., Pažoutová M., Krienitz L. Phylogenetic position of *Coronastrum ellipsoideum* and description of *Parachlorella hussii* sp. nov. // Biologia. 2011a. V. 66/4. P. 585–594.

Bock C., Pröschold T., Krienitz L. Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (*Trebouxiophyceae*) based on morphological and molecular data // J. Phycol. 2011b. V. 47. P. 638–652.

Caisová L., Marin B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the *Chlorophyta* identified by phylogenetic reconstruction // Protist. 2013. V. 164. P. 482–496.

Coleman A.W. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // Mol. Phylogenet. Evol. 2009. V. 50. P. 197–203.

Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence // Protist. 2000. V. 151. P. 1–9.

Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // Trends Genet. 2003. V. 19. P. 370–375.



- Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure // Trends Genet. 2015. V. 31. P. 157–163.
- Drummond A.J., Nicholls G.K., Rodrigo A.G., Solomon W. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data // Genetics. 2002. V. 161. P. 1307–1320.
- Fawley M.W., Dean M.L., Dimmer S.K., Fawley K.P. Evaluating the morphospecies concept in the *Selenastraceae* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) // J. Phycol. 2006. V. 42. P. 142–154.
- Fujisawa T., Barraclough T.G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets // Syst. Biol. 2013. V. 62. P. 707–724.
- Gaonkar C.C., Piredda R., Minucci C., Mann D., Montresor M., Sarno D., Kooistra W.H.C.F. Annotated 18S and 28S rDNA reference sequences of taxa in the planktonic diatom family *Chaetocerotaceae* // PLoS One. 2018. V. 13. e0208929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208929>.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2021. <http://www.algaebase.org>.
- Jao C.-C., Wei Y.X., Hu H.J. *Diclostera*, a new genus of *Chlorococcales* // Acta Hydrobiol. Sin. 1975. V. 6. P. 115–116.
- Hoshina R., Iwataki M., Imamura N. *Chlorella variabilis* and *Micractinium reisseri* sp. nov. (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*): Redescription of the endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* (*Peniculia*, *Oligohymenophorea*) in the 120th year // Phycol. Res. 2010. V. 58. P. 188–210.
- Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // Phycologia. 2004. V. 43. P. 529–542.
- Krienitz L., Bock C., Kotut K., Pröschold T. Genotypic diversity of *Dictyosphaerium*-morphospecies (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) in African inland waters, including the description of four new genera // Fottea. 2012. V. 12. P. 231–253.
- Krienitz L., Bock C., Luo W., Pröschold T. Polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium*-morphotype within *Chlorellaceae* (*Trebouxiophyceae*) // J. Phycol. 2010. V. 46. P. 559–563.
- Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // Plant Biol. 2010. V. 12. P. 545–553.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // Mol. Ecol. 2012. V. 21. P. 1864–1877.
- Škaloud P., Němcová Y., Pytela J., Bogdanov N.I., Bock C., Pickinpaugh S.H. *Planktochlorella nurekis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a novel coccoid green alga carrying significant biotechnological potential // Fottea. 2014. V. 14. P. 53–62.
- Song H., Liu X., Hu Y., Wang Q., Long J., Liu G., Hu Z. *Coronacoccus hengyangensis* gen. et sp. nov., a new member of *Chlorellaceae* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) with *Radiococcean* morphology // Phycologia. 2018a. V. 57. P. 363–373.
- Song H., Qinghua Wang Q., Liu X., Hu Y., Long J., Guoxiang Liu G., Hu Z. Phylogenetic diversity and taxonomic problems of the *Dictyosphaerium* morphotype within the *Parachlorella* clade (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) // J. Eukaryot. Microbiol. 2018b. V. 65. P. 382–391.
- Temraleeva A., Moskalenko S., Mincheva E., Bukin Y., Sinetova M. *Spongiosarcinopsis terrestris* gen. et sp. nov. (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*): a new genus of green algae from gray forest soil, Russia // Phytotaxa. 2018. V. 376. P. 291–300.
- Ustinova I., Krienitz L., Huss V.A.R. *Closteriopsis acicularis* (G.M. Smith) Belcher et Swale is a fusiform alga closely related to *Chlorella kessleri* Fott et Nováková (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // Eur. J. Phyco. 2001. V. 36. P. 341–351.
- Yamamoto M., Kurihara I., Kawano S. Late type daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // Planta. 2005. V. 221. P. 766–775.
- Zhu X.C., Chen J., Chen R., Jiang L.Y., Qiao G.X. DNA barcoding and species delimitation of *Chaitophorinae* (*Hemiptera*, *Aphididae*) // ZooKeys. 2017. V. 656. P. 25–50.
- Zou S., Fei C., Song J., Bao Y., He M., Wang C. Combining and comparing coalescent, distance and character-based approaches for barcoding microalgae: a test with *Chlorella*-like species (*Chlorophyta*) // PLoS One. 2016a. V. 11. e0153833.
- Zou S., Fei C., Wang C., Gao Z., Bao Y., He M., Wang C. How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (*Chlorophyceae*) // Sci. Rep. 2016b. V. 6. P. 1–13.

## Species Delimitation and Cryptic Diversity Analysis of *Parachlorella*-Clade Microalgae (*Chlorophyta*)

E. S. Krivina<sup>1</sup>\*, A. D. Temraleeva<sup>1</sup>, and Yu. S. Bukin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, 142290 Russia

<sup>2</sup>Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

\*e-mail: pepelisa@yandex.ru

Received January 27, 2021; revised March 17, 2021; accepted March 22, 2021

**Abstract**—This article discusses the system of green microalgae of the clade *Parachlorella*, based on morphological, ecological, and molecular genetic data. The diagnostic characteristics of the selected genera and species and the systematic position of some taxa are discussed. Molecular phylogenetic analysis of the *Parachlo-*

*rella* clade has shown that, despite the relative simplicity of morphology, it is characterized by high cryptic diversity. The polyphyletic nature of the genus *Dictyosphaerium* and some species (*D. libertatis*, *D. ehrenbergianum*, *Compactochlorella kochii*, *Mucidosphaerium pulchellum*, *M. palustre*, and *Closteriopsis acicularis*) was shown. The use of the intron as a universal criterion for closely related species was effective for representatives of groups II, IV, VII, and VIII, as well as for strains of the species *Compactochlorella kochii* and *D. libertatis*. The application of the classical CBC approach, based on the search for CBC in conservative ITS2 regions, was successful only for the representatives of group II. The results of analysis of genetic distances and the GMYC, PTP, and ABGD species delimitation algorithms are not universal tools for determining species boundaries and need to be confirmed by other characteristics (cell shape, ability to form colonies, the way the cells attach to hyaline interconnecting strands, the type of chloroplast, the number of pyrenoids, the presence of mucilage, the presence/absence of introns, the level of genetic differences, the presence of CBC in ITS1 and ITS2, the habitat). Due to the combined use of morphological, ecological and genetic features, it was possible to characterize 11 groups and 2 phylogenetic lines within the clade *Parachlorella* and to make assumptions about the division of genera and species within the selected groups.

**Keywords:** microalgae, morphology, ecology, phylogeny, 18S–ITS1–5.8S–ITS2, differentiation of species

## ИЗМЕНЕНИЯ В СИНТЕЗЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ВЛИЯЮТ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК *AZOSPIRILLUM BALDANIORUM* IN PLANTA В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ МЕДИ

© 2021 г. Л. П. Петрова<sup>а, \*</sup>, Ю. А. Филипьевичева<sup>а</sup>, Е. М. Телешева<sup>а</sup>,  
Т. Е. Пылаев<sup>а, b, c</sup>, А. В. Шелудько<sup>а, \*\*</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, 410049 Россия

<sup>б</sup>Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Саратов, 410012 Россия

<sup>с</sup>Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, 410010 Россия

\*e-mail: petrova\_lp@mail.ru

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

Поступила в редакцию 03.02.2021 г.

После доработки 17.03.2021 г.

Принята к публикации 17.03.2021 г.

В условиях повышенного содержания меди жизнеспособность бактерий *Azospirillum baldaniorum* на корнях проростков пшеницы, количество клеток, колонизирующих корни и образующих биопленку, зависели от физико-химических свойств липополисахаридов (ЛПС, Lps), синтезируемых этими бактериями. По сравнению со штаммом Cal<sup>+</sup> LpsI LpsII *A. baldaniorum* Sp245, его мутанты Cal<sup>-</sup> LpsI<sup>-</sup> KM252, Lps II<sup>-</sup> KM139 и Cal<sup>-</sup> LpsII<sup>-</sup> Mot<sup>-</sup> KM018 хуже колонизировали корни и формировали более тонкие биопленки. Изменения в синтезе полисахаридов у KM252, KM139 и KM018 опосредовали увеличение аккумуляции клетками меди и снижение устойчивости бактериальных культур к негативному влиянию ионов этого металла. *In planta* и/или на модельной поверхности полистирола избыток меди приводил к увеличению содержания полисахаридных антигенов в биопленках штамма Sp245 и его мутантов с изменениями в составе гликополимеров. Инокуляция штаммом Sp245 положительно влияла на рост стеблей и листьев пшеницы как в присутствии количества меди, не оказывающего заметного влияния на рост каждого из партнеров (0.001 мМ), так и в условиях повышенной (до 0.5 мМ) концентрации ионов этого металла. Штаммы KM018, KM139 и KM252 положительно влияли на проростки только при высокой концентрации меди в среде.

**Ключевые слова:** *Azospirillum baldaniorum*, липополисахариды, колонизация растений, биопленки, тяжелые металлы, устойчивость к меди

**DOI:** 10.31857/S0026365621040133

Азоспириллы – это ризобактерии, способствующие росту и развитию широкого круга растений благодаря своей способности фиксировать атмосферный азот, вырабатывать фитогормоны, контролировать развитие фитопатогенов и защищать от стресса, в том числе обусловленного тяжелыми металлами (Döbereiner, Day, 1976; Fibach-Paldi et al., 2012; Abd El-Samad, 2017; Fendrihan et al., 2017). Типовой штамм *A. baldaniorum* Sp245 (ранее *A. brasilense*; Dos Santos Ferreira et al., 2020) является модельным в исследованиях приспособления азоспирилл к существованию в динамичной почвенной среде, в том числе в ассоциации с растениями (Lugtenberg, Kamilova, 2009; Шелудько и соавт., 2010; Fibach-Paldi et al., 2012). Перестройки в геноме у *A. baldaniorum* Sp245, сопровождающиеся изменениями в продукции по-

верхностных гликополимеров, влияют на устойчивость бактерий к ионам кобальта(II), меди(II), серебра(I) и цинка(II) (Shelud'ko et al., 2012). Механизмы, обеспечивающие устойчивость микробов к ионам тяжелых металлов и поддержание гомеостаза металлов, необходимых для жизнедеятельности, тесно взаимосвязаны (Nies, 1999; Tak et al., 2013) и могут осуществляться с участием гликополимеров (Stoderegger, Herndl, 1998; Lino et al., 2006). Ионы меди необходимы для многих биохимических реакций; тем не менее, медь относится к тяжелым металлам, которые в высоких концентрациях токсичны для почвенной микрофлоры, подавляют многие микробиологические процессы, снижают урожайность растений и содержание питательных веществ (Kamnev et al., 2005; Jing et al., 2007; Tak et al., 2013).

В естественных экосистемах большинство микроорганизмов существует в виде прикрепленных к субстрату биопленок. Образую биопленки, бактерии повышают устойчивость своей популяции к динамическим условиям окружающей среды, различным негативным факторам и токсическим элементам (Flemming, Wingender, 2010; Nocelli et al., 2016; Шелудько и соавт., 2018; Shelud'ko et al., 2019). Биопленки – это структурированные сообщества микроорганизмов, встроенных в матрикс (Flemming, Wingender, 2010). Матрикс представляет собой структурный каркас биопленок, резервуар факторов роста, ферментов и питательных веществ; кроме того, он выполняет защитную функцию. Основой внеклеточного матрикса биопленок является смесь экзополисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других биополимеров. Разнообразие структурных компонентов матрикса биопленок сопоставимо с количеством видов бактерий и даже штаммов, образующих биопленки (Flemming, Wingender, 2010).

Штамм *A. baldaniorum* Sp245 продуцирует липополисахарид, состоящий из LpsI и LpsII с разной антигенной структурой и разным зарядом углеводной части, O-специфического полисахарида (ОПС) и/или корового олигосахарида (Fedonenko et al., 2002; Petrova et al., 2020, 2020a). Повторяющимся звеном ОПС, входящим в состав LpsI (с негативно заряженной углеводной частью) и LpsII (с незаряженной углеводной компонентой), является пентасахарид, состоящий из остатков Д-рамнозы (Fedonenko et al., 2002). Было показано, что калькофлуор-связывающие полисахариды (Cal-фенотип) и комплексы, содержащие ЛПС, белковые структуры и полярный жгутик, фиксируют зрелые биопленки азоспирилл на твердых поверхностях и выполняют каркасную функцию (Шелудько и соавт., 2010, 2018). Компоненты матрикса биопленок *Azospirillum*, участвующие в защите бактерий от окружающей их среды, включая ионы тяжелых металлов, практически не охарактеризованы. Характеристика функциональной роли компонентов матрикса биопленок необходима для понимания механизмов образования и распространения биопленок, а также для разработки методов регулирования этих процессов в экологических и биотехнологических целях. Обсуждается использование микробных биопленок для устранения загрязнения тяжелыми металлами (Chang et al., 2006; Nocelli et al., 2016).

Мутанты *A. baldaniorum* Sp245 с фенотипом LpsII<sup>-</sup> (KM018 и KM139) или LpsI<sup>-</sup> (KM252) являются интересными моделями для анализа влияния изменений степени гетерогенности ЛПС на устойчивость биопленок *Azospirillum* к избыточному содержанию меди в культуральной среде. Мутанты содержат одиночную вставку искусственного транспозона Omegon-Km в гены биосинтеза полисахаридов (AZOBR\_p60025, AZOBR\_p60126 и

AZOBR\_p60120) плазмиды AZOBR\_p6 (Кацы, Прилипов, 2015; Petrova et al., 2020, 2020a). Спонтанные или индуцированные изменения состава и/или структуры плазмид штамма *A. baldaniorum* Sp245, приводящие к дефектам в образовании липополисахарида и полисахаридов, связывающих калькофлуор, оказывают заметное влияние на эффективность формирования биопленок азоспирилл на абиотических поверхностях (Шелудько и соавт., 2008; Petrova et al., 2020). Известно, что бактериальные липополисахариды связывают ионы меди (Lino et al., 2006). Вполне вероятно, что изменение физико-химических свойств липополисахаридов, синтезируемых бактериями, способно оказать влияние на формирование микроорганизмами биопленок *in planta* и эффективность функционирования ассоциативного симбиоза с растениями и в условиях повышенного содержания ионов тяжелых металлов.

Целью данной работы явился анализ влияния изменений в синтезе полисахаридов у мутантов *A. baldaniorum* Sp245 на рост бактериальных культур, колонизацию проростков пшеницы и формирование биопленок *in planta* в присутствии различных концентраций ионов меди.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Штаммы и условия культивирования бактерий.

В работе использовались штамм *A. baldaniorum* Sp245, выделенный в Бразилии из корней пшеницы (*Triticum* sp.) (Baldani et al., 1983; Dos Santos Ferreira et al., 2020). Km<sup>R</sup> мутанты этого штамма – KM252 (Cal<sup>-</sup> LpsI<sup>-</sup>), KM139 (LpsII<sup>-</sup>) и KM018 (Cal<sup>-</sup> LpsII<sup>-</sup> Mot<sup>-</sup>), содержащие одиночную вставку искусственного транспозона Omegon-Km в генах биосинтеза полисахаридов, локализованных на плазмиде AZOBR\_p6 (Кацы, Прилипов, 2015; Petrova et al., 2020, 2020a). Бактерии выращивали в малатно-солевой среде (МСС) (Döbereiner, Day, 1976) при 30°C. При необходимости в среду вносили канамицин (Km) до конечной концентрации 50 мкг/мл или 0.625 мкМ карбонилцианида *m*-хлорфенилгидразона (СССР).

**Определение уровня устойчивости бактерий к ионам меди.** Определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), т.е. минимальную концентрацию CuSO<sub>4</sub>, предотвращающую видимый рост бактерий в течение 24–72 ч инкубации. 24-ч культуры, выращенные в жидкой МСС, инокулировали в жидкие МСС с 0.01% дрожжевого экстракта и различными концентрациями CuSO<sub>4</sub> до ОП<sub>590</sub> = 0.05–0.10 (*l* = 0.5 см). Шаг концентрации составлял 0.1 мМ. Инкубировали с аэрацией при 140 об./мин и 30°C. Через 24–72 ч инкубации измеряли ОП<sub>590</sub> (*l* = 0.5 см).

**Инокуляция растений бактериями.** Семена мягкой яровой пшеницы сорта Саратовская 29 (ВНИИСХ

Юго-Востока РАСХН, Саратов) стерилизовали и прорастивали в течение 3-х сут как описано ранее (Шелудько и соавт., 2010). Инокуляцию растений проводили выращенными в жидкой МСС и отмытыми 50 мМ фосфатным буфером (рН 7.0) (ФБ) от среды бактериями способом, описанным ранее (Шелудько и соавт., 2010). Инокулированные проростки пшеницы помещали над слоем жидкости в пробирки, содержащие 10 мл среды для растений следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 4;  $\text{CaCl}_2$  – 1.25;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.0016;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0.00025;  $\text{MgSO}_4$  – 0.09;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.0025;  $\text{KJ}$  – 0.008;  $\text{ZnSO}_4$  – 0.015;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.028; этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль – 0.037 (рН 6.0). В ряде вариантов опыта концентрацию  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  увеличивали с 0.001 до 0.5, 1.0 или 5.0 мМ. Растения выращивали 7 дней при 22°C и естественном освещении. Распределение биопленок на поверхности корней исследовали с использованием микроскопа Leica DM6000 B (“Leica Microsystems”, Германия).

**Определение численности бактерий на корнях проростков пшеницы.** Из навесок стерильно отмытых корней 10-дневных проростков готовили гомогенат, в котором определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) посредством высевов серийных разведений на плотную МСС. Количество бактерий, высеваемых с корней, пересчитывали на одно растение. Контролировали наличие постоянной микрофлоры в гомогенатах корней (Шелудько и соавт., 2010). Образцы, в посевах которых встречались колонии с нехарактерной для азоспирилл морфологией, отбрасывали.

**Определение аккумуляции меди бактериальными клетками и проростками пшеницы.** Исследования проводили на атомно-абсорбционном спектрометре Thermo Scientific iCE 3500 (“Thermo Scientific”, США). В качестве источника света использовали лампы полого катода. Бактериальные культуры выращивали 24 ч в жидкой МСС в присутствии 0.2 или 0.5 мМ  $\text{CuSO}_4$ . Клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ ФБ (рН 7.0) и осаждали. Осадок клеток высушивали при 70°C до постоянного веса. Растительные образцы также промывали ФБ (рН 7.0) и высушивали при 70°C. Процесс разложения проб осуществляли в микроволновой системе MARS Xpress (США). Для градуировки спектрометра использовались государственный стандартный образец растворов металлов.

**Определение относительного количества биомассы биопленок и анализ ее респираторной активности.** Ночные (24 ч) культуры азоспирилл, выращенные с аэрацией в жидкой МСС, отмывали 50 мМ ФБ (рН 7.0) и суспендировали до  $\text{ОП}_{590} = 0.05$ – $0.10$  ( $l = 0.5$  см) в свежей МСС. Вносили по 0.2 мл полученных суспензий в ячейки полисти-

рольных планшетов с 96-ю плоскодонными лунками и инкубировали 6–7 сут при 30°C в стационарных условиях (зрелые биопленки; Шелудько и соавт., 2018). Относительное количество биомассы в зрелых биопленках оценивали посредством окраски биопленок кристаллическим фиолетовым (O’Toole, Kolter, 1998), как подробно описано Шелудько и соавт. (2010, 2018). Уровень относительной респираторной активности клеток в биопленках определяли флуориметрическим резазурин-тестом с модификациями. Из лунок планшета с биопленками отбирали планктонную культуру и вносили по 0.2 мл раствора AlamarBlue (“Sigma”, США) в ФБ (рН 7.0) (0.01 г/л). Планшеты инкубировали 24 ч при температуре 30°C. Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (“Agilent”, США) при следующих параметрах: длина волны возбуждения 530 нм, длина волны эмиссии – 600 нм, ширина щели – 10 нм.

**Твердофазный непрямой иммуноферментный анализ (ИФА).** Относительное количество бактериальных полисахаридных антигенов определяли в 7-суточных биопленках, сформированных азоспириллами в лунках полистирольных планшетов (Шелудько и соавт., 2008), или в гомогенатах инокулированных корней проростков пшеницы (Шелудько и соавт., 2010). Полисахаридные бактериальные антигены в ИФА выявляли кроличьими антителами (Ат) на ЛПС штамма *A. baldaniorum* Sp245. Измерение окрашенного продукта ИФА исследуемых проб ( $\text{ОП}_{492}$ ) проводили на фотометре Multiskan Ascent (“ThermoLabsystems”, Финляндия).

**Определение морфометрических и морфофизиологических параметров проростков пшеницы.** Линейный размер надземной части проростков (в мм) определяли от первого узла кушения до верхушки первого листа. Для определения морфофизиологического показателя (сухой массы в мг) надземную часть и корневую систему разделяли и высушивали при 70°C до постоянного веса. Данные измерений выражали в процентах от контроля – среднего значения исследованных параметров стерильных растений, выращенных в сходных условиях. Также для каждого растения определяли процент разветвленных корней (корни с боковыми отростками) в корневой системе. Деформацию корневых волосков оценивали при микроскопии корней, определяя процент искривленных от общего числа волосков на 50–90 участках корня.

**Статистическая обработка результатов.** Морфометрические и морфофизиологические параметры проростков пшеницы определяли у 100–150 растений в каждом варианте опыта. В случае остальных количественных измерений выполняли не менее трех независимых экспериментов, как минимум, в двух повторностях. Статистическую

**Таблица 1.** Влияние  $\text{CuSO}_4$  на рост планктонных культур *A. baldaniorum* (а, в) и аккумуляцию клетками меди (б) МСС

Штамм	(а) *ОП <sub>590</sub> ( $l = 0.5$ см) планктонных культур				(б) Содержание меди в сухой биомассе, мг/г		(в) **МИК $\text{CuSO}_4$ , мМ	
	CuSO <sub>4</sub> в жидкой среде МСМ, мМ						СССР, мкМ	
	0	0.2	0.5	0.9	0.2	0.5		
Sp245	1.34 ± 0.06	1.14 ± 0.19	0.72 ± 0.11	0.04 ± 0.01	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.03	0.6 ± 0.09
КМ018	1.36 ± 0.24	1.15 ± 0.14	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.01	1.6 ± 0.2	Н.о.	0.5 ± 0.09	0.3 ± 0.04
КМ139	1.43 ± 0.27	1.20 ± 0.19	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02	2.4 ± 0.4	Н.о.	0.5 ± 0.09	0.3 ± 0.04
КМ252	1.40 ± 0.10	1.12 ± 0.10	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	1.3 ± 0.1	Н.о.	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.03

\* 24 ч жидкие культуры азоспирилл разводили до ОП<sub>590</sub> ( $l = 0.5$  см) свежей МСС с различными концентрациями  $\text{CuSO}_4$  и инкубировали 24 ч при интенсивном перемешивании.

\*\* МИК – минимальная ингибирующая концентрация, т.е. минимальная концентрация  $\text{CuSO}_4$ , предотвращающая видимый рост бактерий.

\*\*\* Количество СССР, не оказывающее существенного влияния на рост планктонных культур *A. baldaniorum*, но подавляющее активный транспорт и эффлюкс ионов меди (Shelud'ko et al., 2012). Н.о. – не определяли.

обработку данных проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента (доверительные интервалы даны для 95% уровня значимости). Для статистической обработки использовали пакет программ Microsoft Office Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние ионов меди на жизнеспособность азоспирилл.** Клетки мутанта КМ018, синтезирующие кислый LpsI ( $\text{CaI}^- \text{LpsII}^-$ ), при культивировании с 0.2 мМ  $\text{CuSO}_4$  аккумуляровали в 2.3 больше меди по сравнению с клетками родительского штамма Sp245 ( $\text{CaI}^+ \text{LpsI}^+ \text{LpsII}^+$ ) (табл. 1). В сходных условиях культивирования клетки мутанта КМ139 с кислым LpsI ( $\text{CaI}^+ \text{LpsII}^-$ ) содержали в 3.4 раза больше металла, чем Sp245 (табл. 1). После культивирования с 0.5 мМ меди ее содержание в клетках Sp245 возрастало до  $1.4 \pm 0.1$  мг/г, что в 2.0 раза больше величины, характерной для клеток этого штамма, выращенных с 0.2 мМ  $\text{CuSO}_4$  (табл. 1).

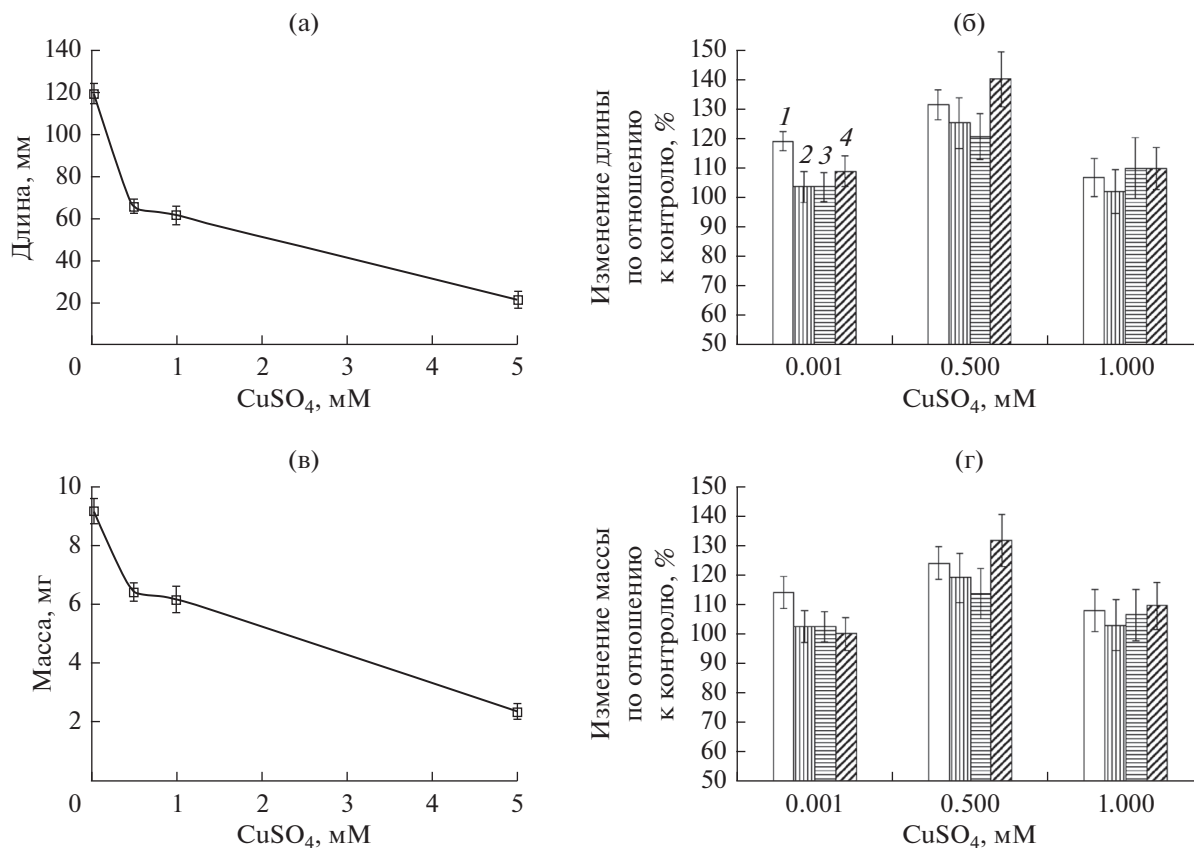
МИК меди для КМ018 и КМ139 составляла  $0.5 \pm 0.09$  мМ. У штамма Sp245 рост отсутствовал на МСС в присутствии  $0.9 \pm 0.03$  мМ меди. Для штаммов Sp245, КМ018 и КМ139 МИК меди в присутствии ингибитора энергетического обмена СССР (подавляется активный транспорт и эффлюкс) снижалась примерно на 33–40% (табл. 1). У штамма Sp245 в состав липополисахарид-белкового комплекса капсулы входят сходные моносахариды и преимущественно антигены, идентичные таковым у LpsI мембранного ЛПС (Матора, Щеголев, 2002). Вероятно, мутанты, синтезирующие только кислый LpsI, максимально сорбируют металл на клеточной поверхности и в капсуле. Известно, что бактериальные ЛПС связывают ионы меди (Lino et al., 2006). Капсула также может яв-

ляться частью системы защиты бактерий от катионов тяжелых металлов (Stoderegger, 1998).

Клетки мутанта КМ252 с нейтральным LpsII ( $\text{CaI}^- \text{LpsI}^-$ ) при культивировании с 0.2 мМ  $\text{CuSO}_4$  аккумуляровали в 1.9 раз больше меди (табл. 1) по сравнению с показателем Sp245. Для этого мутанта МИК меди меньше показателя Sp245 ( $0.4 \pm 0.03$  мМ). В присутствии СССР МИК для КМ252 оставалась неизменной (табл. 1). Таким образом, барьер для ионов меди, создаваемый нейтральными LpsII мембраны и/или капсулы, одинаково эффективен как в обычных условиях, так и в присутствии ингибитора энергетического обмена.

У штамма Sp245 разнообразен состав и макромолекулярная организация биополимеров полисахаридной природы, представленных на клеточной поверхности/в капсуле ( $\text{CaI}^+ \text{LpsI}^+ \text{LpsII}^+$ ), создающих барьер для избыточного поступления ионов металлов в цитоплазму. Это, несомненно, сказывается на количестве меди, накапливающейся в клетках, и отчасти обуславливает определенный уровень устойчивости бактериальных культур Sp245 к негативному влиянию избытка меди в окружающей среде.

**Влияние ионов меди на численность бактерий, обитающих в корневой системе проростков пшеницы.** Количество клеток *A. baldaniorum*, прикрепившихся к корням, стабилизировалось в течение 3 ч инкубации суспензии бактерий с трехсуточными проростками пшеницы, как в случае штамма Sp245 дикого типа (Shelud'ko et al., 2010), так и его дериватов, имеющих мутации в синтезе полисахаридов. Мутанты, утратившие один из Lps, адсорбировались на корнях хуже штамма Sp245 (табл. 2). Через 7 дней культивирования инокулированных растений в присутствии 0.001 мМ



**Рис. 1.** Влияние меди на длину (а, б) и массу (в, г) надземных частей 10-дневных проростков пшеницы: стерильные (а, в) и инокулированные (б, г) Sp245 (1), KM018 (2), KM139 (3), KM252 (4) проростки. Контролем (б, г) служили средние значения исследуемых показателей стерильных растений (а, б), выращенных в аналогичных условиях.

CuSO<sub>4</sub> размер популяции Sp245, KM139 и KM252 снижался в 1.6–3.3 раза (табл. 2). Медь в концентрации 0.001 мМ не оказывала влияния на рост азоспирилл, что позволяет объяснить снижение числа бактерий на корнях растущих проростков миграцией в среду для выращивания растений части адсорбировавшихся клеток (Shelud'ko et al., 2010). Популяция неподвижного мутанта KM018, обитающая в корневой системе, за 7 сут инкубации оставалась неизменной, что характерно для мутантов штамма Sp245, утративших способность к подвижности при помощи жгутиков (Shelud'ko et al., 2010).

В экспериментах *in planta* концентрация меди, ингибирующая рост азоспирилл в чистой культуре (табл. 1), не оказывала подобного влияния на бактерии (табл. 2). В корневой системе инокулированных штаммом Sp245 растений, инкубированных в присутствии 1.0 мМ CuSO<sub>4</sub>, количество бактерий лишь в два раза уступало числу клеток, обитающих на корнях в присутствии 0.001 мМ соли (табл. 2). В указанном временном промежутке медь в количестве 0.5 мМ не влияла на численность популяции Sp245 *in planta*. В случае мутан-

тов при увеличении концентрации ионов меди в среде инкубации с 0.001 до 0.5 или 1.0 мМ численность клеток снижалась на порядок (табл. 2).

Численность бактерий всех штаммов, высеваемых с корней растений после инокуляции, существенно снижалась лишь в случае проростков, инкубированных в присутствии 5 мМ CuSO<sub>4</sub>. Из корневой системы высевались единичные колонии, вероятно, являющиеся потомками покоящихся форм азоспирилл (Шелудько и соавт., 2020). Концентрация меди 5 мМ ингибировала рост не только бактериальной популяции, но и растений (рис. 1), что позволяет предположить наличие некоторой зависимости жизнеспособности азоспирилл в условиях высокого содержания ионов меди в среде инкубации от физиологического состояния растительного партнера.

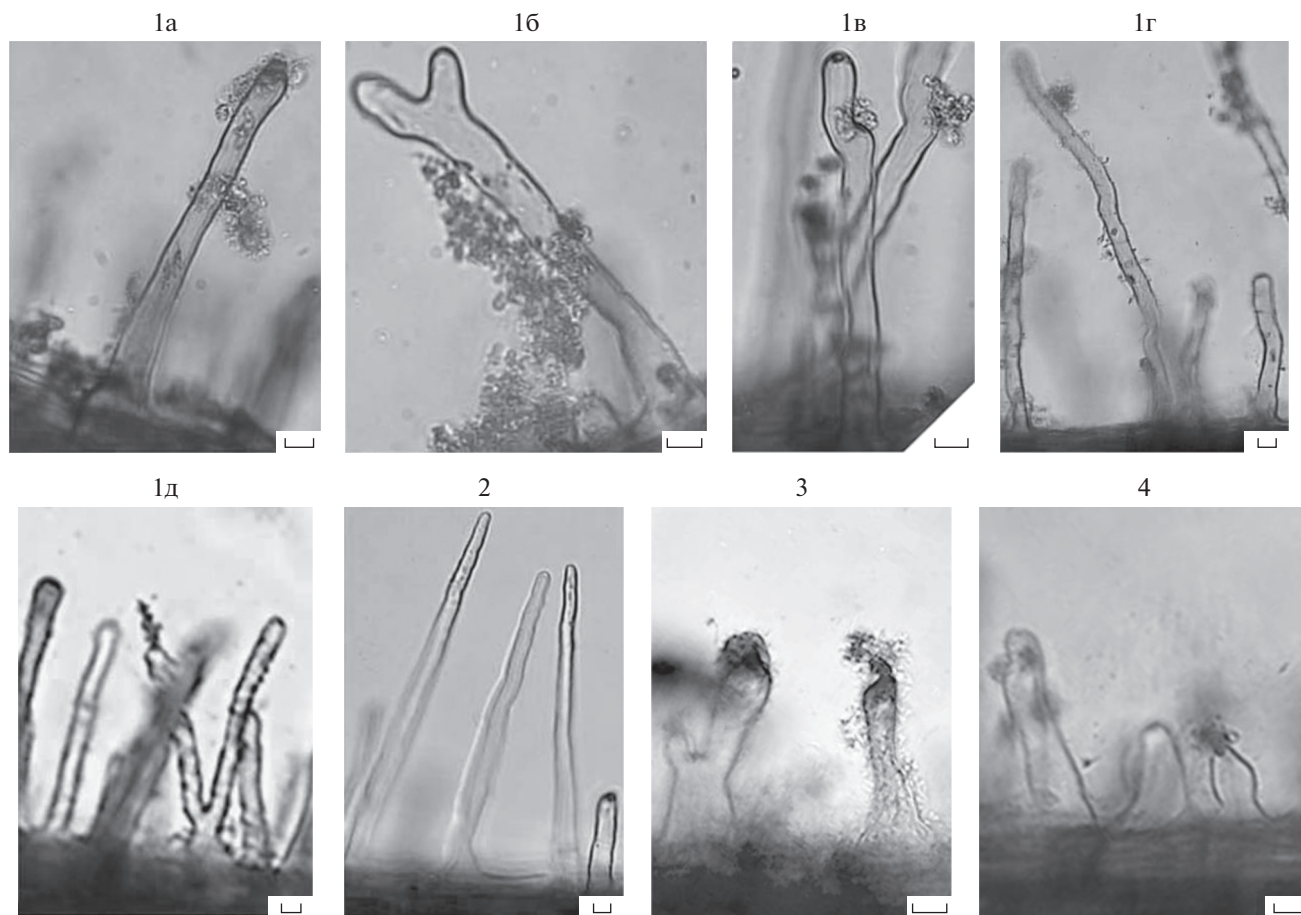
**Характеристика биопленок, формируемых азоспириллами.** На корневой поверхности биопленки, сформированные азоспириллами к 7-м сут инкубации, располагались преимущественно в зоне всасывания и верхушки корня. Бактериальные скопления наблюдались у мест соединения корневых волосков с поверхностью корня, около



**Таблица 2.** Влияние различных концентраций  $\text{CuSO}_4$  в среде культивирования на численность *A. baldanionum* в корневой системе пшеницы, содержание меди в корнях и морфометрические показатели корней

Штамм	$\text{CuSO}_4$ в среде, мМ	Численность бактерий, (КОЕ $\times 10^6$ /растение)			Корни после 7 дней культивирования			
		культивирование			сухой вес корневой системы, мг	содержание Cu в корневой системе, мг/г	морфометрические показатели	
		3 ч	7 дней	разветвленные корни, %			искривленные корни, %	
Без бактерий	0.001		0		4.0 $\pm$ 0.3	0.07 $\pm$ 0.008	38.9 $\pm$ 2.5	16.3 $\pm$ 1.6
	0.5	0	0		3.7 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.2	31.4 $\pm$ 2.8	17.6 $\pm$ 1.5
	1.0		0		3.8 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.3	33.8 $\pm$ 5.4	17.9 $\pm$ 2.0
Sp245	0.001		12.5 $\pm$ 1.7		4.2 $\pm$ 0.3	0.03 $\pm$ 0.002	60.8 $\pm$ 3.0	39.3 $\pm$ 2.3
	0.5	20.5 $\pm$ 2.3	12.9 $\pm$ 2.2		3.9 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.1	39.3 $\pm$ 3.8	31.5 $\pm$ 3.1
	1.0		6.6 $\pm$ 0.9		3.2 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.2	29.4 $\pm$ 3.8	33.5 $\pm$ 3.8
KM018	0.001		1.4 $\pm$ 0.3		3.9 $\pm$ 0.3	0.03 $\pm$ 0.001	56.5 $\pm$ 3.4	19.6 $\pm$ 2.6
	0.5	1.6 $\pm$ 0.2	0.15 $\pm$ 0.02		3.7 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.2	26.6 $\pm$ 2.7	19.4 $\pm$ 2.4
	1.0		0.28 $\pm$ 0.08		3.4 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.1	32.8 $\pm$ 5.8	Н.о.
KM139	0.001		1.4 $\pm$ 0.2		4.2 $\pm$ 0.4	0.04 $\pm$ 0.008	55.1 $\pm$ 3.3	19.2 $\pm$ 2.3
	0.5	4.6 $\pm$ 0.8	0.74 $\pm$ 0.07		3.6 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.2	29.4 $\pm$ 4.7	Н.о.
	1.0		0.1 $\pm$ 0.04		3.5 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.1	25.5 $\pm$ 3.9	19.4 $\pm$ 2.2
KM252	0.001		2.4 $\pm$ 0.3		4.0 $\pm$ 0.5	0.08 $\pm$ 0.02	55.2 $\pm$ 3.2	25.7 $\pm$ 1.8
	0.5	7.2 $\pm$ 1.1	0.26 $\pm$ 0.07		3.8 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.1	34.1 $\pm$ 5.9	24.5 $\pm$ 2.2
	1.0		0.36 $\pm$ 0.12		3.2 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.1	30.7 $\pm$ 4.5	26.6 $\pm$ 2.4

Н.о. – не определяли.

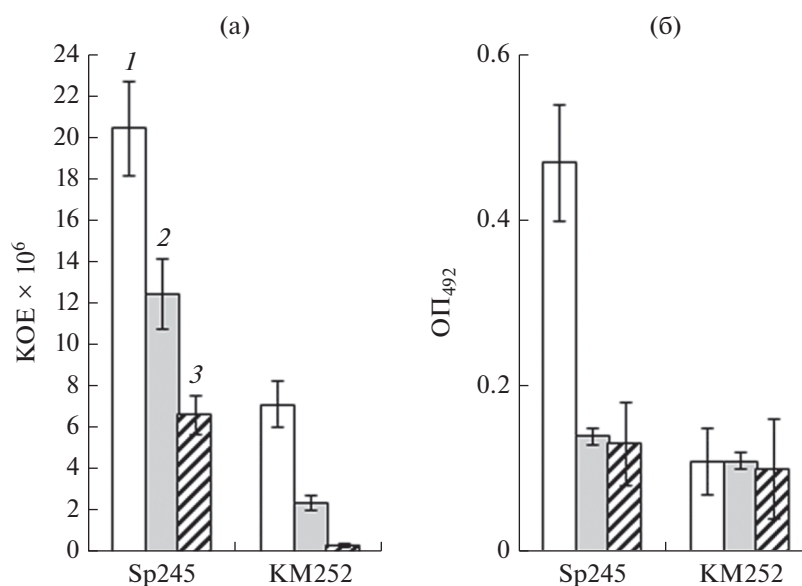


**Рис. 2.** Формирование биопленки *A. baldaniorum* в зоне всасывания корней 10-дневных проростков пшеницы и влияние бактериальной инокуляции на деформацию корневых волосков: стерильных (2), инокулированных Sp245 (1), KM018 (3) и KM252 (4). Концентрация  $\text{CuSO}_4$ : 0.001 (1а– 1в, 2, 3) и 1.0 (1г, 1д, 4) мМ. Масштаб 25 мкм.

кончика корневого волоска, а также встречались корневые волоски, заселенные бактериями вдоль всей поверхности (рис. 2). В присутствии 0.5 и 1.0 мМ меди бактерии предпочитали заселять преимущественно зону корневых волосков, формируя биопленку вдоль корневого волоска. В случае всех исследованных штаммов биопленки были представлены скопления агрегатов бактериальных клеток (рис. 2). Образование клеточных агрегатов на корнях растений характерно для азоспирилл (Burdman et al., 1998). Предполагают, что клеточными структурами, определяющими агрегацию, могут быть ЛПС, капсульные полисахариды, экзополисахариды (ЭПС) или белки внешней мембраны бактерий (Burdman et al., 1998; Шелудько и соавт., 2010). Эти структуры клеточной поверхности являются также частью матрикса биопленок азоспирилл, сформированных на абиотических поверхностях (Шелудько и соавт., 2018). Иммунофлуоресцентная микроскопия с антителами на антигены клеточной поверхности показала наличие экспонированных полисахаридных детерминант “планктонных клеток” у азоспирилл, сформиро-

вавших биопленки на корнях проростков пшеницы (Шелудько и соавт., 2010).

Иммуноферментный анализ и параллельный подсчет КОЕ позволяет отследить возможные изменения в содержании полисахаридных антигенов при адаптации азоспирилл к существованию на корнях растений (Шелудько и соавт., 2010). На примере штаммов Sp245 и KM252 был проведен подобный анализ. На этапе прикрепления бактерий к поверхности корня (3 ч инкубации) подсчет КОЕ в гомогенатах корней и ИФА этих же гомогенатов (рис. 3) свидетельствовал о том, что содержание бактериальных полисахаридов и количество заселивших корни клеток дикого и мутантного штаммов согласуются. Спустя неделю после инокуляции вариации в содержании полисахаридов в случае KM252 отсутствовали, несмотря на снижение численности клеток на корнях (рис. 3). Количество особей штамма Sp245 на корнях в течение недели также снижалось и зависело от концентрации меди в среде (рис. 3, столбцы 2 и 3). Численность клеток штамма Sp245 на корнях в присутствии 0.001 и 1.0 мМ меди разли-



**Рис. 3.** Динамика колонизации корней проростков пшеницы штаммами *A. baldaniorum*: количество КОЕ в гомогенатах корней (а) и эффективность связывания антител к полисахаридным антигенам Sp245 с гомогенатами корня, определенная с помощью ИФА (б). Трехдневные проростки после 3-часовой инкубации с бактериальной суспензией (1) и проростки через 7 дней после инокуляции (2, 3). Концентрация  $\text{CuSO}_4$ : 0.001 (2) и 1.0 (3) мМ. Горизонтальная ось – штаммы *A. baldaniorum*.

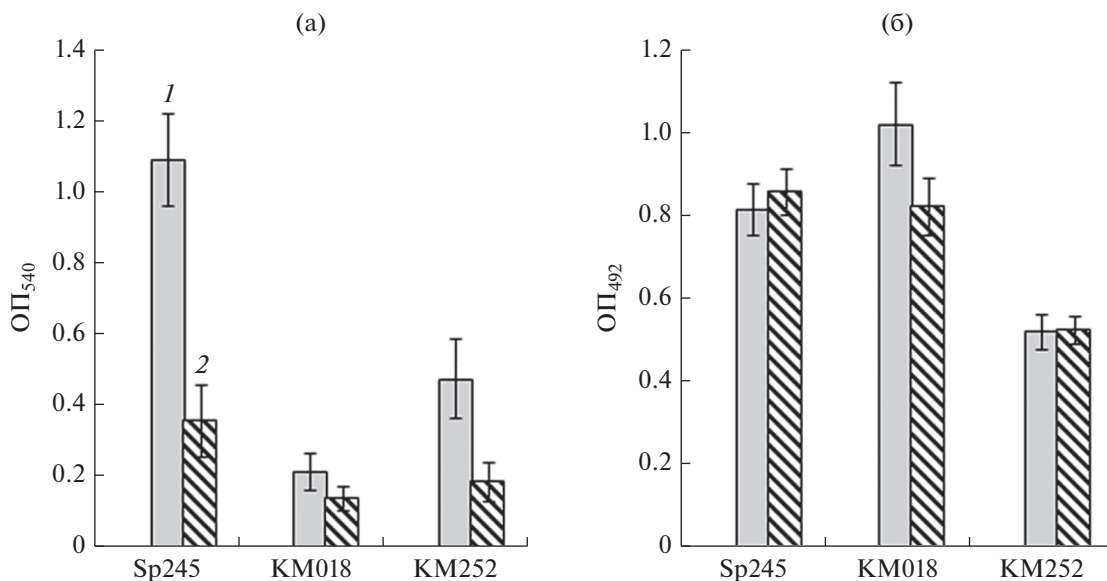
чалось на порядок, а содержание полисахаридов оставалось одинаковым (рис. 3). Эти результаты являются косвенным свидетельством того, что при адаптации к корням растений у клеток штамма Sp245 в присутствии 1.0 мМ меди заметно активизировался синтез полисахаридных детерминант. У  $\text{CaI}^- \text{LpsI}^-$  мутанта KM252 активация синтеза полисахаридов происходила независимо от присутствия меди.

Мы также наблюдали активацию синтеза ЛПС в биопленках Sp245 и мутантов, сформированных на модельной абиотической поверхности в присутствии меди. Так, отношение показателя, характеризующего содержание ЛПС антигенов в биопленках, сформированных под МСС с 0.001/0.5 мМ  $\text{CuSO}_4$  в среде (рис. 4), к показателю, характеризующему их биомассу (рис. 4), в случае штаммов Sp245, KM018 или KM252 составило, соответственно, 0.7/2.4, 4.8/6.0 или 1.1/2.8.

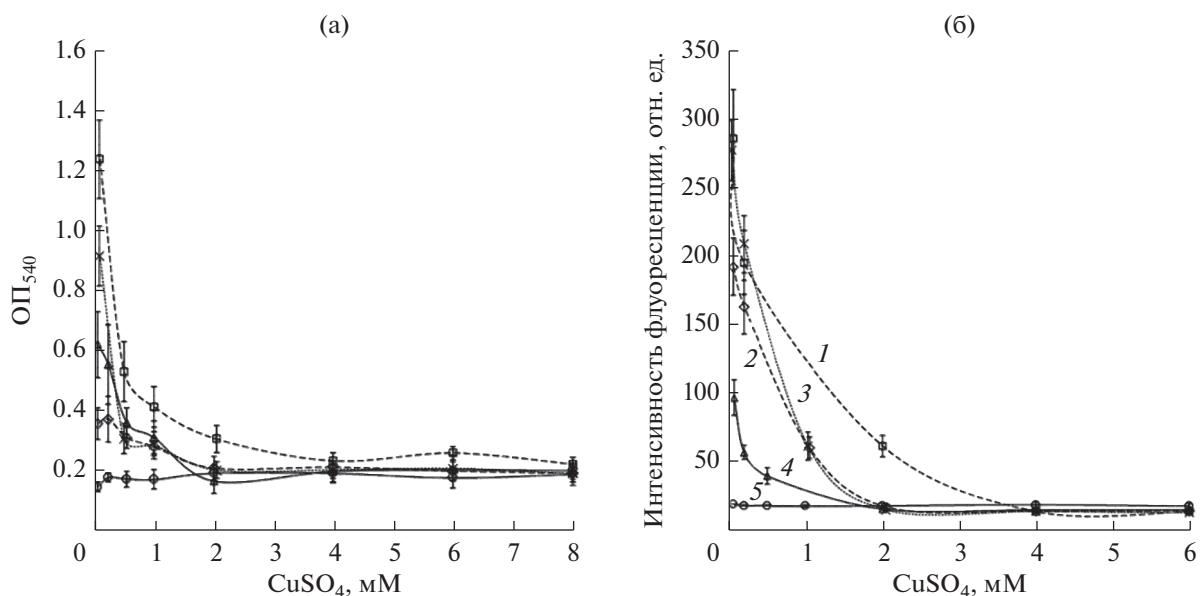
Стоит отметить, что биопленки, сформированные на модельной гидрофобной поверхности мутантными штаммами, уступали по количеству биомассы биопленкам родительского штамма Sp245 (рис. 4а, 5а). Медь в концентрациях, ингибирующая рост жидких планктонных культур (табл. 1), не препятствовала формированию бактериями биопленок на модельной гидрофобной поверхности (5а). Тем не менее, биомасса биопленок штаммов Sp245, KM139 и KM252 в присутствии от 0.5 мМ меди в среде была существенно ниже показателя каждого штамма в контроле, содержащем 0.001 мМ металла (рис. 5а). Биомасса биопленок KM018 не

зависела от этого количества меди в среде (рис. 5а). В присутствии 4.0 мМ  $\text{CuSO}_4$  штамм Sp245 не образовывал пленку. В случае мутантов KM018, KM139 и KM252 формирование биопленок ингибировалось 2.0 мМ  $\text{CuSO}_4$  (рис. 5). Респираторная активность биопленок, сформированных в присутствии  $\text{CuSO}_4$ , согласуется с количеством их биомассы (рис. 5).

**Влияние меди и инокуляции азоспириллами на морфометрические и морфофизиологические параметры проростков пшеницы.** Присутствие азоспирилл в корневой системе проростков пшеницы оказывало влияние на морфологию корневых волосков (табл. 2, рис. 2). Бактерии, продуцирующие полисахариды с разными физико-химическими свойствами, в разной степени способствовали деформации корневых волосков (табл. 2). В условиях высоких концентраций ионов меди число деформированных волосков снижалось, но не столь значительно, как это наблюдалось в случае ветвления корней в корневой системе (табл. 2). Например, увеличение концентрации меди в среде (0.001, 0.5, 1.0 мМ) существенно не влияло на процент деформированных корневых волосков в корневой системе как контрольных растений, так и проростков, инокулированных Sp245, KM018, KM139 или KM252 (табл. 2). Процент разветвленных корней у инокулированных проростков значительно увеличивался (по сравнению со стерильными растениями) только при 0.001 мМ меди (табл. 2). Медь в количестве 0.5 и 1.0 мМ подавляла данный эффект от инокуляции азоспириллами



**Рис. 4.** Относительное количество биомассы в биопленках, образованных азоспириллами на полистироле под жидкой МСС за 7 дней культивирования (а), и эффективность связывания биопленкой антител к полисахаридным антигенам Sp245, определенная с помощью ИФА (б). ОП<sub>540</sub>, кристаллический фиолетовый, экстрагированный из окрашенных биопленок. ОП<sub>492</sub>, окрашенный продукт ИФА биопленок. Концентрация CuSO<sub>4</sub>: 0.001 (1) и 0.5 (2) мМ. Горизонтальная ось – штаммы *A. baldaniorum*.



**Рис. 5.** Влияние CuSO<sub>4</sub> на относительное количество биомассы (а) в биопленках Sp245 (1), KM018 (2), KM139 (3) и KM252 (4), сформированных за 7 дней культивирования на полистироле под МСС, и респираторную активность клеток в них (б). ОП<sub>540</sub>, кристаллический фиолетовый, экстрагированный из окрашенных биопленок (а). Интенсивность флуоресценции раствора AlamarBlue после инкубации с биопленками (б). Лунки планшета со стерильной МСС (5).

(табл. 2). Способность азоспирилл активировать образование боковых корней во многом обусловлена фитогормонами, вырабатываемыми этими бактериями (Lugtenberg, Kamilova, 2009; Tak et al., 2013), а высокие концентрации меди влияют на

продукцию индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) этими бактериями (Kamnev et al., 2005).

Содержание меди в корневой системе проростков, выращенных в присутствии 0.5 или 1.0 мМ CuSO<sub>4</sub>, как минимум на порядок уступало

количеству меди в среде инкубации (табл. 2). При культивировании с 0.5 или 1.0 мМ  $\text{CuSO}_4$  проростки накапливали в корнях 0.02 или 0.03–0.05 мМ меди соответственно (табл. 2; количество меди определяли после пересчета ее содержания в биомассе корней). По-видимому, низкая концентрация меди, содержащаяся в корнях, позволяет бактериям, обитающим в корневой системе, сохранять жизнеспособность в условиях высокого содержания меди во внешней среде.

Инокуляция пшеницы бактериями Sp245 способствовала увеличению размера (на 19%) и веса (на 12%) надземных частей растений (рис. 1) в присутствии 0.001 мМ, а проростки, заселенные KM018 или KM139, не отличались по исследованным параметрам от инокулированных растений (рис. 1). Лишь в случае инокуляции культурой мутанта KM252 размер надземной части увеличился на 9%, однако ее вес оставался на уровне контроля. Однако в присутствии 0.5 мМ меди все штаммы оказывали положительное влияние на размер и вес надземных частей растений, которые увеличивались на 20–40 и 14–31% соответственно по сравнению со стерильными растениями (рис. 1). В присутствии 1.0 мМ меди морфометрические и морфофизиологические параметры инокулированных проростков не сильно отличались от таковых у стерильных растений.

Ионы меди в концентрации 5.0 мМ ингибировали рост как стерильных, так и инокулированных проростков пшеницы. В присутствии данной концентрации меди у 10-сут проростков размеры и вес вегетативных органов не отличались от морфометрических показателей 3-сут проростков, использованных для инокуляции. В корневой системе проростков после 7-сут инкубации с 5.0 мМ меди отсутствовали разветвленные корни, как и у трехсуточных.

Анализ численности клеток *A. baldaniorum*, колонизирующих корни и формирующих биопленки, показал, что эти показатели варьируют в зависимости от способности бактерий к синтезу того или иного Lps. Так, по сравнению с родительским штаммом, мутанты, имеющие отличия в антигенной структуре и заряде ЛПС, хуже колонизировали корни и образовывали на них менее выраженные биопленки. Формирование бактериями *A. baldaniorum* биопленок способствовало повышению их устойчивости к негативному влиянию ионов меди. Избыток меди в среде инкубации способствует увеличению содержания полисахаридных антигенов в биопленках, сформированных штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантами с измененным составом гликополимеров *in planta* и/или на модельной поверхности полистирола. Вполне вероятно, что увеличение количества полисахаридов является одним из механизмов адаптации бактериальных клеток к существованию в условиях загрязнения

медью. Полимерные соединения и клетки, аккумулируя ионы меди на периферии биопленки, могут снижать количество ионов, поступающих во внутренние слои пленки.

Адаптации бактерий к существованию в корневой системе растений в условиях высокого содержания меди во внешней среде также способствует слизь, выделяемая растительными клетками, компоненты которой могут связывать ионы металлов (Jing et al., 2007; Tak et al., 2013). Низкая концентрация меди, которую накапливает корневая система пшеницы, как минимум на порядок ниже, чем количество меди, присутствующее в инкубационной среде, что также позволяет бактериям находиться в физиологически активном состоянии *in planta*.

Мы показали, что штамм *A. baldaniorum* дикого типа Sp245 оказывал аналогичное положительное влияние на рост стеблей и листьев как в присутствии повышенной (до 0.5 мМ) концентрации ионов меди, так и в присутствии концентрации, которая не оказывала заметного влияния на рост каждого из партнеров (0.001 мМ). Мутанты Sp245, которые, как и родительский штамм, синтезируют ЛПС с пента-D-рамновым ОПС, но с иной антигенной структурой и зарядом, оказывали положительное влияние на проростки пшеницы только в том случае, если концентрация меди в среде была высокой (0.5 мМ).

Таким образом, не только численность обитающих на растении азоспирилл, но и характеристики их поверхностных полисахаридов могут влиять на ответ проростков пшеницы на бактериальную инокуляцию.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Коллекции ризосферных культур ИБФРМ РАН за штамм *A. brasilense* Sp245 [IBPPM 219] и Центру коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН (Саратов, Россия).

## ФИНИНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00006-а. Оценка респираторной активности клеток выполнена при частичной финансовой поддержке Саратовского государственного медицинского университета в рамках проекта № SSMU-2021-001.

## 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

- Кацы Е.И., Прилипов А.Г. Инсерционная мутация в гене AZOBR\_p60120 сопровождается дефектами в синтезе липополисахарида и связывающих калькофлуор полисахаридов у бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 // Генетика. 2015. Т. 51. С. 306–311.
- Katsy E.I., Prilipov A.G. Insertional mutation in the AZOBR\_p60120 gene is accompanied by defects in the synthesis of lipopolysaccharide and calcofluor-binding polysaccharides in the bacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 // Russ. J. Genet. 2015. V. 51. P. 306–311.
- Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Антигенная идентичность липополисахаридов, капсулы и экзополисахаридов *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 211–214.
- Matora L.Yu., Shchegolev S.Yu. Antigenic identity of the capsule lipopolysaccharides, exopolysaccharides, and O-specific polysaccharides in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2008. V. P. 178–181.
- Шелудько А.В., Кулибякина О.В., Широков А.А., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 358–363.
- Sheludko A.V., Kulibyakina O.V., Shirokov A.A., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. The effect of mutations affecting synthesis of lipopolysaccharides and calcofluor-binding polysaccharides on biofilm formation by *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 313–317.
- Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 696–704.
- Shelud'ko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 688–695.
- Шелудько А.В., Филиппьева Ю.А., Телешева Е.М., Буров А.М., Евстигнеева С.С., Бурьгин Г.Л., Петрова Л.П. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 483–494.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Telesheva E.M., Burov A.M., Evstigneeva S.S., Burygin G.L., Petrova L.P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 610–620.
- Шелудько А.В., Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Филиппьева Ю.А., Буров А.М., Петрова Л.П., Пономарева Е.Г., Кацы Е.И. Анализ ультраструктуры клеток в составе биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 59–73.
- Shelud'ko A.V., Mokeev D.I., Evstigneeva S.S., Filip'echeva Yu.A., Burov A.M., Petrova L.P., Ponomareva E.G., Katsy E.I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 50–63.
- Abd El-Samad H.M. The biphasic role of copper and counteraction with *Azospirillum brasilense* application on growth, metabolites, osmotic pressure and mineral of wheat plant // Amer. J. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1182–1195.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. V. 29. P. 924–929.
- Burdman S., Jurkevitch E., Schwartsburd B., Hampel M., Okon Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components // Microbiology (SGM). 1998. V. 144. P. 1989–1999.
- Chang W.C., Hu G.S., Chiang S.M., Su M.C. Heavy metal removal from aqueous solution by wasted biomass from a combined AS-biofilm process // Bioresour. Technol. 2006. V. 97. P. 1503–1508.
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grass: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symposium on Nitrogen Fixation / Eds. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
- Dos Santos Ferreira N., Sant'Anna F.H., Reis V.M., Ambrosini A., Volpiano C.G., Rothballer M., Schwab S., Baura V.A., Balsanelli E., de Oliveira Pedrosa F., Pereira Passaglia L.M., de Souza E.M., Hartmann A., Cassan F., Zilli J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 6203–6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
- Fedonenko Yu.P., Zatonky G.V., Konnova S.A., Zdrovenko E.L., Ignatov V.V. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 869–872.
- Fendrihan S., Constantinescu F., Siciua O., Dinu S. *Azospirillum* strains as biofertilizers and and biocontrol agents – a practical review // J. Adv. Agricult. 2017. V. 7. P. 1096–1108.
- Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2012. V. 326. P. 99–108.
- Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623–633.
- Jing Y., He Z., Yang X. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils // J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2007. V. 8. P. 192–207.
- Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Gardiner P.H.Y. Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense* // J. Trace Elem. Med. Biol. 2005. V. 19. P. 91–95.
- Lino A.R., Farinha C.R., Pereira S., Bursakov S.A. *Desulfovibrio gigas*: toxicity of copper and molybdenum // Metal Ions in Biology and Medicine / Ed. Alpoim M.C. Lisbon: John Libbey Eurotext, 2006. V. 9. P. 231–235.
- Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 541–556.
- Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51. P. 730–750.
- Nocelli N., Bogino P.C., Banchio E., Giordano W. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in



heavy metal resistance of rhizobia // *Materials*. 2016. V. 9. P. 418.

<https://doi.org/10.3390/ma9060418>

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.

Petrova L.P., Yevstigneeva S.S., Filip'echeva Yu.A., Shelud'ko A.V., Burygin G.L., Katsy E.I. Plasmid gene for putative integral membrane protein affects formation of lipopolysaccharide and motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 // *Folia Microbiol.* 2020. V. 65. P. 963–972.

Petrova L.P., Yevstigneeva S.S., Borisov I.V., Shelud'ko A.V., Burygin G.L., Katsy E.I. Plasmid gene AZOBR\_p60126 impacts biosynthesis of lipopolysaccharide II and swarming

motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 // *J. Basic Microbiol.* 2020a. V. 60. P. 613–623.

Shelud'ko A.V., Varshalomidze O.E., Petrova L.P., Katsy E.I. Effect of genomic rearrangement on heavy metal tolerance in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 // *Folia Microbiol.* 2012. V. 57. P. 5–10.

Stoderegger K., Herndl G.J. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton // *Limnol. Oceanogr.* 1998. V. 43. P. 877–884.

Tak H.I., Ahmad F., Babalola O.O. Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2013. V. 223. P. 33–52.

## Variations in Lipopolysaccharide Synthesis Affect Formation of *Azospirillum baldaniorum* Biofilms *in planta* at Elevated Copper Content

L. P. Petrova<sup>1</sup>\*, Yu. A. Filip'echeva<sup>1</sup>, E. M. Telesheva<sup>1</sup>, T. E. Pylaev<sup>1,2,3</sup>, and A. V. Shelud'ko<sup>1</sup>,\*\*

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

<sup>2</sup>*Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, 410012 Russia*

<sup>3</sup>*Southeastern Federal Agrarian Scientific Center, Saratov, 410010 Russia*

\*e-mail: petrova\_lp@mail.ru

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

Received February 3, 2021; revised March 17, 2021; accepted March 17, 2021

**Abstract**—At elevated copper content, the viability of *Azospirillum baldaniorum* on wheat sprout roots and the number of cells colonizing the roots and forming biofilms depended on the physicochemical properties of the lipopolysaccharides (Lps) synthesized by these bacteria. Compared to the strain Cal<sup>+</sup> LpsI LpsII *A. baldaniorum* Sp245, its mutants Cal<sup>-</sup> LpsI<sup>-</sup> KM252, Lps II<sup>-</sup> KM139, and Cal<sup>-</sup> LpsII<sup>-</sup> Mot<sup>-</sup> KM018 colonized the roots less efficiently and formed thinner biofilms. Changes in the polysaccharide synthesis in KM252, KM139, and KM018 mediated increased copper accumulation by the cells and decreased resistance of bacterial cultures to the negative effect of copper ions. Copper excess *in planta* and/or on the model polystyrene surface resulted in higher levels of the polysaccharide antigens in the biofilms of strain Sp245 and of its mutants with altered glycopolymer composition. Inoculation with the strain Sp245 had a positive effect on growth of wheat stems and leaves both at copper concentrations which had no noticeable effect on growth of any of the partners (0.001 mM) and at elevated concentrations of this metal ions (up to 0.5 mM). Strains KM018, KM139, and KM252 had a positive effect on the sprouts only at high copper concentrations in the medium.

**Keywords:** *Azospirillum baldaniorum*, lipopolysaccharides, plant colonization, biofilms, heavy metals, copper resistance



ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРОДУКТА ГЕНА *nifA*  
В ПРЕДЕЛАХ ГРУППЫ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ© 2021 г. А. А. Владимиров<sup>а</sup>\*, Р. С. Гуменко<sup>а</sup>, Е. С. Акимова<sup>а</sup>, Ал. Х. Баймиев<sup>а</sup>, Ан. Х. Баймиев<sup>а</sup><sup>а</sup>Институт биохимии и генетики Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

\*e-mail: vladimirovaw@bk.ru

Поступила в редакцию 22.01.2021 г.

После доработки 04.03.2021 г.

Принята к публикации 10.03.2021 г.

Проведен анализ функциональной активности разных филогенетических вариантов белка-регулятора транскрипции генов нитрогеназного комплекса NifA в клетках клубеньковых бактерий (ризобий) разных таксонов. Для этого были созданы рекомбинантные штаммы ризобий родов *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) и *Rhizobium* с генно-инженерными конструкциями на основе плазмиды *pJN105*, содержащие разные филогенетические варианты гена *nifA*, характерные для бактерий родов *Mesorhizobium*, *Ensifer* и *Rhizobium* под управлением бактериального промотора *ParaBAD*. Показано, что у свободноживущих рекомбинантных клеток всех трех родов бактерий привнесение в их геном дополнительной экспрессирующей копии гена *nifA* приводит к появлению детектируемой нитрогеназной активности. При этом уровень нитрогеназной активности не имеет прямой связи с филогенией привнесенного гена *nifA*, что, скорее всего, объясняется универсальностью продукта исследуемого гена внутри проанализированной группы бактерий. Полученные данные указывают на возможность комбинаторных процессов в эволюции генов азотфиксации.

**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, азотфиксация, нитрогеназа, *nif*-гены**DOI:** 10.31857/S0026365621040194

Симбиотическая азотфиксация опосредуется тремя основными группами генов: *nod*-гены (участвуют в формировании клубенька), *nif*-гены (от англ. nitrogen fixation, кодируют ферментный комплекс – нитрогеназу) и *fix*-гены (участвуют в работе нитрогеназного комплекса) (Laganjo et al., 2014). У всех азотфиксирующих микроорганизмов *nif*-гены организованы в один (характерно чаще для свободноживущих азотфиксаторов) или несколько кластеров (свойственно клубеньковым бактериям) (Dai et al., 2014). При этом данные гены у ризобий могут локализоваться как на симбиотической плазмиде (*Rhizobium*, *Ensifer*), так и на хромосомных островках (*Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*), но во всех случаях отмечается активное участие этих генов в процессе горизонтального переноса. Биологическая фиксация азота на транскрипционном уровне находится под управлением одноименного продукта гена *nifA*, который участвует в запуске синтеза белковых компонентов ферментного комплекса – нитрогеназы. Белок NifA является транскрипционным активатором и относится к группе бактериальных энхансер-связывающих белков (bEBPs). Он связывается совместно с сигма-фактором РНК-полимеразы RpoN ( $\sigma^{54}$ ) с активизирующей последовательностью (UAS; 5'-TGT-N10-ACA-3'), тем самым запуская экспрессию *nif*-

генов (Dixon, Kahn, 2004; Wongdee et al., 2018). В структуре белка NifA выделяют три домена. N-концевой домен является сигнальным мотивом, центральный – взаимодействует с  $\sigma^{54}$  и обладает АТФ-азной активностью, необходимой для активации транскрипции, С-концевой домен участвует непосредственно в связывании с ДНК за счет мотива спираль–поворот–спираль (НТН), распознающий специфические сайты посадки белка (Xu et al., 2004; Bush, Dixon, 2012).

Многочисленные молекулярно-генетические исследования природы азотфиксации у различных диазотрофов привели к возможности искусственного создания азотфиксирующих микроорганизмов. Такие попытки были предприняты посредством переноса кластеров *nif*-генов от различных азотфиксаторов к бактериям, не обладающим данной способностью (Dixon, Postgate, 1972; Setten et al., 2013; Wang et al., 2013; Yang et al., 2014; Han et al., 2015; Li et al., 2016). Однако вопрос о том, как интегрировать гены азотфиксации в клетку-реципиент так, чтобы экспрессия *nif*-генов не ингибировалась различными факторами, а процесс фиксации азота был эффективным по сравнению с диазотрофами, остается открытым. Некоторые исследователи имели иной подход к созданию эффективных азотфиксирующих штаммов бакте-

рий, основанный на изменении регуляции экспрессии гена *nifA*. Впервые конститутивная экспрессия *nifA* в присутствии кислорода и азота была продемонстрирована Buchanan-Wollaston и соавт. в начале 80-х годов (Buchanan-Wollaston et al., 1981). Позднее Kennedy и соавт. отметили активацию экспрессии *nif*-генов у *Azotobacter vinelandii* и *Azotobacter chroococcum* при привнесении экспрессирующегося гена *nifA* *Klebsiella pneumoniae* (Kennedy, Robson, 1983). Прикладной аспект использования азотфиксатора с измененной регуляцией генов нитрогеназного комплекса описан в работе An и соавт., где было показано, что свободноживущий ассоциативный азотфиксирующий микроорганизм *Enterobacter gergoviae* с конститутивной экспрессией транскрипционного активатора *nifA* гена стимулировал (улучшал) рост кукурузы (An et al., 2007). Таким образом, искусственное изменение экспрессии *nif*-генов оказывает влияние на азотфиксирующий статус микроорганизмов.

Ризобии в свободноживущем состоянии не способны к преобразованию атмосферного азота, поскольку индукция генов азотфиксации (в том числе и *nifA* гена) происходит в условиях низкого содержания кислорода: в тканях центральной части клубенька (Fischer, 1998). Однако ранее нами была описана возможность активации экспрессии *nif*-генов *ex planta* посредством введения в бактериальную клетку дополнительной копии *nifA* под искусственной регуляцией. Таким образом, в ризобийные клетки была введена собственная активная копия *nifA* гена (Баймиев и соавт., 2019).

Ген *nifA* проявляет невысокую сцепленность с генами, кодирующими белки коровой части нитрогеназного комплекса, и может вовлекаться в горизонтальный перенос отдельно от остальных *nif*-генов. Это может привести к различным сочетаниям регуляторной и коровой части генов нитрогеназы. На сегодняшний день известно достаточно большое количество случаев, когда бактерии одного штамма в составе своего генома содержат разные филогенетические варианты одноименных *nif*-генов, что, скорее всего, является результатом комбинаторной эволюции вследствие рекомбинационных процессов между разными таксонами ризобий (Norel, Elmerich 1987; Sullivan et al., 2013; Wongdee et al., 2018). Исходя из этого, исследование функциональной специфичности белка NifA среди клубеньковых бактерий позволит приблизиться к пониманию эволюции генетики азотфиксации и даст возможность целенаправленного создания эффективных сельскохозяйственных штаммов ризобий.

Целью данной работы являлось выявление функциональной специфичности разных филогенетических вариантов регуляторного белка NifA в гетерологичных системах внутри группы клубеньковых бактерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами исследования** были штаммы бактерий из коллекции “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН, выделенные из клубеньков дикорастущих бобовых растений Южного Урала: *Vicia sylvatica* L. (горошек лесной), *Lathyrus pisiformis* L. (чина гороховидная) *Lotus zhegulensis* Klokov (лядвенец жигулевский) и *Medicago lupulina* L. (люцерна хмелевидная). Для генно-инженерных манипуляций использовали штамм XL-1 Blue *E. coli*.

**Культивирование бактериальных клеток.** Выращивание клубеньковых бактерий дикого типа осуществляли на питательной среде YM (1% маннитол, 0.01% NaCl, 0.05%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4$ , 0.1% дрожжевой экстракт) при 28°C. Отбор трансформированных штаммов проводили на среде YM с селективным антибиотиком – гентамицином (15 мкг/мл). Для анализа азотфиксирующей активности модифицированные штаммы ризобий выращивали на жидкой безазотной среде C40 (0.02%  $KH_2PO_4$ , 0.08%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeCl_3$  (следы),  $Na_2MoO_4$  (следы), 0.04% дрожжевой экстракт, 2% сахара) с добавлением антибиотика. Индукцию экспрессии гена *nifA*, находящегося под управлением промотора *ParaBAD*, активировали арабинозой в диапазоне концентраций от 0.1 до 2 мМ. Клетки *E. coli* культивировали на LB среде (1% бактотриптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl) при 37°C.

**Работа с ДНК.** Выделение тотальной ДНК из клубеньковых бактерий проводили лизированием клеток в 1% Triton X100 и 1% суспензии Chel-ex100 (Баймиев и соавт., 2011).

**Создание генно-инженерной конструкции.** В качестве целевого гена использовалась последовательность гена *nifA*, принадлежащая к трем основным родам: *Rhizobium* (*Rhizobium leguminosarum*), *Ensifer* (*Sinorhizobium meliloti*) и *Mesorhizobium* (*Mesorhizobium loti*). Данные последовательности были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием следующих праймеров: *nifAvicF* 5'-cagtgtactgag-gagttttgtaggcatgatta-3'; *nifAvicR* 5'-tgccgatcgcggt-cactccttctcaca-3'; *nifAsinoF* 5'-catgcgcaaacaggacaa-3'; *nifAsinoR* 5'-gctcgcgacgcctttatc-3'; *nifAmesoF* 5'-catg-cacgatactcgaac-3'; *nifAmesoR* 5'-cgcgagccggttcagag-3'. Данные варианты гена *nifA* клонировали в вектор *pJN105* по сайту рестрикции SmaI. Вектор с целевым геном проклонировали в штамме XL-1 Blue *E. coli*. Затем методом щелочного лизиса по стандартной методике выделили плазмиду в достаточном количестве для трансформации компетентных клеток ризобий (Sambrook, Russell, 2001). Трансформацию штаммов клубеньковых бактерий проводили методом электропорации по протоколу для агробактерий в кювете 0.1 см в приборе MicroPulser (“BioRad”, США).

**Анализ азотфиксирующей активности** клубеньковых бактерий, как дикого типа, так и модифи-

цированных штаммов проводили методом редукции ацетилена, предложенным Умаровым (Умаров, 1989). Для этого штаммы ризобий выращивали на безазотной среде С40 в течение 1–2 сут (для бактерий рода *Rhizobium* и *Ensifer*) и 3–5 сут (род *Mezorhizobium*) до концентрации клеток  $1-2 \times 10^8$  КОЕ/мл на термостатируемом орбитальном шейкере ES20 при 180 об./мин и температуре 28°C. Рекомбинантные штаммы выращивались при тех же условиях, но с добавлением селективного антибиотика. Суспензию бактериальных клеток объемом 1 мл переносили в стерильные стеклянные флаконы на 15 мл, содержащие 5 г стерильного песка. Затем флаконы закрывали ватными пробками и помещали в термостат на 28°C на сутки. После инкубации заменяли ватные пробки на стерильные резиновые и во флаконы вводили ацетилен в объеме 1 мл. Через 1 ч проводили анализ содержания ацетилена и этилена по времени выхода каждого газа в исследуемых образцах на газовом хроматографе с пламенным ионизационным детектором Shimadzu GC-2014 (“Shimadzu”, Япония).

**Оценку экспрессии *nifA*-гена** у рекомбинантных штаммов проводили методом ОТ-ПЦР. РНК выделяли с применением набора FastRNA Pro Blue Kit (США). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой свободной от РНКаз (“Thermo Scientific”, США). Используя фермент MMLV-ревертазу (обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей) (“Евроген”, Россия) получали первую цепь ДНК, комплементарную мРНК. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 1–5 мкг РНК, 20 мкМ случайного гексамерного праймера (“Fermentas”, США), однократный буфер для ревертазы (50 мМ *трис*-HCl pH 8.3, 10 мМ MnCl<sub>2</sub>, 10 мМ DTT, 0.5 мМ спермидина), по 500 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов и 5 единиц MMLV-ревертазы. Инкубировали в течение 2 ч при 42°C, затем реакцию смесь инактивировали нагреванием до 70°C 10 мин. Полученные образцы использовали для постановки ОТ-ПЦР.

**Выделение тотального белка** из культуры бактериальных клеток проводили по описанной ранее методике (Towbin et al., 1979). Вестерн-блот-анализ осуществляли по методике, описанной в работе Mongiardini (Mongiardin et al., 2008). В качестве мембраны для переноса белков методами Вестерн-блот и дот-блот использовали PVDF-мембрану (“Bio-Rad”, США). Дот-блоттинг (метод вакуумной фильтрации) осуществляли по следующей схеме: PVDF-мембрану помещали в прибор Bio-Dot Microfiltration System (“Bio-Rad”, США), затем наносили по 500 мкл суспензии в лунки предварительно разрушенных бактериальных клеток после ультразвуковой дезинтеграции в ресуспендирующем буфере (50 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 1 мМ PMSF).

**Обнаружение корового белка нитрогеназы** – NifH проводили с использованием коммерческих поликлональных куриных антител (первичные антитела) (AS01021A, “Agrisera”, Швеция). После блокировки мембраны в 0.5% сухом обезжиренном молоке иммобилизованные белки обрабатывали первичными антителами, которые предварительно разводили в 2000 раз в TBS-буфере с добавлением 0.5% сухого обезжиренного молока (10 мМ трис-основание, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20, 0.5% сухое молоко). По окончании инкубации в течение 10–16 ч при 4°C мембраны трижды промывали в TBS-буфере от остатков первичных антител. Для обнаружения связавшихся первичных антител использовали моноклональные кроличьи антитела в разведении 1 : 2000, конъюгированные с пероксидазой хрена HPR (“Agrisera”, Швеция). Инкубацию проводили в течение 1.5–2 ч при комнатной температуре. После трех отмывок в TBS-буфере связывание вторичных антител детектировали с помощью субстрата DAB (“Cell Marque Corporation”, США).

**Филогенетический анализ** последовательностей генов *nifA* проводили в программе Megalign (Lasergene, DNASTAR) на основе множественного выравнивания ClustalW. Нуклеотидные последовательности гена *nifA* штаммов клубеньковых бактерий были взяты из GenBank.

**Статистическую обработку** полученных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. При оценке полученных результатов использовался критерий Краскела–Уоллиса. Представленные данные имеют соответствующие доверительные интервалы при уровне доверительной вероятности равной 0.95.

**Обработку результатов дот-блот-анализа** проводили с использованием компьютерной программы TatalLab v2.01.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления степени функциональной специфичности гена *nifA* внутри группы клубеньковых бактерий были созданы генно-инженерные плазмидные конструкции с его различными филогенетическими вариантами под управлением бактериального промотора. В качестве основы была выбрана плазида широкого круга хозяев *pJN105*, содержащая репликон *pBBR1* (Newman, Fuqua, 1999). При сравнительном анализе последовательностей гена *nifA* клубеньковых бактерий, несмотря на высокую гетерогенность, тем не менее, наблюдалось определенное филогенетическое разделение по группам в зависимости от принадлежности к основным родам ризобий (рис. 1). В этой связи в качестве целевых генов при получении генно-инженерных конструкций были ис-

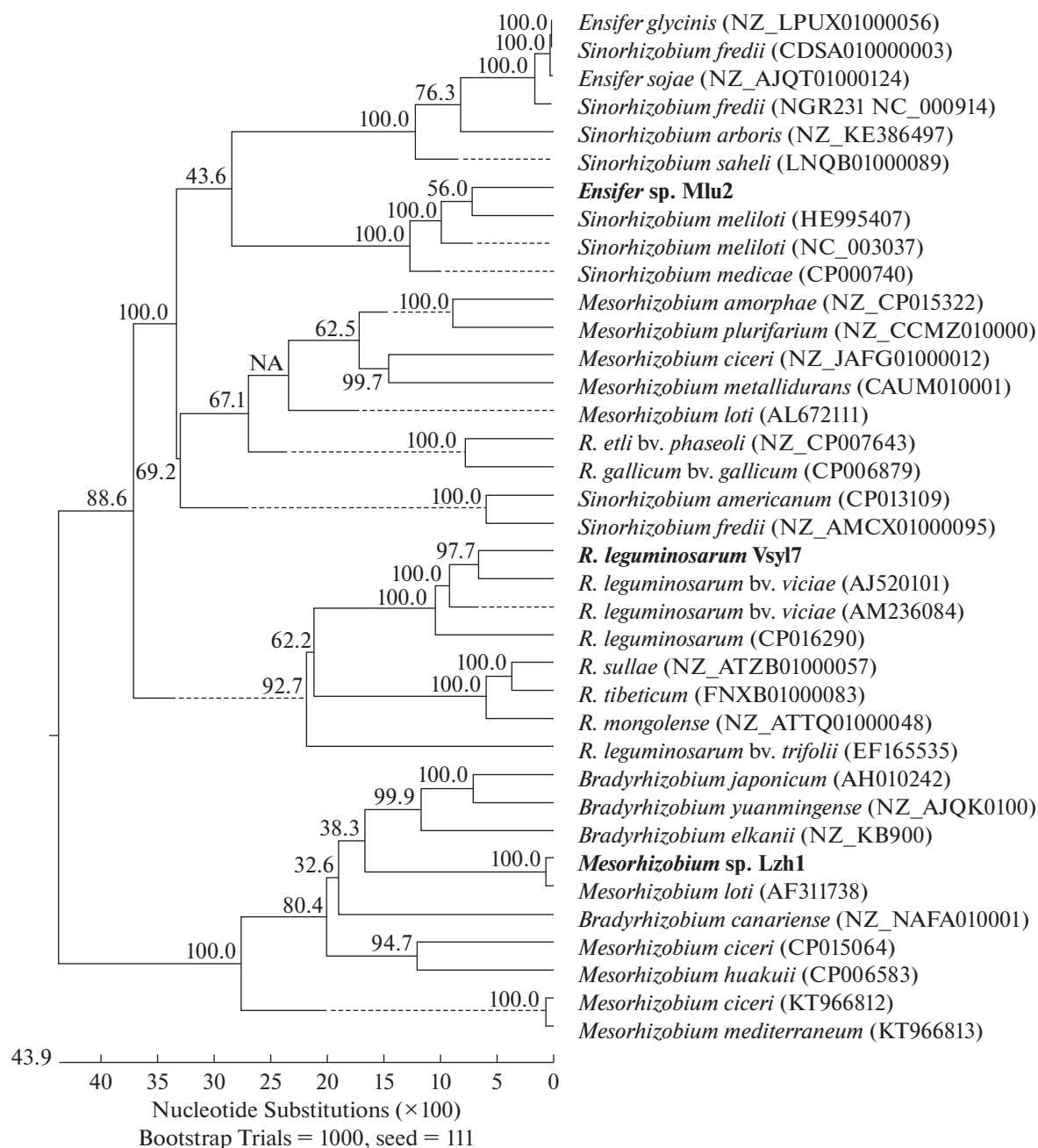


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nifA* клубеньковых бактерий.

пользованы три гена *nifA*, принадлежащие преимущественно к бактериям родов *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, которые в плазмиде *pJN105* были встроены под управление промотора *ParaBAD*, индуцируемого сахаром арабинозой. Известно, что бактерии рода *Mesorhizobium* содержат две копии гена регуляторного белка NifA: *nifA1* и *nifA2* (Sullivan et al., 2013). Нами для работы была клонирована последовательность гена, которая соответствует варианту гена *nifA2*.

Для того чтобы удостовериться, что полученные векторы функциональны в штаммах ризобий, нами параллельно была создана подобная же конструкция, где вместо целевого гена был вставлен репортерный ген зеленого флуоресцентного белка. При трансформации данной плазмидой ризобий образовывались зелено-окрашенные клоны микроорганизмов, что показывает функциональность полученных конструкций в клубеньковых бактериях.



**Рис. 2.** Вестерн-блот анализ белков NifH, выделенных из штаммов клубеньковых бактерий дикого типа и их рекомбинантных вариантов. 1 – белок NifH, полученный из клубеньков гороха посевного; 2–4 – белок NifH, выделенный у штаммов дикого типа VSyl7, MLu2 и LZh1 соответственно; 5–7 – белок NifH, полученный из рекомбинантных штаммов VSyl7ParaBADVic, MLu2ParaBADsino и LZh1ParaBADMeso соответственно. Концентрация индуктора арабинозы 1 мМ.

Наиболее распространенными родами ризобий, вступающими в симбиоз с бобовыми растениями умеренного климата, являются бактерии рода *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Ensifer*. Выбор штаммов реципиентов для получения рекомбинантных по созданным конструкциям микроорганизмов осуществлялся из числа представителей перечисленных родов ризобий по следующим критериям: во-первых, штаммы должны были быть эффективными, т.е. иметь хорошую клубенок-образующую и азотфиксирующую активности, что свидетельствовало бы о присутствии полного набора необходимых для азотфиксирующего симбиоза генов; во-вторых, неустойчивыми к действию антибиотика гентамицина для возможности селекции рекомбинантных бактерий после их трансформации. Штаммы, удовлетворяющие нас по условиям эффективности, были взяты из коллекции симбиотических микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН “Симбионт”. Далее, более 130 штаммов клубеньковых бактерий были проверены на устойчивость к действию антибиотика гентамицина (Gm), используемого в качестве маркера при скрининге рекомбинантных клонов. Таким образом, для данного исследования были отобраны штаммы VSyl1, VSyl3, VSyl7, VSyl8, LPis4 (род *Rhizobium*); MLu2 (род *Ensifer*); LZh1 и LZh3 (род *Mesorhizobium*), не проявляющие резистентность к гентамицину и имеющие азотфиксирующую активность в симбиозе с растением-хозяином.

В дальнейшем на основе выбранных штаммов были получены их рекомбинантные варианты со всеми созданными векторными конструкциями, несущими гены *nifA*, принадлежащие родам *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*.

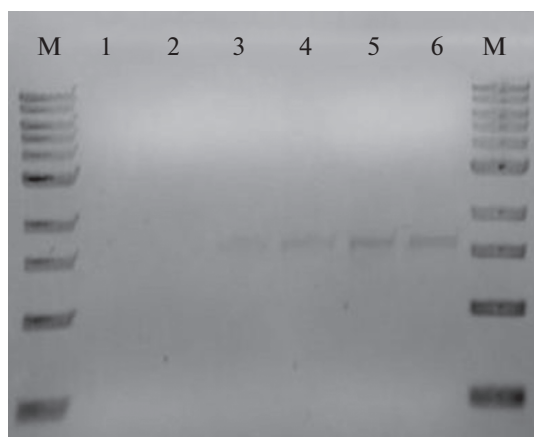
Поскольку белок NifA является основным активатором генов нитрогеназного комплекса, функциональную активность привнесенных копий его гена проверяли определением индукции наработки корового белка нитрогеназы NifH методом вестерн-блот анализа с использованием поликлональных

куриных антител, полученных к данному белку (рис. 2).

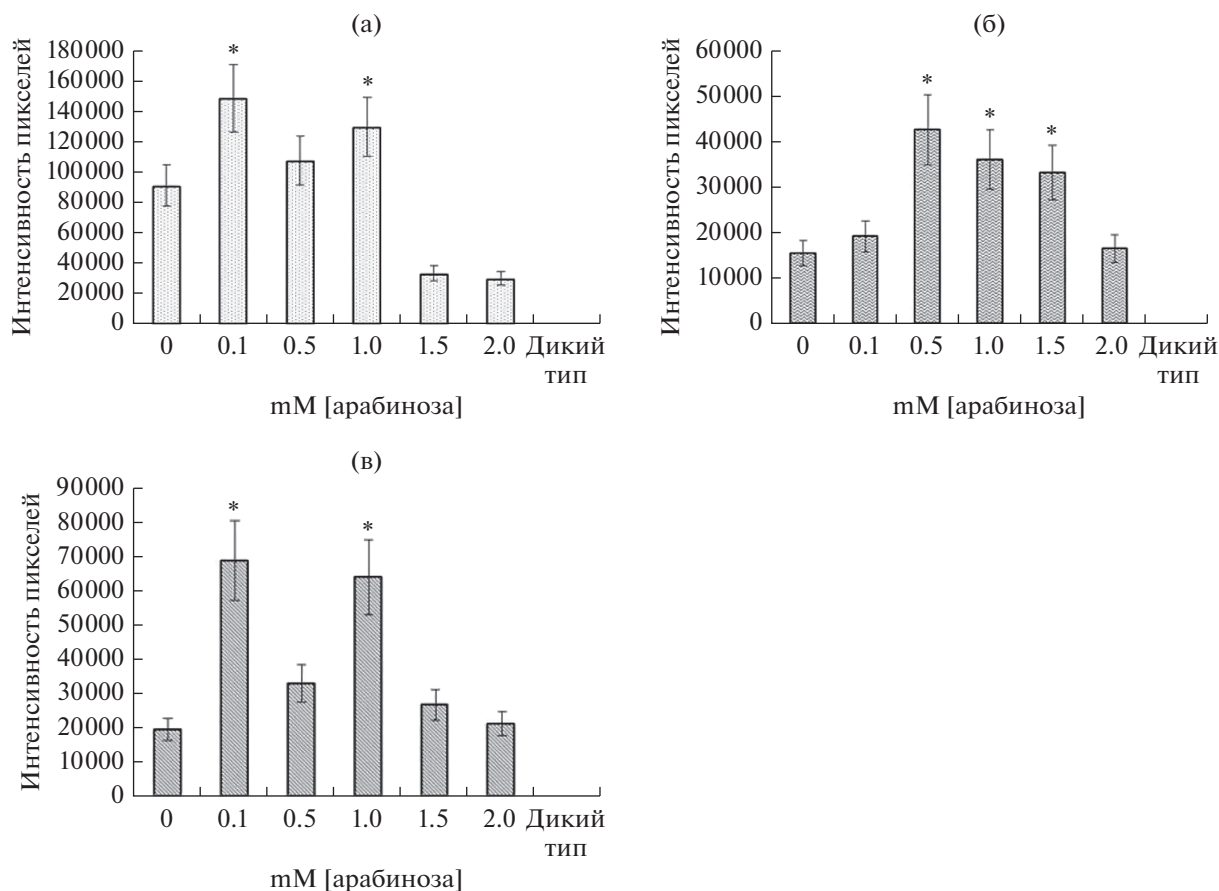
Было обнаружено, что при индукции привнесенного гена *nifA* арабинозой в концентрации 1 мМ белок NifH нарабатывается во всех рекомбинантных штаммах, тогда как у диких вариантов в свободноживущем состоянии он отсутствует.

Анализ влияния различных концентраций индуктора бактериального промотора *ParaBAD*, под регуляцией которого находятся привнесенные копии генов *nifA*, на уровень наработки белка NifH показал неоднозначные результаты. Так, при исследовании концентраций индуктора арабинозы в диапазоне от 0.1 до 2 мМ было показано, что наибольший уровень наработки целевого белка у разных рекомбинантных штаммов происходит при различных его концентрациях, хотя транскрипционная активность самого гена увеличивалась с повышением концентрации индуктора (рис. 3).

Так, например, у рекомбинантного штамма *R. leguminosarum* VSyl7 с конструкцией pJN105RhizonifA и *Mesorhizobium* sp. с конструкцией pJN105MesonifA было обнаружено повышение индукции гена *nifH* уже при концентрации 0.1 мМ, которая при 0.5 мМ падала и опять повышалась при 1 мМ. Выявить какую-то закономерность влияния определенных концентраций индуктора гена *nifA* на активацию генов нитрогеназного комплекса не получилось, поскольку индуктор на конечный белок влияет опосредованно через продукт гена *nifA*, который, в свою очередь может подвергаться различным воздействиям, например, действию ингибиторов. Поэтому каждый вариант штаммов имеет свою особенность при ответе на воздействие на них индуктором. Но, тем не менее, было показано, что у всех штаммов при воздействии арабинозой в концентрации 1 мМ происходит наработка белка NifH на близких к максимальному уровню (рис. 4). Поэтому при выполнении следующего этапа работы была использована именно эта концентрация



**Рис. 3.** Анализ транскрипционной активности гена *nifA* методом ОТ-ПЦР у рекомбинантного штамма бактерий *Rhizobium* sp. VSyl7 с дополнительной копией данного гена рода *Rhizobium* при воздействии различных концентраций индуктора арабинозы: 1 – без индуктора; 2 – 0.1 мМ; 3 – 0.5 мМ; 4 – 1 мМ; 5 – 1.5 мМ; 6 – 2 мМ.



**Рис. 4.** Гистограммы анализа наработки белка NifH рекомбинантными бактериями и штаммами дикого типа дот-блот-методом, выращенными на питательной среде в присутствии/отсутствии индуктора – арабинозы в диапазоне концентраций 0.1–2 мМ. (а) – Рекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSyl7 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Rhizobium*, штамм дикого типа – VSyl7. (б) – Рекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. MLu2 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Ensifer*, штамм дикого типа – MLu2. (в) – Рекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh1 с дополнительной активной копией *nifA* гена рода *Mesorhizobium*, штамм дикого типа – LZh1. Средняя интенсивность пикселей по точкам представлена в графическом режиме. Знаком “\*” помечены столбцы, где данные представляют статистическую значимость при  $p < 0.05$ .

индуктора. Наибольший ответ происходил при концентрациях близких к 1 мМ. Хотя есть и исключения.

Далее, все полученные рекомбинантные штаммы были проанализированы на наличие азотфиксирующей активности методом редукции ацетилена. В результате этого было выявлено, что привнесение активной дополнительной копии *nifA* гена у ризобий приводит к появлению процесса фиксации молекулярного азота *ex planta*. Так же как и на предыдущем этапе, азотфиксирующая активность рекомбинантных штаммов в свободноживущем состоянии наблюдалась как при привнесении конструкций с геном *nifA*, характерным бактериям своего рода, так и аналогичными генами, клонированными из микроорганизмов других родов ризобий (рис. 5). Это говорит о том, что продукты генов *nifA* имеют универсальность среди исследованных родов клубеньковых бактерий. Тем не ме-



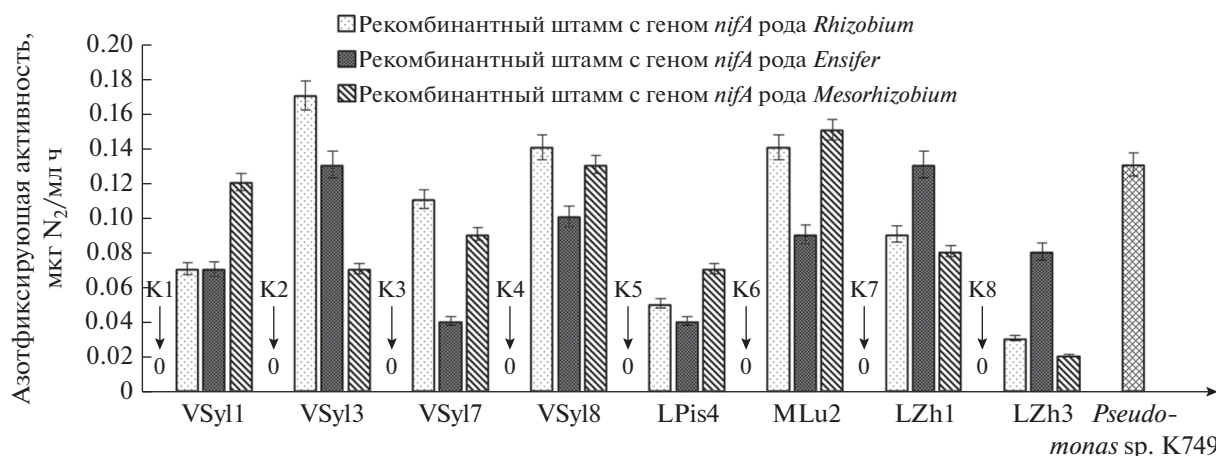


Рис. 5. Анализ азотфиксирующей активности рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий. В качестве образца для сравнения взяты дикие варианты штаммов клубеньковых бактерий K1–K8.

нее, нами были обнаружены и некоторые различия в активности при разных сочетаниях *nifA* и штаммов ризобий. При этом большее значение имел именно штамм, а не родовая принадлежность микроорганизмов. Так, наибольшая азотфиксирующая активность нами была обнаружена у штамма *R. leguminosarum* VSyl3 при привнесении гена *nifA*, характерного для бактерий рода *Rhizobium*. В то же время другой штамм *R. leguminosarum* – VSyl1, трансформированный той же конструкцией, показал значительно меньшие значения. При этом у него наибольшую азотфиксирующую активность вызывала трансформация конструкцией, содержащей ген *nifA* бактерий рода *Mesorhizobium*. Интересные данные были получены по штамму *Ensifer* sp. Штамм MLu2 показал наименьшую азотфиксирующую активность при привнесении в его клетки дополнительной активной копии гена *nifA* характерной для своего рода, тогда как рекомбинантные штаммы, трансформированные конструкциями, содержащими ген *nifA* бактерий рода *Rhizobium* и *Mesorhizobium*, отличались более высокой нитрогеназной активностью. Рекомбинантные штаммы рода *Mesorhizobium* также характеризовались тем, что привнесение в их клетки гена *nifA* бактерии своего же рода приводила к меньшей степени активации азотфиксации по сравнению с привнесением гена *nifA* других родов ризобий. Наибольшие показатели нитрогеназной активности у штаммов рода *Mesorhizobium* наблюдали при трансформации их конструкциями с геном *nifA* бактерий рода *Ensifer*.

Индукция азотфиксирующей активности исследованных родов клубеньковых бактерий при искусственной активации экспрессии гена регуляторного белка NifA, как было показано в работе, возможна. При этом наблюдается функциональная универсальность NifA внутри бактерий трех взятых в анализ родов ризобий. Уровни ак-

тивации азотфиксации у штаммов одного вида разными филогенетическими вариантами NifA имеют различные значения, что говорит о том, что кроме эволюционной составляющей большое значение имеет генетическое сочетание набора генов, участвующих в процессе азотфиксации. Работы по искусственной комбинаторной эволюции *nif*-генов проводятся регулярно. Но до сих пор не известен механизм совместной работы всех продуктов данных генов, значение разных их сочетаний в эффективности азотфиксации (Smanski et al., 2014). И поскольку в природе встречаются штаммы бактерий даже одного вида с отличающейся эффективностью азотфиксации и, соответственно, разным набором и локализацией *nif*-генов, то значит процесс образования разных их комбинаций постоянный и имеет огромное значение в биологической минерализации атмосферного азота. Скорее всего, именно универсальность отдельных компонентов группы *nif*-генов делает возможным участие комбинаторных механизмов в эволюции генов азотфиксации, а также дает объяснение возможности образования химерных штаммов ризобий, когда в клетках клубеньковых бактерий обнаруживаются симбиотические гены другой филогенетической принадлежности. Таким образом, еще раз подтверждается ключевая роль горизонтального переноса генов между клубеньковыми бактериями в формировании большого разнообразия потенциально способных к азотфиксирующему симбиозу генетических вариантов ризобий и главенствующая роль бобового растения в отборе наиболее оптимальных для него штаммов клубеньковых бактерий.

Работа выполнена с использованием оборудования РЦКП “Агидель” и УНУ “КОДИНК”.



## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баймиев А.Х., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Искусственная активация экспрессии *nif*-генов у клубеньковых бактерий *ex planta* // Экологическая генетика. 2019. Т. 17. № 2. С. 35–42.  
<https://doi.org/10.17816/ecogen17235-42>
- Baymiev An.K., Gumenko R.S., Vladimirova A.A., Akimova E.S., Vershinina Z.R., Baymiev Al.K. Artificial activation of *nif* gene expression in nodule bacteria *ex planta* // Ecological Genetics. 2019. V. 17. № 2. P. 35–42.
- Баймиев А.Х., Птицын К.Г., Мулдашев А.А., Баймиев Ал.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий бобовых рода *Lathyrus*, произрастающих на территории Республики Башкортостан // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. № 2. С. 3–8.
- Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М: Изд-во МГУ, 1989. 136 с.
- An Q., Dong Y., Wang W., Li Y., Li J. Constitutive expression of the *nifA* gene activates associative nitrogen fixation of *Enterobacter gergoviae* 57-7, an opportunistic endophytic diazotroph // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 103. P. 613–620.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03289.x>
- Buchanan-Wollaston V., Cannon M.C., Beynon J.L., Cannon F.C. Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumonia* // Nature. 1981. V. 294. P. 776–778.  
<https://doi.org/10.1038/294776a0>
- Bush M., Dixon R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of  $\sigma^{54}$ -dependent transcription // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2012. V. 76. P. 497–529.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-12>
- Dai Z., Guo X., Yin H., Liang Y., Cong J., Liu X. Identification of nitrogen-fixing genes and gene clusters from metagenomic library of acid mine drainage // PLoS One. 2014. V. 9. P. e87976.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087976>
- Dixon R., Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 621–631.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro954>
- Dixon R.A., Postgate J.R. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* // Nature. 1972. V. 237. P. 102–103.
- Fischer H.M. Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes // Trends Microbiol. 1996. V. 4. P. 317–320.  
[https://doi.org/10.1016/0966-842x\(96\)10049-4](https://doi.org/10.1016/0966-842x(96)10049-4)
- Han Y., Lu N., Chen Q., Zhan Y., Liu W., Lu W., Yan Y. Interspecies transfer and regulation of *Pseudomonas stutzeri* A1501 nitrogen fixation island in *Escherichia coli* // J. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 25. P. 1339–1348.  
<https://doi.org/10.4014/jmb.1502.02027>
- Kennedy C., Robson R.L. Activation of *nif* gene expression in *Azotobacter* by the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumonia* // Nature. 1983. V. 301. P. 626–628.  
<https://doi.org/10.1038/301626a0>
- Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus // Microbiol. Res. 2014. V. 169. P. 2–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>
- Li X.X., Liu Q., Liu X.M., Shi H.W., Chen S.F. Using synthetic biology to increase nitrogenase activity // Microbial Cell Factor. 2016. V. 15. № 43. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0442-6>
- Mongiardini E.J., Ausmees N., Pérez-Giménez J., Julia Althabegoiti M., Ignacio Quelas J., López-García S.L., Lodeiro A.R. The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 65. P. 279–288.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00467.x>
- Newman J.R., Fuqua C. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* *araBAD* promoter and the *araC* regulator // Gene. 1999. V. 227. P. 197–203.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00601-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00601-5)
- Norel F., Elmerich C. Nucleotide sequence and functional analysis of the two *nifH* copies of *Rhizobium* ORS571 // Microbiology (SGM). 1987. V. 133. P. 1563–1576.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-133-6-1563>
- Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.
- Setten L., Soto G., Mozzicafreddo M., Fox A.R., Lisi C., Cuccioloni M., Ayub N.D. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions // PLoS One. 2013. V. 8. P. e63666.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063666>
- Smanski M.J., Bhatia S., Zhao D., Park Y., Woodruff L.B., Giannoukos G., Ciulla D., Busby M., Calderon J., Nicol R., Gordon D.B., Densmore D., Voigt C.A. Functional optimization of gene clusters by combinatorial design and assembly // Nature Biotechnol. 2014. V. 32. P. 1241–1249.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.3063>
- Sullivan J.T., Brown S.D., Ronson C.W. The NifA-RpoN regulon of *Mesorhizobium loti* strain R7A and its symbiotic activation by a novel LacI/GalR-family regulator // PLoS One. 2013. V. 8. P. e53762.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053762>
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Wang L., Zhang L., Liu Z., Zhao D., Liu X., Zhang B., Dixon R. A minimal nitrogen fixation gene cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 enables expression of active nitrogenase in *Escherichia coli* // PLoS Genet. 2013. V. 9. P. e1003865.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003865>
- Wongdee J., Boonkerd N., Teamroong N., Tittabutr P., Giraud E. Regulation of nitrogen fixation in *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 involves two distinct NifA regulatory proteins

that are functionally redundant during symbiosis but not during free-living growth // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1644.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01644>

Xu H., Gu B., Nixon B.T., Hoover T.R. Purification and characterization of the AAA+ domain of *Sinorhizobium meliloti* DctD, a  $\sigma^{54}$ -dependent transcriptional activator // *J.*

*Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 3499–3507.

<https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3499-3507.2004>

Yang J., Xie X., Wang X., Dixon R., Wang Y.P. Reconstruction and minimal gene requirements for the alternative iron-only nitrogenase in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 3718–3725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411185111>

## Functional Specificity of the *nifA* Gene Product within the Group of Root Nodule Bacteria

A. A. Vladimirova<sup>1</sup>, \*, R. S. Gumenko<sup>1</sup>, E. S. Akimova<sup>1</sup>, Al. Kh. Baymiev<sup>1</sup>, and An. Kh. Baymiev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

\*e-mail: [vladimirovaw@bk.ru](mailto:vladimirovaw@bk.ru)

Received January 22, 2021; revised March 04, 2021; accepted March 10, 2021

**Abstract**—The functional activity of different phylogenetic variants of the transcriptional activator of nitrogen fixation genes in the cells of root nodule bacteria (rhizobia) of different taxa was analyzed. For this purpose, recombinant strains of root nodule bacteria of the genera *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), and *Rhizobium* were created using genetic engineering constructs based on the plasmid *pJN105*. This plasmid contains different phylogenetic variants of the *nifA* gene typical for bacteria of the genera *Mesorhizobium*, *Ensifer*, and *Rhizobium* under the control of the *ParaBAD* bacterial promoter. It was shown that in free-living recombinant cells of all three bacterial genera, the introduction of an additional active copy of the *nifA* gene to their genome resulted in emergence of detectable nitrogenase activity. The level of nitrogenase activity was not directly related to the phylogeny of the introduced *nifA* gene, which is most likely explained by the universality of the product of this gene within the studied group of bacteria. The data obtained indicate the possibility of combinatorial processes in the evolution of nitrogen fixation genes.

**Keywords:** root nodule bacteria, nitrogen fixation, nitrogenase, *nif*-genes

## ОСОБЕННОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ СООБЩЕСТВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЕРМИТАМИ ТРОПИЧЕСКОГО МУССОННОГО ЛЕСА: НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПАРК КАТ ТЬЕН, ВЬЕТНАМ

© 2021 г. А. И. Зуева<sup>а</sup>, \*, А. В. Качалкин<sup>б</sup>, <sup>с</sup>, И. А. Максимова<sup>б</sup>, Нгуен Ван Тхинь<sup>д</sup>, А. В. Тиунов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>б</sup>Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

<sup>с</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино, 142290 Россия

<sup>д</sup>Российско-Вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр, Хошимин, Вьетнам

\*e-mail: aizueva.ecologist@gmail.com

Поступила в редакцию 25.02.2021 г.

После доработки 12.03.2021 г.

Принята к публикации 15.03.2021 г.

Исследовано дрожжевое население субстратов, связанных с термитниками пяти видов термитов, распространенных на территории национального парка Кат Тьен (южный Вьетнам): стенок гнезда, грибных садов (при их наличии), кишечника и поверхности тела термитов, а также листового опада и верхних горизонтов почвы вблизи термитников. Проанализированы морфо-физиологические особенности выделенных из ассоциаций с термитами дрожжей. Выделенные грибы с дрожжевым ростом отнесены к 39 видам, из которых 10 не были описаны на момент проведения исследования. Сообщества дрожжей, формирующиеся на поверхности тел и в кишечнике термитов, характеризуются низким видовым разнообразием. Для дрожжевых грибов, выделенных из кишечника и с поверхности тел термитов, характерен относительно широкий спектр морфологических и физиологических свойств (от 24 до 33 показателей из 34 пунктов стандартного описания), среди наиболее общих свойств можно отметить наличие структур мицелиального роста, способность сбраживать глюкозу, потреблять в качестве источника питания растительные гликозиды (салицин) и простые продукты разрушения древесины (ксилозу и целлобиозу).

**Ключевые слова:** дрожжевые грибы, термиты, Кат Тьен, Вьетнам, муссонный тропический лес, почвенные беспозвоночные, ксилофаги, микофаги, спектр морфо-физиологических свойств дрожжей

**DOI:** 10.31857/S0026365621040200

Биогенные структуры, возведенные и населенные почвенными беспозвоночными, оказывают влияние на плотность и видовой состав микробного населения почвы. Например, состав микромицетов и обилие бактерий в муравейниках значительно отличается от такового в контрольных образцах почвы (Чурилина и соавт., 2017), а деятельность норных дождевых червей изменяет таксономический состав дрожжевого населения растительных субстратов (Юрков и соавт., 2008).

Разнообразные субстраты, связанные с деятельностью беспозвоночных (древесина, разрушенная ксилофагами, цветки энтомофильных растений и т.д.), часто заселены специфическими сообществами дрожжевых грибов. Известны факты симбиоза насекомых и дрожжей; экспериментальное удаление дрожжевых симбионтов приводит к нарушениям роста и развития беспозвоночных-хозяев. Кроме того, многие насекомые (опылители, плодовые мушки) активно распространяют дрож-

жевые грибы (Чернов, 2013). Дрожжи обнаруживаются в гнездах насекомых, иногда даже если дрожжевые симбионты не выделяются из пищеварительного тракта беспозвоночных (Ganter, 2006). Таким образом, дрожжевые грибы присутствуют в микробных сообществах, ассоциированных с насекомыми, как в качестве постоянного симбиотического компонента, так и в роли временного или случайно привнесенного элемента микробного населения.

Одними из самых значимых разрушителей древесины и других растительных остатков, а также агентами изменения физических свойств почвы в тропических районах являются термиты (Ganter, 2006; Blackwell, 2017). Большинство исследований дрожжей, ассоциированных с термитами, фокусировались на кишечных симбионтах; особенности дрожжевого населения гнезд термитов, поверхности тел насекомых, а также субстратов, с которыми они взаимодействуют, изучались реже (Ganter, 2006).

Целью работы стало исследование дрожжевых сообществ, ассоциированных с термитами, в условиях тропического муссонного леса. Мы предполагали, что из-за активной деятельности термитов, преобразующей их местообитания, особенностей их поведения и выделяемых ими веществ (Guedegbe et al., 2009) дрожжевое население термитников и самих насекомых отличается от сообществ фоновых субстратов как по таксономическому составу дрожжей, так и по их морфо-физиологическим свойствам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Образцы для исследования** отбирали в ноябре 2018 года на равнинной территории национального парка Кат Тьен (Вьетнам). Среднегодовая температура около 26.4°C, с самым холодным периодом в январе (в среднем 24–25°C) и самым теплым в апреле (28°C). Годовое поступление осадков составляет около 2500 мм (Дещеревская и соавт., 2013). Отбор материала производили на двух модельных площадках – “Лагерстремия” и “Фигус”. Почвы обеих площадок классифицируются как темноцветные глинистые на базальтовых отложениях или Skeletic Greyzemic Umbrisols (Clayic). “Лагерстремия” (11°25'43" с.ш., 107°25'39" в.д.) – сравнительно ровная площадка с незначительным уклоном к северу. Первый подъярус лесного полога составляет *Lagerstroemia calyculata*; присутствует также *Tetrameles nudiflora*. Поверхность почвы покрыта в основном листьями, корой и ветками *L. calyculata*. “Фигус” (11°26'06" с.ш., 107°25'26" в.д.) – ровная площадка, расположенная под пологом одного дерева *Ficus* sp. Присутствуют также *L. calyculata*, *Dalbergia multiflora*, одиночные одревесневающие лианы. Опад состоит из листьев *Ficus* sp., *L. calyculata*, *D. multiflora* (Хохлова и соавт., 2017).

На площадках исследованы термитники пяти распространенных на территории национального парка видов термитов: *Globitermes sulphureus* (Naviland), *Microcerotermes burmanicus* Ahmad (= *M. crassus* Snyder), *Macrotermes carbonarius* (Hagen), *Macrotermes gilvus* (Hagen) и *Odontotermes* sp. (Беляева, Тиунов, 2010). Два первых вида относятся к подсемейству *Amitermitinae*, питаются древесиной, не выращивают грибные сады и могут быть вредителями построек и культурных растений (Lee et al., 2003; Wong, Lee, 2010). Три другие вида из подсемейства *Macrotermitinae* питаются преимущественно веточным и листовым опадом и выращивают грибные сады (Yamada et al., 2005).

На площадках были отобраны образцы структур термитников (стенки гнезда и грибные сады при их наличии), представители двух каст термитов (рабочие и солдаты), а также опад и почва вблизи гнезд. Образцы почвы и опада хранились и транспортировались в лабораторию в стериль-

ных бумажных пакетах. Некоторые насекомые (часть солдат и рабочих *M. gilvus* и *G. sulphureus*, часть солдат *M. carbonarius*, рабочие *M. burmanicus*) были высушены при температуре 26–28°C и также хранились в стерильных пакетах. Живые насекомые (рабочие и солдаты *M. carbonarius*, *M. gilvus*, *Odontotermes* sp.) содержались и транспортировались в пластиковых контейнерах и препарировались непосредственно в день прибытия в лабораторию.

**Микробиологический анализ** проводили в лабораторных условиях. Из всех субстратов были приготовлены суспензии с разным разведением: для опада – 1 : 20, для почвы – 1 : 10, для стенок термитников – 1 : 10, для грибных садов – 1 : 20. Из каждого образца готовили 2 навески, затем в пробирках со стерильной водой готовили суспензии, соответствующие выбранному разведению: материал помещали в пробирку типа фалькон со стерильной водой и встряхивали на вортексе Multi Reax (“Heidoiph GmbH”, Германия) в режиме 1700 об./мин в течение 15 мин. Каждая суспензия была посеяна на чашки Петри в объеме 50 мкл в двух повторностях, в качестве питательной среды был использован глюкозо-пептонно-дрожжевой агар (ГПДА) (Максимова, Чернов, 2006).

Для приготовления смывов с поверхности тел и суспензий из кишечников термитов насекомых (от 3 до 19 особей, в зависимости от размера и числа насекомых, имеющихся в распоряжении) помещали в пробирки с 300 мкл стерильной воды и также встряхивали на вортексе. Полученную жидкость рассеивали в трех повторностях, нанося на чашку Петри с ГПДА 50 мкл суспензии. После выполнения посева термитов извлекали из пробирки и промывали этиловым спиртом. Далее из насекомых с помощью пинцета извлекали кишечник, помещали его в стерильную воду и прокалывали, после чего встряхивали на вортексе. Обработанных спиртом высушенных термитов также помещали в стерильную воду и измельчали стерильной препаровальной иглой, после чего пробирка встряхивалась на вортексе. Полученные из высушенных насекомых препараты считали пригодными для выделения дрожжей из кишечника термитов, так как ранее подобный метод подготовки образцов успешно использовался в исследованиях микроорганизмов – потенциальных внутренних симбионтов насекомых (Hammer et al., 2015). Суспензию рассеивали в трех повторностях. Микробиологические посева выполняли методом Дригальского (Максимова, Чернов, 2006).

Чашки инкубировали при комнатной температуре от 4 до 9 сут. Сформировавшиеся за время инкубирования микробиологических посевов дрожжевые колонии подсчитывали (число КОЕ на 1 г веса сухого субстрата или на особь) и выделяли в чистую культуру. Штаммы были промик-

роскопированы и сгруппированы по морфологическим признакам (Максимова, Чернов, 2006). Всего было исследовано 44 образца; в 23 образцах грибы с дрожжевым ростом не были обнаружены.

**Видовую идентификацию** представителей каждого морфологического типа выделенных дрожжей проводили анализом последовательностей нуклеотидов ITS1–5.8S–ITS2 участка и/или D1/D2 доменов 26S (LSU) рДНК. Амплификацию рассматриваемых участков рДНК проводили с использованием праймеров ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAG-GAAGTA) и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-GG) (Глушакова и соавт., 2015). В отдельных случаях, когда реакция с данными праймерами не протекала или количество конечного продукта оказывалось недостаточным, амплификация проводилась повторно с применением вместо NL4 праймера ITS4-B (5'-CAGGAGACTTGTACAC-GGTCCAG) или ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC) (Gardes, Bruns, 1993). Амплификация была выполнена с использованием оборудования ЦКП “Инструментальные методы в экологии” при Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили в научно-производственной компании “Синтол” (Россия). Идентификацию до вида производили, используя данные генбанка NCBI (ncbi.nlm.nih.gov). Видовую принадлежность 5 штаммов из-за недостаточного количества биомассы и утраты культурами жизнеспособности определить не удалось.

**Обработка и интерпретация данных.** Для выделенных видов дрожжей было рассчитано относительное обилие в разных субстратах; виды, составлявшие около 20–50% и более дрожжевых сообществ исследованных образцов, рассматривались в качестве потенциальных доминантов (Чернов, 2013). По полученному массиву данных была проведена иерархическая кластеризация местообитаний (hierarchical clustering) методом средней связи (average linkage) (vegan) (r-project.org). Для субстратов был также рассчитан индекс Шеннона.

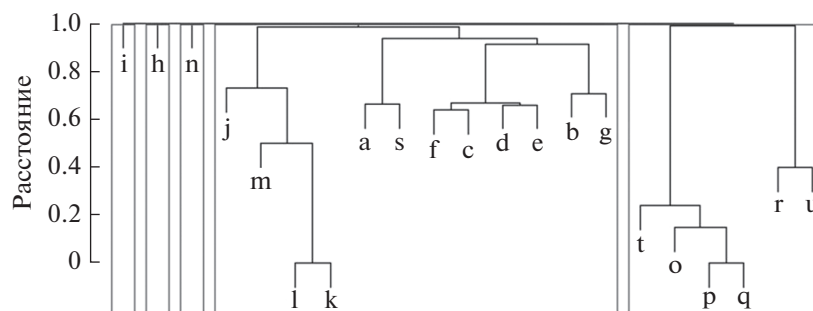
Для более полной экологической характеристики комплексов дрожжей, связанных с термитами, были исследованы их физиологические и некоторые морфологические особенности. Изучалось наличие или отсутствие у видов дрожжевых грибов способности сбраживать глюкозу, формировать мицелий или псевдомицелий, ассимилировать D-галактозу, D-глюкозу, L-сорбозу, L-арабинозу, D-арабинозу, L-рамнозу, D-ксилозу, лактозу, мальтозу, мелецитозу, мелибиозу, раффинозу, сахарозу, трегалозу, целлобиозу, инулин, растворимый крахмал, D-глюцитол, D-маннитол, глицерол, дульцит, инозитол, ритбит, эритритол, этанол,  $\alpha$ -метил-D-глюкозид, салицин, DL-лактат, цитрат, нитрат, расти при температурах 28 и 37°C – всего 34 показателя, входящих в стандартное опи-

сание видов дрожжей (Kurtzman et al., 2011). Информация о морфо-физиологических особенностях описанных видов дрожжей была получена из базы данных MycoBank (mycobank.org), определителя дрожжевых грибов (Kurtzman et al., 2011) и других работ об известных видах дрожжей (Thanh et al., 2006; Landell et al., 2014; Surussawadee et al., 2014; Liu et al., 2015; Surussawadee et al., 2015; Yurkov et al., 2015; Into et al., 2018). Были также проведены дополнительные физиологические тесты (согласно указанному в работе Максимова, Чернов, 2006) для 6 видов, не описанных на момент исследования, штаммы которых сохранили физиологическую активность и были пригодны для повторного посева.

По результатам анализа литературных и собственных данных была составлена бинарная матрица. На ее основании было произведено распределение видов по кластерам методом k-средних (k-means clustering) (программные пакеты “tidyverse”; “factoextra”; “cluster”). Число кластеров выбирали с помощью методов среднего силуэта (average silhouette method) (программный пакет “factoextra”) и статистики разрыва (gap statistic method) (программный пакет “cluster”). Из этого анализа были исключены грибы, не являющиеся истинными дрожжами (*Acremonium* sp., *Aureobasidium thailandense*, *Verhulstia* sp.), и виды, для которых не удалось произвести анализ физиологических свойств, так как соответствующие штаммы утратили жизнеспособность (*Teunia* sp., *Papiliotrema* sp., *Saitozyma* sp., *Tremella* sp.). По результатам тестов было визуализировано положение видов в поле морфо-физиологических свойств методом главных компонент с помощью функций `prcomp` и `biplot` (программный пакет “vegan”). Затем для исследованных местообитаний была составлена бинарная матрица с информацией о наличии/отсутствии представителей выделенных “морфо-физиологических” кластеров в каждом субстрате. По полученному массиву данных сходные образцы были распределены по группам методом k-средних. Оптимальное число групп выбирали с помощью методов среднего силуэта и статистики разрыва. Для визуализации групп была применена функция `fviz_cluster`, использующая главные компоненты (программный пакет “factoextra”). Все статистические анализы и сравнения произведены в программной среде R (r-project.org).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее количество дрожжей, обнаруженных в листовом опаде с двух площадок, варьировало от  $1.4 \times 10^3$  до  $3.8 \times 10^4$  КОЕ/г субстрата. В почве обнаружено от  $1.8 \times 10^2$  до  $2.0 \times 10^2$  дрожжевых КОЕ/г. Число колониеобразующих единиц в образцах стенок термитников находилось в диапазоне от  $2.5 \times 10$  (площадка “Лагерстремия”, стенки термитника *M. gilvus*) до  $2.2 \times 10^3$  (площадка “Лагер-



**Рис. 1.** Результаты кластеризации субстратов по относительному обилию грибов с дрожжевым ростом. Опад: а – у термитника *M. carbonarius* на площадке “Лагерстремия”, б – у термитника *M. gilvus* на площадке “Лагерстремия”, с – у термитника *Odontotermes* sp. на площадке “Лагерстремия”, d – у термитника *G. sulphureus* на площадке “Фигус”, e – у термитника *M. gilvus* на площадке “Фигус”, f – у термитника *M. burmanicus* на площадке “Фигус”. Почва: g – у термитника *M. carbonarius* на площадке “Лагерстремия”, h – у термитника *G. sulphureus* на площадке “Фигус”, i – у термитника *M. gilvus* на площадке “Фигус”. Стенки термитников: j – *M. carbonarius* на площадке “Лагерстремия”, k – *M. gilvus* на площадке “Лагерстремия”, l – *Odontotermes* sp. на площадке “Лагерстремия”, m – *G. sulphureus* на площадке “Фигус”, n – *M. gilvus* на площадке “Фигус”. Смыывы с тела рабочих термитов: o – *M. carbonarius* на площадке “Лагерстремия”, p – *Odontotermes* sp. на площадке “Лагерстремия”. Кишечник рабочих термитов: q – *M. carbonarius* на площадке “Лагерстремия”, r – *Odontotermes* sp. на площадке “Лагерстремия”, s – *M. gilvus* на площадке “Фигус”. Смыывы с тела солдат: t – *M. carbonarius* на площадке “Лагерстремия”, u – *Odontotermes* sp. на площадке “Лагерстремия”.

стремия”, стенки термитника *M. carbonarius*) на 1 г субстрата.

Среднее число дрожжевых колониеобразующих единиц, выделенных с поверхности тел рабочих термитов, было крайне низким и составило от 3 до 9 на особь. Кишечники рабочих содержали от 1 до 5 дрожжевых КОЕ/особь. В смыывах с солдат обнаруживалось от 5 до 49 КОЕ/особь.

Всего было выделено 39 видов грибов с дрожжевым ростом (в том числе 10 ранее не описанных видов), относящихся к 13 аскомицетовым и 9 базидиомицетовым родам. Полученные нуклеотидные последовательности обнаруженных видов были депонированы в генбанк NCBI (MW325297–MW325342) (табл. 1).

Неописанные на момент исследования виды сравнили с известными штаммами в генбанке NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных CBS (mycobank.org). При проценте перекрытия 93–100% сходство обнаруженных микроорганизмов с ранее описанными видами и референсными штаммами составляло 91.51–98.81% (табл. 2).

Согласно кластерному анализу, по относительному обилию видов дрожжевые сообщества кишечника термитов и поверхности их тел обособливаются от остальных исследованных местообитаний. В качестве отличительных особенностей данных субстратов можно назвать присутствие вида *Sugiyamaella smithiae*, а также ранее не описанного представителя рода *Blastobotrys*. В то же время, эти дрожжи не были обнаружены в кишечнике рабочих *M. gilvus* на площадке “Фигус”, а присутствие в данном субстрате дрожжеподобного гриба *Aureobasidium thailandense* сблизило характеристики его микробного населения со свой-

ствами сообществ некоторых образцов опада и стенок термитников (рис. 1, табл. 3).

Индекс Шеннона достигал наибольших значений в опаде (до 2.68 бит) и стенках термитников (до 2.67 бит); меньшие величины определялись для почв (до 1.95 бит), смыывов с поверхности тела (1.42 бит) и кишечника рабочих (1.37 бит); наименьшие значения были отмечены для смыывов с поверхности солдат (до 0.95 бит).

Анализ бинарной матрицы морфофизиологических свойств методом k-средних распределил обнаруженные виды дрожжей на 5 кластеров. Представители кластеров 1, 2, 3, 5 отличались относительно широким спектром морфофизиологических особенностей (присутствует от 21 до 33 свойств); все виды из кластера 5 были способны к брожению и образованию гиф/псевдогиф, а представители кластера 1, напротив, не сбраживали глюкозу и не формировали мицелиальных структур. Культуры кластера 4 характеризуются относительно узким спектром свойств (отмечено от 9 до 13 морфофизиологических показателей). Представители кластеров отображены в поле морфофизиологических свойств, построенном методом главных компонент (рис. 2).

При анализе распределения дрожжей с разными морфофизиологическими свойствами субстраты, относящиеся непосредственно к насекомым (смыывы с тел и кишечника), обособились от прочих субстратов, сформировав группу I (рис. 3). Исключением стал смыыв с тела солдат *Odontotermes* sp., объединившийся с образцами опада в группу III. Этот образец характеризовался одновременным присутствием представителей морфофизиологических кластеров 2 и 3 и отсут-

Таблица 1. Список обнаруженных грибов с дрожжевым ростом

Род	Вид	Номер сиквенса в GenBank
<i>Acremonium</i>	<i>Acremonium</i> sp.*	MW325297
<i>Aureobasidium</i>	<i>Aureobasidium thailandense</i> S.W. Peterson, Manitchotpisit & Leathers (2013)	MW325298
<i>Barnettozyma</i>	<i>Barnettozyma siamensis</i> Polburee & Limtong (2014)	MW325299
<i>Blastobotrys</i>	<i>Blastobotrys capitulata</i> de Hoog, Rantio-Lehtimäki & M.Th. Smith (1985)	MW325300, MW325301
	<i>Blastobotrys</i> sp. 1*	MW325335 MW325336 MW325337 MW325338
	<i>Blastobotrys</i> sp. 2*	MW325302
<i>Candida</i>	<i>Candida dendronema</i> van der Walt, van der Klift & D.B. Scott (1971)	MW325303
	<i>Candida jaroonii</i> Imanishi, Jindamorakot, Nakagiri, Limtong & Nakase (2008)	MW325339 MW325340
	<i>Candida michaelii</i> S.-O. Suh, N.H. Nguyen & M. Blackwell (2005)	MW325304
	<i>Candida orthopsilosis</i> Tavanti, A. Davidson, Gow, M. Maiden & Odds (2005)	MW325307
	<i>Candida</i> sp.*	MW325305
<i>Verhulstia</i>	<i>Verhulstia</i> sp.*	MW325306
<i>Hannaella</i>	<i>Hannaella pagnoccae</i> Landell, M.F. et al. (2013)	MW325310
	<i>Hannaella phyllophila</i> Surussawadee, Jindam., Am-In, Nakase, C.F. Lee & Limtong (2015)	MW325311
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora occidentalis</i> M.Th. Smith (1974)	MW325312
<i>Kazachstania</i>	<i>Kazachstania africana</i> (Van der Walt) Kurtzman (2003)	MW325313
	<i>Kazachstania naganishii</i> (Mikata, Ueda-Nishimura & Hisatomi) Kurtzman (2005)	MW325314
<i>Kodamaea</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i> (Etchells & T.A. Bell) Y. Yamada, T. Suzuki, Matsuda & Mikata (1995)	MW325342
<i>Kwoniella</i>	<i>Kwoniella bestiolae</i> (Thanh, Hai & Lachance) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout (2015)	MW325315
	<i>Kwoniella dejecticola</i> (Thanh, Hai & Lachance) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout (2015)	MW325316
	<i>Kwoniella mangrovensis</i> Statzell, Belloch & Fell (2008)	MW325317
<i>Meyerozyma</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i> (Vaughan-Martini, Kurtzman, S.A. Meyer & O'Neill) Kurtzman & M. Suzuki (2010)	MW325341
<i>Papiliotrema</i>	<i>Papiliotrema laurentii</i> (Kuff.) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout (2015)	MW325320
	<i>Papiliotrema leoncinii</i> D.M. Pagani, L.R. Brandao, A.R.O. Santos, C.R. Felix, J.P. Ramos, Broetto, Scorzetti, Fell, C.A. Rosa, P. Valente & Landell (2016)	MW325319 MW325324
	<i>Papiliotrema plantarum</i> P. Into, A. Pontes, N. Jacques, Casareg., Limtong & J.P. Samp. (2018)	MW325318
	<i>Papiliotrema ruineniae</i> (Yurkov, M.A. Guerreiro & Á. Fonseca) Yurkov (2015)	MW325321
	<i>Papiliotrema siamensis</i> Suruss., Khunnamw. & Limtong (2014)	MW325322
	<i>Papiliotrema</i> sp.*	MW325323



Таблица 1. Окончание

Род	Вид	Номер сиквенса в GenBank
<i>Rhodosporidiobolus</i>	<i>Rhodosporidiobolus azoricus</i> (Samp. & Gadanho) Q.M. Wang, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout (2015)	MW325325
	<i>Rhodosporidiobolus ruineniae</i> (Holzschu, Tredick & Phaff) Q.M. Wang, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout (2015)	MW325326
<i>Rhynchogastrema</i>	<i>Rhynchogastrema</i> sp.*	MW325327
<i>Saitozyma</i>	<i>Saitozyma podzolica</i> (Babeva & Reshetova) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout (2015)	MW325329
	<i>Saitozyma</i> sp.*	MW325328
<i>Schwanniomyces</i>	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i> (van der Walt & Tscheuschner) M. Suzuki & Kurtzman (2010)	MW325308 MW325333
	<i>Sugiyamaella smithiae</i> (Giménez-Jurado) Kurtzman & Robnett (2007)	MW325332
<i>Teunia</i>	<i>Teunia</i> sp.*	MW325309
<i>Torulaspora</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i> (Lindner) Lindner (1904)	MW325331
<i>Tremella</i>	<i>Tremella</i> sp.*	MW325330
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i> (Soneda & S. Uchida) Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008)	MW325334

\* Новые и неописанные виды.

ствием элементов кластера 5, встречавшихся в других образцах тел и кишечников насекомых. В этом же образце присутствовал вид *Sugiyamaella smithiae* — единственный дрожжевой гриб, выделенный из термитов в данном исследовании, образующий мицелиальные структуры, но не способный к брожению (все остальные виды из данных субстратов как формируют гифы/псевдогифы, так и сбраживают глюкозу). Кроме того, все дрожжи, выделенные с поверхности термитов и из их кишечников, характеризуются способностью ассимилировать салицин, что может указывать на участие дрожжевых грибов в детоксикации пищевых субстратов насекомых (Ganter, 2006). Ни в одном из образцов смывов с термитов и кишечников не обнаружили виды дрожжей из кластеров 1 и 4. Группа II включала образцы почвы, группа IV — образцы опада. Образцы из стенок термитников не формировали обособленного кластера и распределились по группам II, III и IV (рис. 3).

В ходе исследования было выявлено 39 видов грибов с дрожжевым ростом, из которых 29 удалось определить до видового уровня; 10 относились к видам, не описанным на момент исследования; планируется описание нескольких новых видов. Неописанные виды встречались в каждом типе субстратов, из которых удавалось выделить дрожжи. Дрожжевые сообщества, ассоциированные с зоогенными структурами и телами термитов, отличались относительно низкими видовым

разнообразием и численностью КОЕ; из ряда образцов дрожжи выделены не были.

Некоторые из изученных объектов относятся к субстратам, бедным доступными для дрожжей сахарами или отличающимся наличием факторов, препятствующих развитию дрожжевых грибов. Содержание органического углерода в стенках гнезд термитов рода *Macrotermes* часто ниже, чем в окружающей почве (Contour-Ansel et al., 2000), поскольку для строительства ими используется глина из глубоких горизонтов. Кроме того, некоторые термиты используют для строительства гнезд слюну и экскременты, содержащие вещества, обладающие антимикробной активностью (Rosengaus et al., 2011).

Механизмы, ограничивающие рост грибов, не выращиваемых термитами, и объясняющие низкую концентрацию несимбиотических дрожжей, присутствуют и в грибных садах. Вероятнее всего, регуляция численности посторонних микроорганизмов в садах осуществляется самими термитами, как посредством физического удаления, так и с помощью веществ с антимикробной активностью, обнаруживаемых в слюнных железах термитов. Фунгистатической активности нескольких видов рода *Termitomyces*, культивируемых термитами, по-видимому, недостаточно для регулирования роста других грибов. Деятельность актиномицетов — кишечных симбионтов термитов также не обеспечивает уничтожение посторонних видов, хотя эти микроорганизмы используются для регулирования состава населения садов другими

**Таблица 2.** Сравнение неописанных видов с известными штаммами

Вид, обнаруженный в ходе исследования	Штамм	Номер в GenBank	Близкий родственный штамм (NCBI)	Сходство, %/Процент перекрытия, %
<i>Acremonium</i> sp.	T75	MW325297	<i>Furcasterigmium (Acremonium) furcatum</i> CBS 610.69 (LR025837)	97.08/100
<i>Blastobotrys</i> sp. 1	T9	MW325335	<i>Blastobotrys capitulate</i> CBS 287.82 (CBS database)	92.22/100
<i>Blastobotrys</i> sp. 2	T27	MW325302	<i>Blastobotrys attinorum</i> CBS 9734 (KY106202)	91.51/100
<i>Candida</i> sp.	T71	MW325305	<i>Candida nonsorbophila</i> CBS 10862 (KY106601)	96.81/100
<i>Verhulstia</i> sp.	T81	MW325306	<i>Verhulstia trisororum</i> CBS 143234 (MG022160)	97.72/100
<i>Papiliotrema</i> sp.	T61	MW325323	<i>Papiliotrema mangalensis</i> CBS 10870 (KY107130)	98.71/100
<i>Rhynchogastrema</i> sp.	T91	MW325327	<i>Rhynchogastrema fermentans</i> CBS 12399 (HM461720)	97.53/93
<i>Saitozyma</i> sp.	T69	MW325328	<i>Saitozyma ninhbinhensis</i> JCM 10836 (AB261011)	98.81/99
<i>Teunia</i> sp.	T62	MW325309	<i>Teunia globosa</i> CGMCC 2.5648 (MK050288)	98.71/100
<i>Tremella</i> sp.	T63	MW325330	<i>Tremella</i> sp. DSM 104578 (MK307723)	95.16/100

насекомыми, выращивающими грибы — муравьями-листорезами (Guedegbe et al., 2009). Таким образом, состав микромицетов в термитнике зависит преимущественно от деятельности населяющих его насекомых. Секреты слюнных желез, в сочетании со способностью термитов распознавать патогены и аллогрумингом, позволяют ограничивать распространение посторонних микроорганизмов также и на поверхности тел насекомых (Rosengaus et al., 2011).

Перечисленные факторы могли стать причиной отсутствия дрожжевых грибов в некоторых образцах почв, стенок термитников, а также в образцах грибных садов и некоторых особях термитов.

Кластеризация по присутствию и относительному обилию грибов с дрожжевым ростом в исследованных образцах, а также по представленности групп с различными морфо-физиологическими особенностями показала, что субстраты, относящиеся непосредственно к самим термитам (поверхность тела и кишечник), отличаются от остальных местообитаний по характеристикам дрожжевого населения. Виды истинных дрожжей, обнаруженные в образцах данного типа, не были встречены в других субстратах (в том числе и в структурах термитников). Ранее эти дрожжевые грибы также упоминались в связи с исследованиями местообитаний, населенных насекомыми. Вид *Blastobotrys capitulata*, ассоциированный

преимущественно с растительным материалом (Kurtzman et al., 2011), обнаруживался также в гниющей древесине, пораженной насекомыми (Ganter, 2006). Вид *Candida jaroonii* ранее был выделен из экскрементов насекомых (mycobank.org). Дрожжи *Kodamae ohmeri* часто упоминаются в связи с насекомыми-опылителями и общественными насекомыми. Отмечено обнаружение этого вида на пчелах (Kurtzman et al., 2011) и в грибных садах муравьев-листорезов *Atta texana* (Rodrigues et al., 2009). Ряд штаммов был выделен из жуков семейства *Nitidulidae*, питающихся грибами, пыльцой, ферментированными плодами и растительными остатками. Некоторые из этих жуков связаны с общественными насекомыми и обнаруживаются в гнездах пчел и муравьев. На всех стадиях жизненного цикла жука *Brachypeplus glaber* (*Nitidulidae*) выделялся также широко распространенный вид дрожжей *Meyerozyma caribbica* (Cline et al., 2014). Вид *Sugiyamaella smithiae* был обнаружен в экскрементах насекомых-древоточцев, обитающих в красной японской сосне; из субстратов этого же типа выделено большинство известных штаммов вида (Kurtzman et al., 2011). Эти дрожжи выделялись и из кишечника ксилофагов (в частности, термита *Reticulitermes chinensis*). Примечательно, что этот вид способен к образованию ксиланазы (Ali et al., 2017). В то же время, это единственный из перечисленных видов, не сбраживающий сахара.

**Таблица 3.** Список субстратов и выделенных из них грибов с дрожжевым ростом, с указанием индексов субстратов (см. рис. 1) и относительным обилием доминирующих видов от общего обилия идентифицированных до вида дрожжевых грибов в субстрате

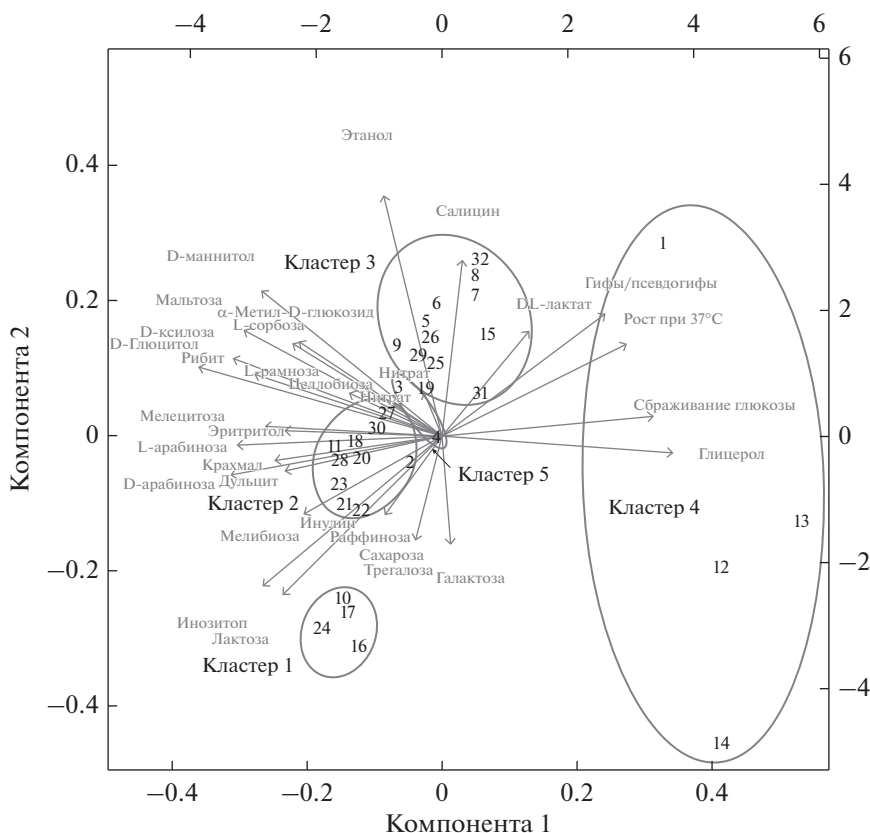
Индекс субстрата	Местообитание	Виды грибов с дрожжевым ростом
a	Опад вблизи гнезда <i>M. carbonarius</i> , площадка “Лагерстремия”	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aureobasidium thailandense</i> (33.8%), <i>Candida michaelii</i> (18.8%), <i>Candida orthopsilosis</i> , <i>Kwoniella dejecticola</i> (20.7%), <i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Papiliotrema leoncinii</i> , <i>Rhodospordiobolus ruineniae</i> , <i>Saitozyma</i> sp.
b	Опад вблизи гнезда <i>M. gilvus</i> , площадка “Лагерстремия”	<i>Papiliotrema laurentii</i> (33.9%), <i>Rhodospordiobolus ruineniae</i> , <i>Schwanniomyces vanrijiae</i> (37.5%)
c	Опад вблизи гнезда <i>Odontotermes</i> sp., площадка “Лагерстремия”	<i>Aureobasidium thailandense</i> , <i>Rhodospordiobolus azoricus</i> , <i>Rhodospordiobolus ruineniae</i> (35.9%), <i>Teunia</i> sp. (36.3%), <i>Tremella</i> sp.
d	Опад вблизи гнезда <i>G. sulphureus</i> , площадка “Фигус”	<i>Candida dendronema</i> , <i>Rhodospordiobolus ruineniae</i> (86.1%)
e	Опад вблизи гнезда <i>M. gilvus</i> , площадка “Фигус”	<i>Kwoniella bestiolae</i> , <i>Papiliotrema plantarum</i> , <i>Papiliotrema</i> sp., <i>Rhodospordiobolus ruineniae</i> (33.9%), <i>Rhynchogastrea</i> sp. (27.1%)
f	Опад вблизи гнезда <i>M. burmanicus</i> , площадка “Фигус”	<i>Blastobotrys</i> sp. 2, <i>Hannaella pagnoccae</i> , <i>Kwoniella bestiolae</i> (22.0%), <i>Kwoniella mangrovensis</i> , <i>Papiliotrema leoncinii</i> , <i>Papiliotrema</i> sp., <i>Rhodospordiobolus azoricus</i> , <i>Rhodospordiobolus ruineniae</i> (28.5%), <i>Tremella</i> sp., <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>
g	Почва, <i>M. carbonarius</i> , площадка “Лагерстремия”	<i>Barnettozyma siamensis</i> (58.3%), <i>Kazachstania africana</i> , <i>Schwanniomyces vanrijiae</i> (29.2%)
h	Почва, <i>G. sulphureus</i> , площадка “Фигус”	<i>Candida</i> sp. (33.3%), <i>Kazachstania naganishii</i> (33.3%), <i>Torulaspota delbrueckii</i>
i	Почва, <i>M. gilvus</i> , площадка “Фигус”	<i>Verhulstia</i> sp. (100.0%)
j	Стенки термитника <i>M. carbonarius</i> , площадка “Лагерстремия”	<i>Aureobasidium thailandense</i> , <i>Hannaella phyllophila</i> , <i>Papiliotrema laurentii</i> (25.0%), <i>Papiliotrema leoncinii</i> , <i>Papiliotrema ruineniae</i> , <i>Papiliotrema siamensis</i> , <i>Saitozyma podzolica</i> (25.5%), <i>Teunia</i> sp.
k	Стенки термитника <i>M. gilvus</i> , площадка “Лагерстремия”	<i>Saitozyma podzolica</i> (100.0%)
l	Стенки термитника <i>Odontotermes</i> sp., площадка “Лагерстремия”	<i>Saitozyma podzolica</i> (100.0%)
m	Стенки термитника <i>G. sulphureus</i> , площадка “Фигус”	<i>Papiliotrema leoncinii</i> (50.0%), <i>Saitozyma podzolica</i> (50.0%)
n	Стенки термитника <i>M. gilvus</i> , площадка “Фигус”	<i>Hanseniaspora occidentalis</i> (50.0%)
o	Смывы с рабочих термитов, <i>M. carbonarius</i> , площадка “Лагерстремия”	<i>Blastobotrys capitulata</i> , <i>Blastobotrys</i> sp. 1 (85.2%), <i>Kodamaea ohmeri</i>
p	Смывы с рабочих термитов, <i>Odontotermes</i> sp., площадка “Лагерстремия”	<i>Blastobotrys</i> sp. 1 (100.0%)
q	Кишечник рабочих термитов, <i>M. carbonarius</i> , площадка “Лагерстремия”	<i>Blastobotrys</i> sp. 1 (100.0%)
r	Кишечник рабочих термитов, <i>Odontotermes</i> sp., площадка “Лагерстремия”	<i>Blastobotrys capitulata</i> , <i>Sugiyamaella smithiae</i> (60.0%)

Таблица 3. Окончание

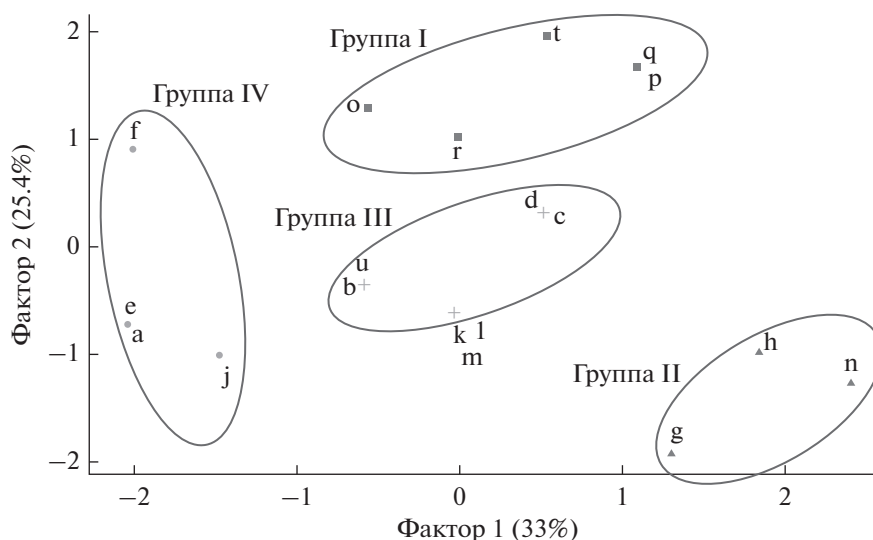
Индекс субстрата	Местообитание	Виды грибов с дрожжевым ростом
s	Кишечник рабочих термитов, <i>M. gilvus</i> , площадка “Фикус”	<i>Aureobasidium thailandense</i> (100.0%)
t	Смыв с солдат, <i>M. carbonarius</i> , площадка “Лагерстремия”	<i>Blastobotrys</i> sp. 1 (75.0%), <i>Candida jaroonii</i> (21.7%), <i>Kodamaea ohmeri</i>
u	Смыв с солдат, <i>Odontotermes</i> sp., площадка “Лагерстремия”	<i>Meyerozyma caribbica</i> , <i>Sugiyamaella smithiae</i> (93.3%)

Несмотря на то, что перечисленные виды в нашем исследовании были выделены только с поверхности тел или из кишечника термитов и ранее также выделялись из насекомых и их местообитаний, их нельзя назвать строго ассоциированными с насекомыми. Эти дрожжи часто выделялись и из дру-

гих субстратов (Kurtzman et al., 2011). Однако наличие определенных морфо-физиологических свойств (способности к брожению, образованию мицелия/псевдомицелия, потреблению в качестве источника питания салицина и простых продуктов разрушения древесины) может оказаться



**Рис. 2.** Результаты анализа морфо-физиологических свойств обнаруженных дрожжевых грибов. Овалы являются вспомогательным элементом для обозначения кластеров, выделенных методом k-средних, и не отображают статистические показатели. 1 – *Barnettozyma siamensis*, 2 – *Blastobotrys capitulata*, 3 – *Blastobotrys* sp. 1, 4 – *Blastobotrys* sp. 2, 5 – *Candida dendronema*, 6 – *Candida jaroonii*, 7 – *Candida michaelii*, 8 – *Candida orthopsilosis*, 9 – *Candida* sp., 10 – *Hannaella pagnoccae*, 11 – *Hannaella phyllophila*, 12 – *Hanseniaspora occidentalis*, 13 – *Kazachstania africana*, 14 – *Kazachstania naganishii*, 15 – *Kodamaea ohmeri*, 16 – *Kwoniella bestiolae*, 17 – *Kwoniella dejecticola*, 18 – *Kwoniella mangrovensis*, 19 – *Meyerozyma caribbica*, 20 – *Papiliotrema laurentii*, 21 – *Papiliotrema leonicinii*, 22 – *Papiliotrema plantarum*, 23 – *Papiliotrema ruineniae*, 24 – *Papiliotrema siamensis*, 25 – *Rhodospordiobolus azoricus*, 26 – *Rhodospordiobolus ruineniae*, 27 – *Rhynchogastrema* sp., 28 – *Saitozyma podzolica*, 29 – *Schwanniomyces vanrijiae*, 30 – *Sugiyamaella smithiae*, 31 – *Torulaspora delbrueckii*, 32 – *Wickerhamomyces rabaulensis*.



**Рис. 3.** Классификация субстратов на основании наличия дрожжевых грибов с различными морфо-физиологическими свойствами (см. рис. 2). Обозначения субстратов даны на рис. 1. Овалы являются вспомогательным элементом для обозначения групп субстратов, выделенных методом *k*-средних, и не отображают статистические показатели.

характерной чертой дрожжей, связанных с насекомыми-ксилофагами.

Кишечник беспозвоночных ранее отмечался в качестве местообитания дрожжевых грибов, активно сбраживающих сахара (Чернов, 2013). Кишечный тракт термитов и других ксилофагов пригоден для развития копиотрофных микроорганизмов благодаря присутствию простых продуктов разрушения древесины (Ali et al., 2017). Тем не менее, кишечник термитов нельзя назвать субстратом с высоким содержанием доступных углеводов: концентрация сахаров иногда не достигает 1% (Veivers et al., 1991), тогда как высокосахаристые субстраты, например, ферментированные продукты, фрукты, сиропы, могут содержать от 20 до 40% (в ряде случаев – до 70%) свободных сахаров (Токуока, 1985; Чернов, 2013). Таким образом, одноклеточные формы роста, характерные для богатых питательными веществами сред (Чернов, 2013), в телах термитов обладают меньшим адаптивным значением. Напротив, развитые мицелиальные структуры, направленные на освоение плотных субстратов в условиях затрудненного распространения клеток (Yurkov, 2017), по-видимому, становятся важным приспособлением дрожжей, связанных с термитами.

На сочетание способности к брожению и формированию мицелиальных структур у элементов дрожжевых сообществ социальных насекомых, потребляющих древесину, указывали результаты и других исследований (Blackwell, 2017). Например, дрожжи, выделенные из кишечника и с поверхности жуков-ксилофагов из семейства *Passalidae*, были способны к мицелиальному росту и либо сбраживали сахара, либо являлись ксиланолитиками.

Подобные особенности дрожжевого населения ранее отмечались также для субсоциальных насекомых: из кишечника древесных тараканов *Cryptocercus* sp. выделялись сбраживающие глюкозу виды дрожжей, способные к формированию хорошо развитого мицелия; при этом был обнаружен новый на момент исследования дрожжевой вид, сбраживающий ксилозу (Kurtzman, 2011; Blackwell, 2017).

Таким образом, можно предположить, что дрожжевые сообщества, ассоциированные с насекомыми-ксилофагами, обладают определенным набором морфо-физиологических свойств: способностью сбраживать сахара, усваивать относительно широкий спектр питательных веществ, в том числе простые продукты разрушения древесины, формировать мицелиальные структуры. Благодаря своей способности ассимилировать салицин, дрожжевые грибы, населяющие кишечник термитов, по-видимому, упрощают потребление ксилофагами древесных субстратов.

Местообитания общественных насекомых-ксилофагов интересны для микробиологических исследований как с таксономической (в качестве источника новых и неописанных видов), так и с экологической (при изучении механизмов формирования микробных сообществ) точек зрения. Проведенное исследование показало, что дрожжевое население субстратов, ассоциированных с термитами, отличается от сообществ фоновых субстратов – почвы и опада – по численности, видовому составу, относительноному обилию и физиологическим свойствам элементов. Деятельность термитов определяет не только количество и разнообразие дрожжей, ассоциированных с

термитником и его обитателями, но и морфофизиологические особенности формируемых в нем дрожжевых сообществ.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудников ИПЭЭ С.М. Цурикова РАН за помощь в подготовке и идентификации термитов, М.В. Холодову и И.Г. Мешерского за предоставление возможности применения методов молекулярной диагностики, А.Г. Зуева и А.М. Потапова за неоценимую помощь в статистической обработке и интерпретации результатов, сотрудника факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова А.Е. Иванова за помощь в лабораторной работе.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проекта РФФИ “Роль почвенных микроорганизмов и беспозвоночных в деструкции стойких искусственных полимеров в различных климатических зонах” (проект № 18-29-05076). Работа А.В. Качалкина выполнена в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беляева Н.В., Тиунов А.В. Термиты (Isoptera) в лесных экосистемах национального парка Кат Тьен (южный Вьетнам) // Известия РАН, Сер. биол. 2010. № 4. С. 442–450. Belyaeva N.V., Tiunov A.V. Termites (Isoptera) in forest ecosystems of Cat Tien national park (Southern Vietnam) // Biol. Bull. 2010. V. 37. № 4. P. 374–381.

Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. Почвенные дрожжевые сообщества в условиях агрессивной инвазии борщевика Сосновского (*Heraclеum sosnowskyi*) // Почвоведение. 2015. № 2. С. 221–227.

Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Yu. Soil yeast communities under the aggressive invasion of Sosnowsky's hogweed (*Heraclеum sosnowskyi*) // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. № 2. P. 201–207.

Дещеревская О.А., Авилов В.К., Динь Б.З., Чан К.Х., Курбатова Ю.А. Современный климат национального парка Кат Тьен (южный Вьетнам): использование климатических данных для экологических исследований // Геофизические процессы и биосфера. 2013. Т. 12. № 2. С. 5–33. Deshcherevskaya O.A., Avilov V.K., Dinh B.D., Tran C.H., Kurbatova J.A. Modern climate of the Cát Tiên National Park (Southern Vietnam): climatological data for ecological studies // Izvestiya, Atmospheric and Oceanic Physics. 2013. V. 49. № 8. P. 819–838.

Максимова И.А., Чернов И.Ю. Руководство к практическим занятиям по биологии дрожжей. Тула: Гриф и К., 2006. 96 с.

Хохлова О.С., Мьякшина Т.Н., Кузнецов А.Н., Губин С.В. Морфогенетические особенности почв национального парка Кат Тьен, Южный Вьетнам // Почвоведение. 2017. № 2. С. 176–194.

Khokhlova O.S., Myakshina T.N., Gubin S.V., Kuznetsov A.N. Morphogenetic features of soils in the Cat Tien National Park, Southern Vietnam // Euras. Soil Sci. 2017. V. 50. P. 158–175.

Чернов И.Ю. Дрожжи в природе. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. 336 с.

Цурилина А.Е., Голиченков М.В., Иванова А.Е., Закалюкина Ю.В., Умаров М.М. Биологическая активность муравьиных гнезд среднетаежной зоны // Вестн. Московского ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2017. № 4. С. 40–44.

Юрков А.М., Чернов И.Ю., Тиунов А.В. Влияние дождевых червей *Lumbricus terrestris* на структуру дрожжевого сообщества лесной подстилки // Микробиология. 2008. Т. 77. № 1. С. 121–125.

Yurkov A.M., Chernov I.Yu., Tiunov A.V. Influence of *Lumbricus terrestris* earthworms on the structure of the yeast community of forest litter // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 107–111.

Ali S.S., Wu J., Xie R., Zhou F., Sun J., Huang M. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis* // PLoS One. 2017. V. 12. e0181141.

Blackwell M. Yeasts in insects and other invertebrates // Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity / Eds. Buzzini P., Lachance M.A., Yurkov A. Springer, Cham, 2017. P. 397–433.

Cline A.R., Skelley P.E., Kinnee S.A., Rooney-Latham S., Winterton S.L., Borkent C.J., Audisio P. Interactions between a sap beetle, sabal palm, scale insect, filamentous fungi and yeast, with discovery of potential antifungal compounds // PLoS One. 2014. V. 9. e89295.

Contour-Ansel D., Garnier-Sillam E., Lachaux M., Croci V. High performance liquid chromatography studies on the polysaccharides in the walls of the mounds of two species of termite in Senegal, *Cubitermes oculatus* and *Macrotermes subhyalinus*: their origin and contribution to structural stability // Biol. Fertil. Soils. 2000. V. 31. P. 508–516.

Ganter P.F. Yeast and invertebrate associations // Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts / Eds. Rosa C., Péter G. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. P. 303–370.

Gardes M., Bruns. ITS Primers with enhanced specificity for Basidiomycetes – Application to the identification of mycorrhizae and rusts // Mol. Ecol. 1993. V. 2. P. 113–118.

Guedegbe H.J., Miambi E., Pando A., Roman J., Houngnandan P., Rouland-Lefevre C. Occurrence of fungi in combs of fungus-growing termites (Isoptera: Termitidae, Macrotermitinae) // Mycol. Res. 2009. V. 113. P. 1039–1045.

Hammer T.J., Dickerson J.C., Fierer N. Evidence-based recommendations on storing and handling specimens for analyses of insect microbiota // PeerJ. 2015. V. 3. e1190.

<http://www.mycobank.org>.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

<https://www.r-project.org>.

Into P., Pontes A., Jacques N., Casaregola S., Limtong S., Sampaio J.P. *Papiliotrema plantarum* sp. nov., a novel tremellaceous sexual yeast species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 1937–1941.

Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.). The Yeasts: a Taxonomic Study. 5th ed. Elsevier, 2011. V. 2. 1335 p., V. 3. 2080 p.

- Landell M.F., Branda L.R., Barbosa A.C., Ramos J.P., Safar S.V.B., Gomes F.C.O., Sousa F.M.P., Morais P.B., Broetto L., Leoncini O., Ribeiro J.R., Fungsin B., Takashima M., Nakase T., Lee C.F., Vainstein M.H., Fell J.W., Scorzetti G., Vishniac H.S., Rosa C.A., Valente P. *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 1970–1977.
- Lee C.Y., Yap J., Ngee P., Jaal Z. Foraging colonies of a higher mound-building subterranean termite, *Globitermes sulphureus* (Haviland) in a Malaysia // Jap. J. Environ. Entomol. Zool. 2003. V. 14. P. 105–112.
- Liu X.-Z., Wang Q.-M., Göker M., Groenewald M., Kachalkin A.V., Lumbsch H.T., Millanes A.M., Wedin M., Yurkov A.M., Boekhout T., Bai F.-Y. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes // Studies in Mycology. 2015. V. 81. P. 85–147.
- Rodrigues A., Cable R.N., Mueller U.G., Bacci M., Jr., Pagnocca F.C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants // Antonie van Leeuwenhoek. 2009. V. 96. P. 331–342.
- Rosengauz R.B., Traniello J.F.A., Bulmer M.S. Ecology, behavior and evolution of disease resistance in termites // Biology of Termites: A Modern Synthesis / Eds. Bignell D.E., Roisin Y., Lo N. Dordrecht, Heidelberg, London, N.Y.: Springer, 2011. P. 165–191.
- Surussawadee J., Jindamorakot S., Nakase T., Lee C.-F., Limtong S. *Hannaella phyllophila* sp. nov., a basidiomycetous yeast species associated with plants in Thailand and Taiwan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 2135–2140.
- Surussawadee J., Khunnamwong P., Srisuk N., Limtong S. *Papiliotrema siamense* f.a., sp. nov., a yeast species isolated from plant leaves // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 3058–3062.
- Thanh V.N., Hai D.A., Lachance M.A. *Cryptococcus bestiolae* and *Cryptococcus dejecticola*, two new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha sinensis* Bradley // FEMS Yeast Res. 2006. V. 6. P. 298–304.
- Tokuoka K., Ishitani T., Goto S., Komagata K. Identification of yeasts isolated from high-sugar foods // J. Gen. Appl. Microbiol. 1985. V. 31. P. 411–427.
- Veivers P.C., Mühlemann R., Slaytor M., Leuthold R.H., Bignell, D.E. Digestion, diet and polyethism in two fungus-growing termites: *Macrotermes subhyalinus* Rambur and *M. michaelsoni* Sjøstedt // J. Insect Physiol. 1991. V. 37. P. 675–682.
- Wong N., Lee C.Y. Intra- and interspecific agonistic behavior of the subterranean termite *Microcerotermes crassus* (Isoptera: Termitidae) // J. Econ. Entomol. 2010. V. 103. P. 1754–1760.
- Yamada A., Inoue T., Wiwatwitaya D., Ohkuma M., Kudo T., Abe T., Sugimoto A. Carbon mineralization by termites in tropical forests, with emphasis on fungus combs // Ecol. Res. 2005. V. 20. P. 453–460.
- Yurkov A. Temporal and geographic patterns in yeast distribution // Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology / Eds. Buzzini P., Lachance M.A., Yurkov A. Springer, Cham, 2017. P. 101–130.
- Yurkov A., Guerreiro M.A., Sharma L., Carvalho C., Fonseca A. Multigene assessment of the species boundaries and sexual status of the basidiomycetous yeasts *Cryptococcus flavescens* and *C. terrestris* (Tremellales) // PLoS One. 2015. V. 10. e0126996.

## Properties of the Yeast Communities Associated with Termites of a Tropical Monsoon Forest (Cat Tien National Park, Vietnam)

A. I. Zueva<sup>1, \*</sup>, A. V. Kachalkin<sup>2, 3</sup>, I. A. Maksimova<sup>2</sup>, Nguen Van Tkhin<sup>4</sup>, and A. V. Tiunov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup>Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

<sup>4</sup>Russian-Vietnamese Tropical Research and Technological Center, Ho Chi Minh City, 650000 Vietnam

\*e-mail: aizueva.ecologist@gmail.com

Received February 25, 2021; revised March 12, 2021; accepted March 15, 2021

**Abstract**—Yeast populations was investigated for the following substrates associated with termitaries of five species occurring in the Cat Tien National Park (south Vietnam): nest walls, fungal gardens (if present), and termite gut and body surface, as well as for the litter and upper soil horizons near the termitaria. The physiological properties of the yeasts isolated from associations with termites were analyzed. The isolated fungi with yeast type of growth were assigned to 39 species, 10 of which have not been described at the time of this study. The yeast communities developing in termite guts and on their body surfaces exhibited low species diversity. The yeasts isolated from termite guts and body surfaces were characterized by a relatively broad spectrum of morphological and physiological properties (24 to 33 parameters out of the 34 ones in the standard description). The most common properties were the presence of mycelial or pseudomycelial structures, as well as ability to ferment glucose, use plant glycosides (salicin) and simple products of wood degradation (xylose and cellobiose) as growth substrates.

**Keywords:** yeasts termites, Cat Tien, Vietnam, monsoon tropical forest, soil invertebrates, xylophages, mycophages, spectrum of yeast morphophysiological properties



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ  
ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES DOBZHANSKII*

© 2021 г. Е. С. Наумова<sup>а</sup>, \*, Ч.-Ф. Ли<sup>б</sup>, Г. И. Наумов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117519 Россия

<sup>б</sup>Department of Applied Science, National Tsing Hua University of Education, Hsinchu, 30014 Taiwan

\*e-mail: lena\_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 03.03.2021 г.

После доработки 10.03.2021 г.

Принята к публикации 11.03.2021 г.

На материале штаммов различного экологического и географического происхождения изучен внутривидовой полиморфизм диких дрожжей *Kluyveromyces dobzhanskii* – ближайших родственников культурных молочных дрожжей *K. lactis* и *K. marxianus*. С помощью микросателлитного типирования, филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1/ITS2 и митохондриального гена *COX2* установлено, что вид *K. dobzhanskii* имеет сложный состав и представлен, по крайней мере, тремя географическими популяциями: североамериканской (включая типовую культуру CBS 2104), европейской и дальневосточной. Штаммы различного географического происхождения характеризуются уникальными нуклеотидными заменами в ITS1/ITS2-участке и митохондриальном гене *COX2*. У европейских штаммов обнаружена корреляция (GTG)<sub>5</sub>-профилей с источником выделения. Штаммы, изолированные в Испании из насекомых, имеют уникальные паттерны.

**Ключевые слова:** дрожжи *Kluyveromyces dobzhanskii*, микросателлитный маркер (GTG)<sub>5</sub>, филогенетический анализ, внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2, митохондриальный ген *COX2*

DOI: 10.31857/S0026365621040121

Дрожжи *Kluyveromyces* – второй по значимости после *Saccharomyces* объект фундаментальных и прикладных исследований. Они имеют большое биотехнологическое значение и используются для производства различных гетерологичных белков медицинского и пищевого значения, а также в качестве биологических агентов, подавляющих развитие вредных микроорганизмов, и продуцентов биоэтанола из лигноцеллюлозных отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности (Fonseca et al., 2008; Suzuki et al., 2014). В настоящее время род *Kluyveromyces* включает семь видов: наземные *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii*, а также морские *K. aestuarii*, *K. nonfermentas* и *K. siamensis* (Kurtzman, 2003, Lachance, 2011). Дрожжи *K. lactis* и *K. marxianus* – постоянные компоненты различных молочнокислых продуктов и могут использоваться в качестве пробиотических микроорганизмов (Massaferrì et al., 2012; Romanin et al., 2016; Наумова и соавт., 2017). Их ближайшим филогенетическим родственником являются дикие дрожжи *K. dobzhanskii*, которые распространены во многих частях света и выделяются исключительно из природных источников: растений, насекомых, почвы, шляпочных грибов

и др. Эти дрожжи представляют собой удобную модель для популяционно-генетических исследований. В отличие от молочных штаммов *Kluyveromyces*, дрожжи *K. dobzhanskii* практически не изучены. Имеющиеся в литературе сведения по электрофорезу изоферментов и ПДРФ-анализу митохондриальной ДНК отдельных штаммов указывают на возможную генетическую гетерогенность вида *K. dobzhanskii* (Sidenberg, Lachance, 1986; Belloch et al., 1997).

Современная классификация аскомицетовых дрожжей основана на филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей ряда молекулярных маркеров (баркодов), прежде всего домена D1/D2 гена 26S рРНК и 5.8S–ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2 (Kurtzman, Robnett, 1998; Kurtzman, 2003). ITS-район характеризуется значительной межвидовой дивергенцией, его длина постоянна у штаммов одного и того же вида, а последовательность может варьировать (James et al., 1998). Поэтому этот участок рДНК используется не только для разделения близкородственных видов, но и для изучения генетической изменчивости дрожжей на популяци-

онном уровне. Используемый в современной таксономии дрожжей митохондриальный ген *COX2* обладает значительной вариабельностью и больше подходит для дифференциации отдельных штаммов, чем для разграничения видов. На ряде грибных таксонов отмечено, что видовая филогения, построенная на основании анализа ядерных и митохондриальных генов, может не совпадать (Schoch et al., 2012; Vu et al., 2016).

Микросателлитные маркеры имеют множественную локализацию в геноме дрожжей, что позволяет сравнивать большое количество полиморфных локусов. На дрожжах *Saccharomyces* было показано, что с помощью микросателлитного маркера (GTG)<sub>5</sub> можно дифференцировать отдельные виды этого рода, а также идентифицировать отдельные штаммы (Baleiras Couto et al., 1996; Naumova et al., 2000, 2011). Ранее мы использовали этот маркер для изучения внутривидового полиморфизма дрожжей *K. lactis* (Наумова и соавт., 2005).

Целью настоящей работы было изучение молекулярного полиморфизма дрожжей *K. dozhzhanskii* на материале штаммов различного экологического и географического происхождения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы и среды.** Используемые в работе штаммы и их происхождение представлены в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°C на полной среде YPD (г/л): бакто-агар (“Difco”, США) – 20; глюкоза (“Merck”, Германия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”) – 10; бакто-пептон (“Difco”) – 20.

**Полимеразную цепную реакцию** осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Дрожжевую ДНК выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (“Fermentas”, Литва). Для амплификации домена D1/D2 гена 26S рРНК и 5.8S-ITS-фрагмента (ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2) использовали стандартные праймеры (Kurtzman, Robnett, 2003), а для амплификации митохондриального гена *COX2* использовали праймеры COX23 (5'-GGTATTTTGAATTCATGA-3') и COX25 (5'-ATTATTTGTTTCGTTTAAATCA-3') (Belloch et al., 2000). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ каждого дНТФ, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 20–200 нг ДНК. Начальную денатурацию осуществляли при 94°C в течение 3 мин, затем 30 циклов в следующем режиме: денатурация при 94°C, 45 с; отжиг праймеров при 52°C, 30 с; синтез ДНК при 72°C, 120 с; конечная достройка при 72°C, 10 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5× ТВЕ буфере (45 мМ трис,

10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота; рН 8.0) в течение 2 ч.

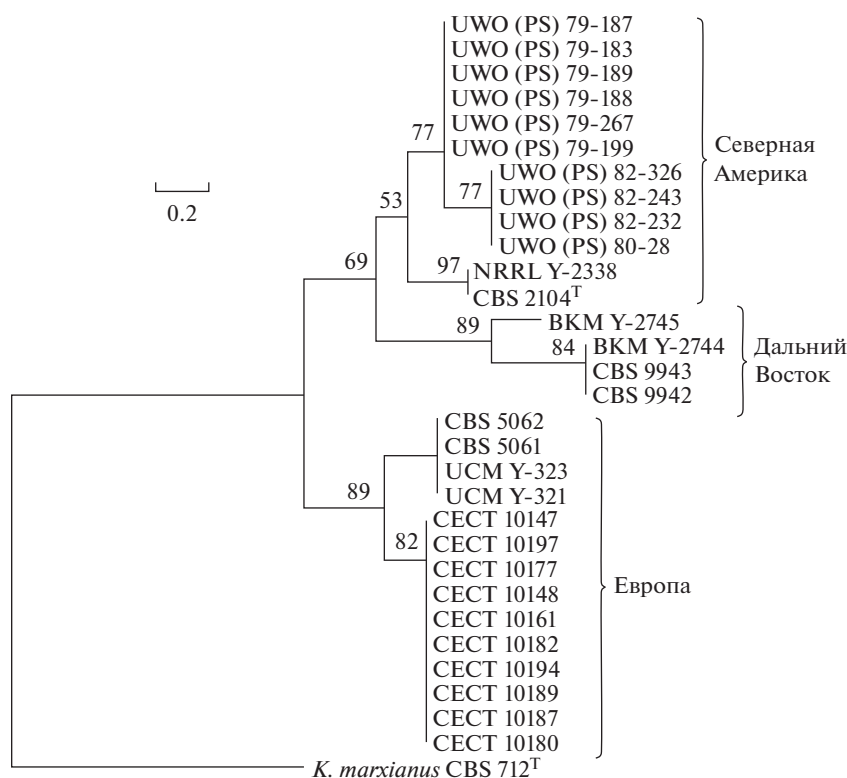
Амплификацию ДНК с микросателлитным праймером (GTG)<sub>5</sub> проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.3 мМ дНТФ, 1.25 ед. акт. *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 30 пмоль праймера, 20–200 нг анализируемой геномной ДНК. ПЦР (30 циклов) осуществляли в режиме: денатурация ДНК при 94°C, 30 с; отжиг праймера при 52°C, 30 с; синтез ДНК при 72°C, 1 мин. Разделение амплифицированной ДНК проводили в 1.6%-ном агарозном геле при 55–60 В в 0.5× ТВЕ в течение 3.5–4 ч.

Гели окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США).

**Секвенирование.** Амплифицированные фрагменты домена D1/D2, 5.8S-ITS-фрагмента и гена *COX2* элюировали из геля с помощью набора Silica Beads DNA Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Нуклеотидные последовательности домена D1/D2, 5.8S-ITS-участка и гена *COX2* определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США).

**Филогенетический анализ.** Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программы SeqMan package (“DNA Star Inc.”, США). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями проводили в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с помощью программы BLAST. Множественное выравнивание изученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программы BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2013). В качестве внешней группы использовали типовую культуру дрожжей *Kluveromyces marxianus* CBS 712. Индексы бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, определяли для 1000 псевдореплик.

Филогенетические связи между штаммами *K. dozhzhanskii* устанавливали также путем сравнения профилей ПЦР-продуктов, амплифицированных с микросателлитным праймером (GTG)<sub>5</sub>. Дендрограмму, основанную на матрице различий по (GTG)<sub>5</sub>-профилям, строили с помощью программы Neighbor-Joining из компьютерного пакета TREECON (van der Peer, de Wachter, 1994). Индексы бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, определяли для 100



**Рис. 1.** Дендрограмма родства штаммов *Kluyveromyces dobzhanskii*, основанная на матрице различий по ПЦР-профилям с микросателлитным праймером (GTG)<sub>5</sub>. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Приводятся значения бутстрепа >50%. Т – типовая культура.

псевдореплик. В качестве внешней группы использовали типовую культуру дрожжей *K. marxianus* CBS 712.

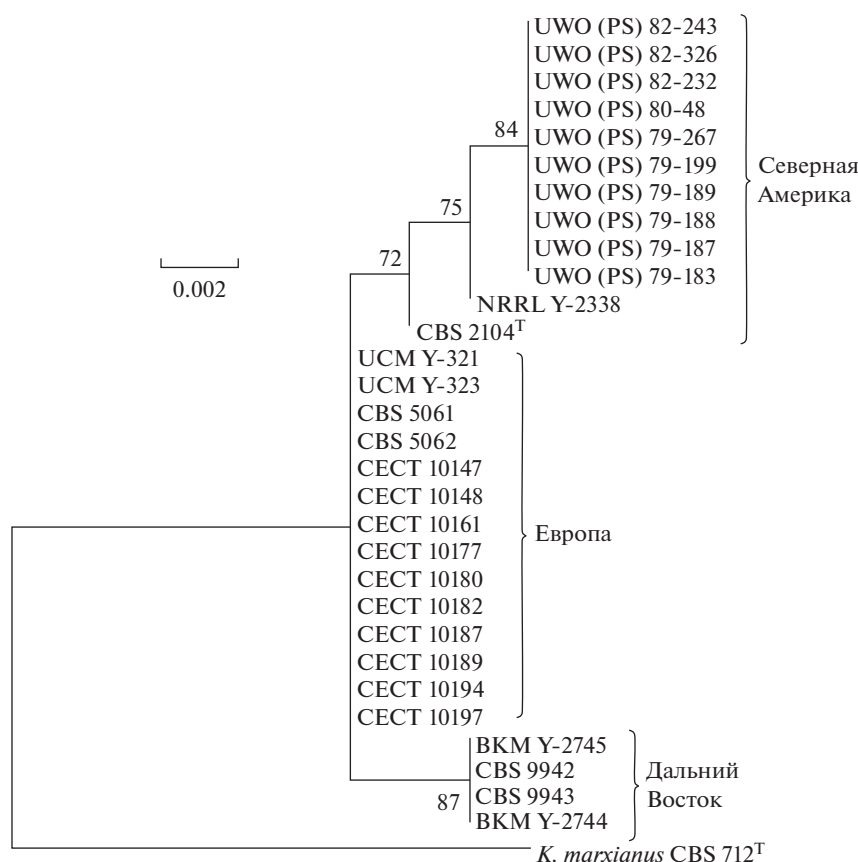
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектом исследования служили 29 штаммов *Kluyveromyces*, выделенные из различных природных источников в Европе, Северной Америке и на Дальнем Востоке России (табл. 1). Штаммы получены из отечественных и международных коллекций. Согласно нуклеотидным последовательностям домена D1/D2 26S рДНК, все изученные штаммы относятся к виду *K. dobzhanskii*. В качестве контроля была использована типовая культура CBS 2104, выделенная из *Drosophila pseudoobscura* в США. Генетическое родства штаммов *K. dobzhanskii* различного происхождения изучали с помощью микросателлитного типирования и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS участка и митохондриального гена *COX2*.

**ПЦР с микросателлитным праймером (GTG)<sub>5</sub>.** ПЦР-профили изученных штаммов *K. dobzhanskii* значительно отличались от паттерна тест-штамма *K. marxianus* CBS 712 (рисунок не приводится). На основании полученных (GTG)<sub>5</sub>-профилей

была построена дендрограмма (рис. 1). Штаммы *K. dobzhanskii* сформировали отдельный кластер относительно тест-штамма *K. marxianus* CBS 712. Внутри этого кластера выделяются три четкие группы, объединяющие штаммы с наиболее похожими паттернами. Внутри каждой группы обнаружена вариация по ПЦР-профилям, проявляющаяся в наличии или отсутствии отдельных фрагментов.

Первую группу сформировали североамериканские штаммы. Внутри этой группы выделяются три подгруппы. Первая включает типовую культуру CBS 2104 и штамм NRRL Y-2338 (США), а остальные две подгруппы представлены канадскими изолятами. Следует отметить, что штаммы, выделенные из галлов *Prunus virginiana* в 1979 г., отличаются по (GTG)<sub>5</sub>-паттернам от остальных канадских штаммов. Европейские штаммы объединились во вторую группу, при этом изолированные из различных насекомых в Испании штаммы отличались по ПЦР-профилям от штаммов, выделенных с поверхности грибов во Франции (CBS 5061, CBS 5062) и листьев дуба на Украине (UCM Y-321, UCM Y-323). Дальневосточные изоляты CBS 9942, CBS 9943, ВКМ Y-2744 и ВКМ Y-2745 сформировали третью группу (рис. 1).



**Рис. 2.** Филогенетическое родство штаммов *Kluyveromyces dobzhanskii* различного географического происхождения, основанное на анализе нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента рДНК. Приводятся значения бутстрапа >50%. Шкала соответствует 2 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Т – типовая культура.

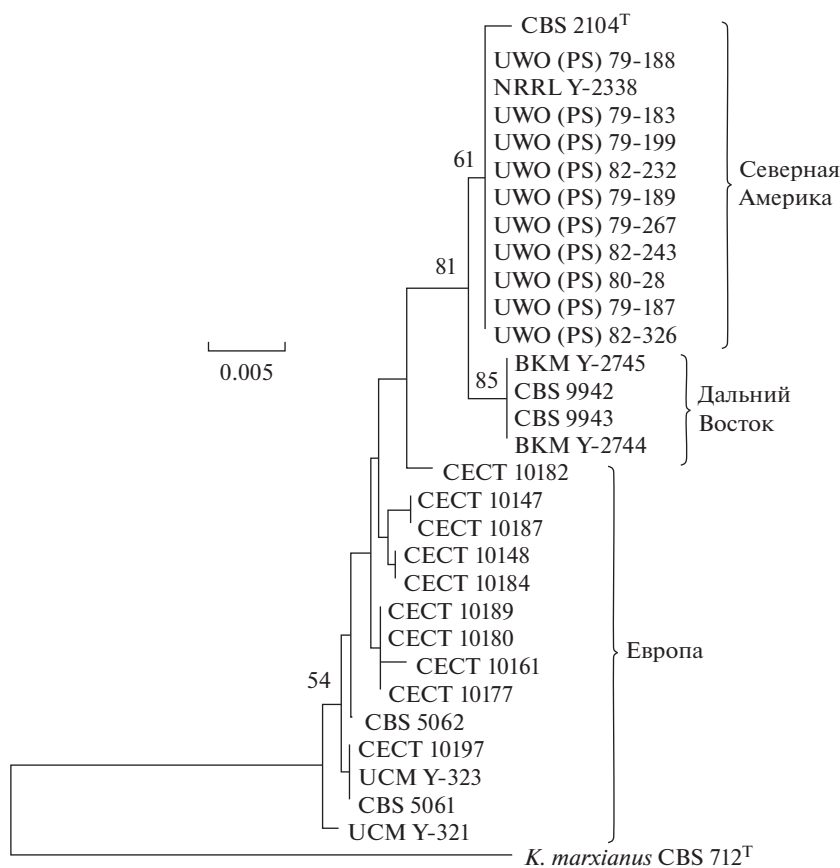
Таким образом, обнаружена корреляция (GTG)<sub>5</sub>-паттернов с географическим происхождением штаммов, а для европейских штаммов и с источником выделения.

**Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента рДНК.** Мы провели секвенирование 5.8S-ITS-района у 26 изученных штаммов. У трех европейских штаммов (СЕСТ 10177, СЕСТ 10180, СЕСТ 10187) нуклеотидные последовательности этого участка рДНК были определены ранее (Belloch et al., 2002). Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с последовательностями 5.8S-ITS-участка типовой культуры *K. dobzhanskii* CBS 2104, а также тест-штамма *K. marxianus* CBS 712.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей было построено филогенетическое древо, на котором выделяются три группы штаммов (рис. 2). Первая группа образована североамериканскими штаммами. Десять канадских штаммов имеют идентичные нуклеотидные последовательности 5.8S-ITS-участка, которые отличаются одной заменой от штамма NRRL Y-2338 и

двумя заменами от CBS 2104, соответственно, в 69 и 199 позициях (нумерация приводится по последовательности типовой культуры CBS 2104). Вторую группу сформировали 14 европейских штаммов, имеющих идентичные 5.8S-ITS-последовательности. Дальневосточные штаммы CBS 9942, CBS 9943, VKM Y-2745 и VKM Y-2744, также имеющие идентичные последовательности, вошли в третью группу. Различия по 5.8S-ITS-последовательностям между штаммами трех групп составили от трех до пяти нуклеотидных замен. В тоже время, 5.8S-ITS-последовательности штаммов *K. dobzhanskii* и типовой культуры *K. marxianus* CBS 712 различаются более чем 20 нуклеотидными заменами.

Штаммы различного географического происхождения характеризуются уникальными нуклеотидными заменами. В отличие от североамериканских штаммов, у всех европейских и дальневосточных штаммов имеется замена нуклеотида G на A в 41 позиции. Дальневосточные штаммы характеризуются двумя дополнительными транзициями G–A в 38 и 564 позициях.



**Рис. 3.** Филогенетическое родство штаммов *Kluveromyces dobzhanskii* различного географического происхождения, основанное на анализе нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COX2*. Приводятся значения бутстрепа >50%. Шкала соответствует 5 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Т – типовая культура.

**Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COX2*.** У 29 изученных штаммов была определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена *COX2* размером 585 п.н. Полученные последовательности сравнили с последовательностями гена *COX2* типовых культур *K. dobzhanskii* CBS 2104 и *K. marxianus* CBS 712, имеющимися в GenBank. На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей было построено филогенетическое древо (рис. 3).

Изученные штаммы *K. dobzhanskii* разделились на три кластера. В первый кластер вошли североамериканские изоляты. Одиннадцать штаммов имели идентичные последовательности гена *COX2* и отличались от типовой культуры CBS 2104 одной нуклеотидной заменой. Второй кластер образовали четыре дальневосточных штамма, имеющие идентичные последовательности. Европейские штаммы сформировали третий кластер. Этот кластер является наиболее гетерогенным, входящие в него 14 европейских штаммов различаются 2–7

нуклеотидными заменами. Несмотря на указанные различия, все 14 европейских штаммов характеризуются двумя уникальными заменами: трансверсией Т–А и транзицией С–Т соответственно, в 177 и 182 позициях (нумерация приводится по последовательности типовой культуры CBS 2104). Дальневосточные штаммы имеют уникальную замену С–Т в пятой позиции. Различия в последовательностях гена *COX2* европейских и остальных штаммов *K. dobzhanskii* составили от 8 до 11 замен, а различия с последовательностью этого гена типовой культуры *K. marxianus* CBS 712 превышали 28 нуклеотидов.

Полученные данные свидетельствуют о значительном полиморфизме дрожжей *K. dobzhanskii*, связанным с географическим происхождением штаммов. Результаты, полученные с помощью микросателлитного типирования, филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1/ITS2 и митохондриального гена *COX2*, хорошо согласуются. По всем трем молекулярным маркерам изу-

**Таблица 1.** Изученные штаммы дрожжей *Kluyveromyces dobzhanskii* и их происхождение

Штамм	Источник выделения	Место выделения
CBS 2104 (T)	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	США
СЕСТ 10147	<i>Euoxa segetum</i>	Испания
СЕСТ 10148	<i>Noctua pronuba</i>	Испания
СЕСТ 10161	<i>Trigonophora meticulosa</i>	Испания
СЕСТ 10177	<i>Noctua pronuba</i>	Испания
СЕСТ 10180	<i>Taenicompa gotica</i>	Испания
СЕСТ 10182	<i>Noctua pronuba</i>	Испания
СЕСТ 10187	<i>Synvaleria jaspidea</i>	Испания
СЕСТ 10189	<i>Synvaleria jaspidea</i>	Испания
СЕСТ 10194	<i>Antitype flavicincta</i>	Испания
СЕСТ 10197	<i>Rhizotype venusta</i>	Испания
CBS 5061	<i>Hymenochaete rubiginosa</i>	Франция
CBS 5062	<i>Fistulina hepatica</i>	Франция
NRRL Y-2338	Папоротник	США
UCM Y-321	Листья, <i>Quercus</i> sp.	Украина
UCM Y-323	Листья, <i>Quercus</i> sp.	Украина
UWO (PS) 79-183	Галл, <i>Prunus virginiana</i>	Мельбурн, Канада
UWO (PS) 79-187	Галл, <i>Prunus virginiana</i>	Мельбурн, Канада
UWO (PS) 79-188	Галл, <i>Prunus virginiana</i>	Мельбурн, Канада
UWO (PS) 79-189	Галл, <i>Prunus virginiana</i>	Мельбурн, Канада
UWO (PS) 79-199	Галл, <i>Prunus virginiana</i>	Пинери, Канада
UWO (PS) 79-267	Галл, <i>Prunus virginiana</i>	Пинери, Канада
UWO (PS) 80-28	Галл, <i>Prunus virginiana</i>	Пинери, Канада
UWO (PS) 82-232	<i>Drosophila</i> sp.	Пинери, Канада
UWO (PS) 82-243	<i>Drosophila</i> sp.	Пинери, Канада
UWO (PS) 82-326	<i>Drosophila</i> sp.	Пинери, Канада
CBS 9942	<i>Chloranthus japonicus</i>	Владивосток, Россия
CBS 9943	<i>Actinida arguta</i>	Владивосток, Россия
ВКМ Y-2744	<i>Kalopanoax septemlobus</i>	Владивосток, Россия
ВКМ Y-2745	<i>Schisandra chinensis</i>	Владивосток, Россия

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Пушино, Россия); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia (Валенсия, Испания); NRRL – USDA-ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Перория, США; UCM – Украинская коллекция микроорганизмов, Институт микробиологии и вирусологии НАН, Киев, Украина; UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario (Онтарио, Канада).

ченые штаммы *K. dobzhanskii* разделились на четкие группы, соответствующие трем географическим популяциям: североамериканской, европейской и дальневосточной. Обнаружена корреляция (GTG)<sub>5</sub>-профилей европейских штаммов с источником их выделения: изоляты из насекомых имеют уникальные паттерны. Европейская популя-

ция также гетерогенна по нуклеотидным последовательностям митохондриального гена *COX2*. В пределах каждой из трех географических популяций штаммы имели практически идентичные 5.8S-ITS-последовательности, тогда как штаммы из разных популяций отличались по последовательностям этого участка рДНК. У штаммов, вы-

деленных в Северной Америке и Европе, замены обнаружены в ITS1, тогда как ITS2-последовательности у них были идентичными. Напротив, у дальневосточных штаммов замены выявлены также в ITS2-участке. Все обнаруженные нуклеотидные замены являются уникальными и коррелируют с географическим происхождением штаммов.

Следует отметить, что в отечественных и международных коллекциях имеется ограниченное количество дрожжей *K. dobzhanskii*, поэтому выделение новых штаммов этого вида из природы в Дальневосточной Азии и других регионах мира позволит более полно изучить внутривидовую структуру этих дрожжей и обнаружить новые географические популяции.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было поддержано совместным российско-тайваньским грантом РФФИ (№ 18-54-52002 МНТ\_а) и MOST (№ 107-2923-B-007-001-MY3).

#### 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

- Наумова Е.С., Сухотина Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярные маркеры, дифференцирующие молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* от их ближайших диких родственников – европейской популяции “krassilnikovii” // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 387–393.
- Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. Molecular markers for differentiation between the closely related dairy yeast *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and wild *Kluyveromyces lactis* strains from the European “krassilnikovii” population // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 329–335.
- Наумова Е.С., Садыкова А.Ж., Михайлова Ю.В., Наумов Г.И. Полиморфизм лактозных генов молочных дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, потенциальных пробиотических микроорганизмов // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 335–343.
- Naumova E.S., Sadykova A.Zh., Michailova Yu.V., Naumov G.I. Polymorphism of lactose genes in the dairy yeasts *Kluyveromyces marxianus*, potential probiotic microorganisms // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 363–369.
- Baleiras Couto M.M., Eijmsa B., Hofstra H., Huis in't Veld J.H., van der Vossen J.M. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 41–46.
- Belloch C., Barrio E., Uruburu F., Garcia M.D., Querol A. Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis // Syst. Appl. Microbiol. 1997. V. 20. P. 397–408.
- Belloch C., Querol A., Garcia M.D., Barrio E. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene // Int. J. System. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 405–416.
- Belloch C., Fernandes-Espinar T., Querol A., Garcia M.D., Barrio E. An analysis of inter- and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon // Yeast. 2002. V. 19. P. 257–268.
- Foncela G.G., Heizle E., Wittmann C., Gormbert A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 79. P. 339–354.
- James S.A., Collins M.D., Roberts I.N. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. P. 189–194.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Kurtzman C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygotorulosporea* // FEMS Yeast Res. 2003. V. 4. P. 233–245.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V. 73. P. 331–371.
- Lachance M.-A. *Kluyveromyces* van der Walt (1971) // The Yeasts. A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam: Elsevier, 2011. P. 471–482.
- Maccaferri S., Klinder A., Brigidi P., Cavina P., Costabile A. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in CACO-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an *in vitro* colonic model system // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 956–964.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Molina F.I. Genetic variation among European strains of *Saccharomyces paradoxus*: results from DNA fingerprinting // Syst. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 86–92.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Michailova Yu.V., Martynenko N.N., Masneuf-Pomarède I. Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes // Res. Microbiol. 2011. V. 162. P. 204–213.
- Romanin D.E., Llopis S., Genovés S., Martorell P., Ramón V.D., Garrote G.L., Rumbo M.I. Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in *in vivo* models // Beneficial Microbes. 2016. V. 7. № 4. P. 83–93.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 6241–6246.



Sidenberg D.G., Lachance M.-A. Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* populations and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. P. 94–102.

Suzuki T., Hoshino T., Matsushika A. Draft genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* strain DMB1, isolated from sugarcane bagasse hydrolysate // Genome Announc. 2014. V. 2. e00733–14.

Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comp. Appl. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.

Vu D., Groenewald M., Szo'ke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkleij G.J., Crous P.W., Boekhout T., Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.

## Molecular Genetic Polymorphism of the Yeast *Kluyveromyces dobzhanskii*

E. S. Naumova<sup>1,\*</sup>, Ch.-Fu Lee<sup>2</sup>, and G. I. Naumov<sup>1,†</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Applied Science, National Tsing Hua University of Education, Hsinchu, 30014 Taiwan

\*e-mail: lena\_naumova@yahoo.com

Received March 3, 2021; revised March 10, 2021; accepted March 11, 2021

**Abstract**—Based on strains of various ecological and geographical origin, we studied intraspecific polymorphism of the wild yeast *Kluyveromyces dobzhanskii*, the closest relative of the cultured dairy yeasts *K. lactis* and *K. marxianus*. Using microsatellite typing, phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the ITS1/ITS2 internal transcribed spacers and of the mitochondrial gene *COX2*, we found the species *K. dobzhanskii* to be of complex composition, consisting of at least three geographical populations: North American (including the type culture CBS 2104), European, and Far Eastern. Strains of different geographic origin were characterized by unique nucleotide substitutions in the ITS1/ITS2 region and in the mitochondrial *COX2* gene. In European strains, a correlation was revealed between the (GTG)<sub>5</sub> profiles and the source of isolation. The strains isolated from insects in Spain had unique patterns.

**Keywords:** *Kluyveromyces dobzhanskii*, microsatellite marker (GTG)<sub>5</sub>, phylogenetic analysis, internal transcribed spacers ITS1 and ITS2, *COX2* mitochondrial gene

## МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО ОТХОДОВ ПТИЦЕФАБРИКИ И ЕГО РОЛЬ В ОБРАЗОВАНИИ СЕРОВОДОРОДА

© 2021 г. Е. В. Груздев<sup>а, \*</sup>, Е. А. Латыголец<sup>б</sup>, А. В. Белецкий<sup>а</sup>, М. А. Григорьев<sup>б</sup>, А. В. Марданов<sup>а</sup>,  
М. К. Кадырбаев<sup>б</sup>, О. П. Иккерт<sup>б</sup>, О. В. Карначук<sup>б</sup>, Н. В. Равин<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>б</sup>Лаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: gruevg@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.02.2021 г.

После доработки 12.03.2021 г.

Принята к публикации 15.03.2021 г.

Микробиота отходов птицеводства остается практически неизученной, несмотря на ее ведущую роль в образовании летучих одорантов и неприятного запаха. Одним из основных компонентов запаха является сероводород, который может образовываться в результате микробной сульфатредукции. Исследован состав микробного сообщества отходов крупной птицефабрики “Межениновская”, расположенной на расстоянии 15 км от г. Томска. Методом профилирования 16S рРНК в микробном сообществе обнаружены представители сульфатредуцирующих *Desulfovibrionaceae*. Их доля в сообществе возрастала при инкубации отходов в среде с сульфатом и лактатом, при этом увеличивалась и продукция сероводорода. Источником сульфата в отходах может являться гипс, а также кормовые добавки, сформулированные в виде сульфатов, например, лизин сульфат.

**Ключевые слова:** микробиота отходов птицеводства, сероводород, сульфатредукция, *Desulfovibrio*

**DOI:** 10.31857/S0026365621040042

Образование летучих соединений с резким запахом – известная проблема производства мяса птицы. Основным источником запаха являются одоранты, включающие летучие органические соединения и неорганические соединения – аммоний, сероводород и восстановленные соединения серы (Traube et al., 2010). Сероводород имеет низкий порог чувствительности, 0.007 мг/м<sup>3</sup>, и служит одним из основных компонентов неприятного запаха отходов сельскохозяйственных животных (Traube et al., 2011). В концентрации свыше 0.1% в воздухе сероводород быстро вызывает тяжелое отравление с летальным исходом. Продолжительное воздействие низких концентраций H<sub>2</sub>S может вызывать нейроповеденческие дисфункции (Fiedler et al., 2008).

В биотопах, содержащих сульфат, при дефиците кислорода диссимилиационная сульфатредукция является основным источником образования сероводорода. При производстве мяса птицы окисленные формы серы могут поступать с кормовыми добавками, часто формулируемыми в виде сульфатов. Нерастворимый сульфат кальция, гипс, используют как составной компонент подстилки для впитывания влаги. Нам не известно систематических исследований присутствия сульфатредуцирующих прокариот в отходах птицеводства. Недавнее

исследование продемонстрировало, что диссимилиационное образование H<sub>2</sub>S является важным процессом в слепой кишке кур-несушек (Huang et al., 2019). Авторы сообщают, что содержание *Desulfovibrio*, *Mailhella*, *Bilophila* и *Lawsonia* в слепой кишке коррелировало с образованием H<sub>2</sub>S. Основываясь на этом факте, было сделано заключение, что именно диссимилиационная сульфатредукция, а не разложение серосодержащих аминокислот, вносят основной вклад в образование сероводорода в кишечнике кур.

Основным источником одорантов при производстве мяса птицы являются отходы, представляющие смесь помета птицы, подстилки, перьев, остатков корма и воды (Wadud et al., 2012). Наиболее распространенный способ утилизации отходов представляет их компостирование путем выдерживания в специальных хранилищах. При компостировании происходит частичное обеззараживание отходов от патогенов человека и животных, после чего полученный компост используют в качестве органического удобрения для выращивания растений (Dunlop et al., 2016). Места складирования отходов, так называемые помехохранилища, являются основным источником неприятного запаха. До сих пор микробиота отходов производства птицы и ее роль в производстве летучих соедине-

ний остается практически неизученной (Dunlop et al., 2016).

Целью настоящего исследования являлся анализ микробного сообщества отходов производства птицы, накапливаемого в помехранилище птицефабрики “Межениновская”, расположенного в непосредственной близости (около 15 км) от областного центра, города Томска. В летнее время интенсивный запах, образуемый в районе птицефабрики, является предметом активных общественных дискуссий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Отбор проб, полевые измерения, минералогический и элементный анализ.** Пробы отходов в помехранилище были отобраны 12 июля 2019 г. Концентрацию  $H_2S$  в месте отбора пробы для анализа измеряли в разные сезоны года, с периодичностью около одного раза в месяц с использованием переносного газоанализатора ОКА-Т (“Информ-аналитика”, Россия) с электрохимическим сенсором (погрешность инструмента составляет  $\pm 25\%$ ). Измерения не проводили в период снежного покрова, который в Томске длится с начала ноября до конца марта. Минералогический состав отходов, высушенных на воздухе, определяли с использованием дифрактометра Shimadzu XRD-6000 как описано ранее (Ikkert et al., 2013). Для определения элементного состава использовали сканирующий электронный микроскоп, совмещенный с рентгеновской спектроскопией с использованием микроскопа PhilipsSEM 515 и спектрометр EDAXInc (“Mahwan”, США).

**Эксперименты с микрокосмами.** В сыровоточные бутылки объемом 500 мл вносили 300 мл отходов помехранилища и 200 мл искусственной среды. Среда имела следующий состав (в г/л):  $KH_2PO_4$  – 0,2,  $NH_4Cl$  – 0,25,  $NaCl$  – 1,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,4,  $KCl$  – 0,5, 0,113 –  $CaCl_2$ . В экспериментальные микрокосмы вносили сульфат (28 мМ в виде  $Na_2SO_4$ ) и лактат (18 мМ) вместе с сульфатом (28 мМ). Микрокосмы инкубировали в темноте при температуре 20°C в течение 15 сут. Контрольный микрокосм инкубировали в тех же условиях, но без внесения добавок. Во время инкубации микрокосмов контролировали содержание сероводорода.

**Характеристика состава микробных сообществ по генам 16S рРНК.** В конце инкубации микрокосмов 1 мл осадка использовали для выделения ДНК с помощью DNeasy PowerMax SoilKit (“Qiagen”, Hilden, Германия). ПЦР-фрагменты были получены с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGGGDBGCWSCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTHTCTAAT-3'), баркодированы с помощью NexteraXT IndexKitv.2 (“Illumina”, США) и очищены с использованием

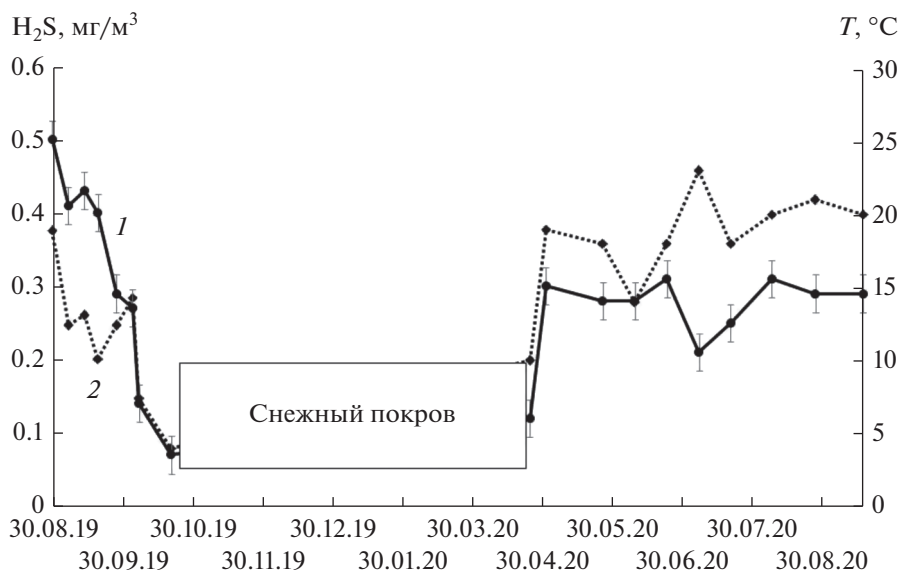
AgencourtAM Purebeads (“Beckman Coulter”, Brea, CA, США). Затем ПЦР фрагменты были секвенированы на Illumina MiSeq (чтения  $2 \times 300$  нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Полученные последовательности (26983 шт. для микрокосма без сульфата, 37516 шт. для микрокосма с сульфатом без лактата и 25911 шт. для микрокосма с сульфатом и лактатом) были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные чтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации с использованием алгоритма Usearch. Таксономическая идентификация была выполнена по базе SILVA v.132 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Содержание сероводорода в воздухе, минералогический и элементный анализ отходов.** Концентрации сероводорода в воздухе возле помехранилища в период измерений колебалась от 0,065 (в конце октября) до 0,5 (в конце августа) мг/м<sup>3</sup> (рис. 1). Это содержание значительно превышает предельно допустимую концентрацию, 0,008 мг/м<sup>3</sup>, установленную в Российской Федерации для жилых районов. Содержание сероводорода в воздухе возле помехранилища закономерно коррелировало с температурой воздуха, подтверждая биологическую природу  $H_2S$ .

Минералогический состав отходов показал присутствие нерастворимого сульфата кальция, гипса,  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  (рис. 2). Также была обнаружена кристаллическая сера и карбонаты – кальцит  $CaCO_3$  и анкерит  $Ca(Fe, Mg, Mn)(CO_3)_2$ . Элементный анализ подтвердил значительное присутствие кальция и серы. Таким образом, в отходах присутствовали возможные акцепторы электронов для сульфатредукции и сероредукции. Многие сульфатредуцирующие бактерии способны восстанавливать сульфат гипса фактически с такой же скоростью, как растворимый сульфат (Karnachuk et al., 2002).

**Состав микробных сообществ микрокосмов.** Предварительные исследования состава микробного сообщества профилированием гена 16S рРНК не выявили организмов с известной способностью к диссимиляционной сульфатредукции. Основываясь на том факте, что низкое содержание сульфата и доноров электронов могут лимитировать численность сульфатредукторов в отходах, были предприняты попытки обнаружить эту функциональную группу путем стимулирования процесса в микрокосмах с добавлением сульфата и лактата –



**Рис. 1.** Изменение концентрации сероводорода (1) и температура воздуха (2) возле помехохранилища фабрики «Межнинская». Стандартное отклонение рассчитано из трех измерений.

модельных субстратов для диссимиляционных сульфатредукторов.

Микрокосмы инокулировали отходами из помехохранилища, в экспериментальные микрокосмы вносили лактат вместе с сульфатом или только сульфат, микрокосм без добавок использовали как контрольный. По окончании 15-сут инкубации микрокосмов концентрация H<sub>2</sub>S составляла 35 мг/л в микрокосме с сульфатом и лактатом, 26 мг/л в микрокосме с сульфатом и 16 мг/л в контроле без добавок.

Состав микробных сообществ микрокосмов определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рНК. Во всех трех микрокосмах доминирующими группами были *Bacteroidetes* (34–44% последовательностей генов 16S рНК), *Firmicutes* (29–36%) и *Gammaproteobacteria* (9–12%) (рис. 3). В основном это были типичные представители микробиома кишечника птиц: семейства *Bacteroidaceae* и *Prevotellaceae* среди *Bacteroidetes*, *Acidaminococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae* среди *Firmicutes*.

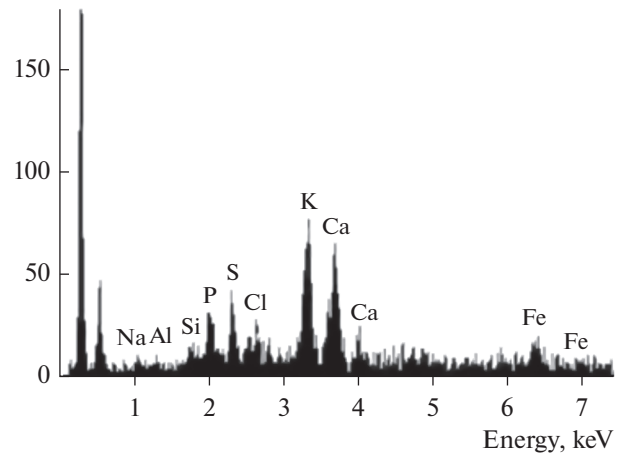
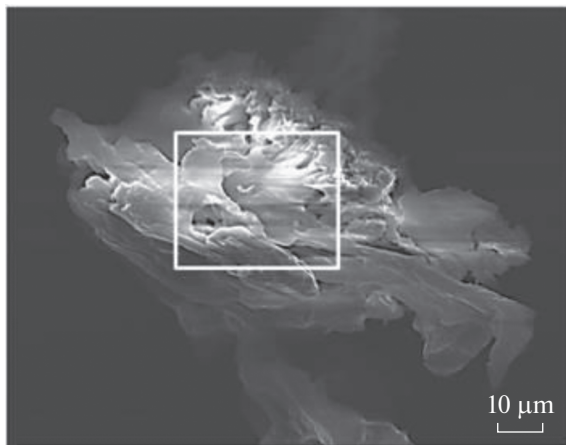
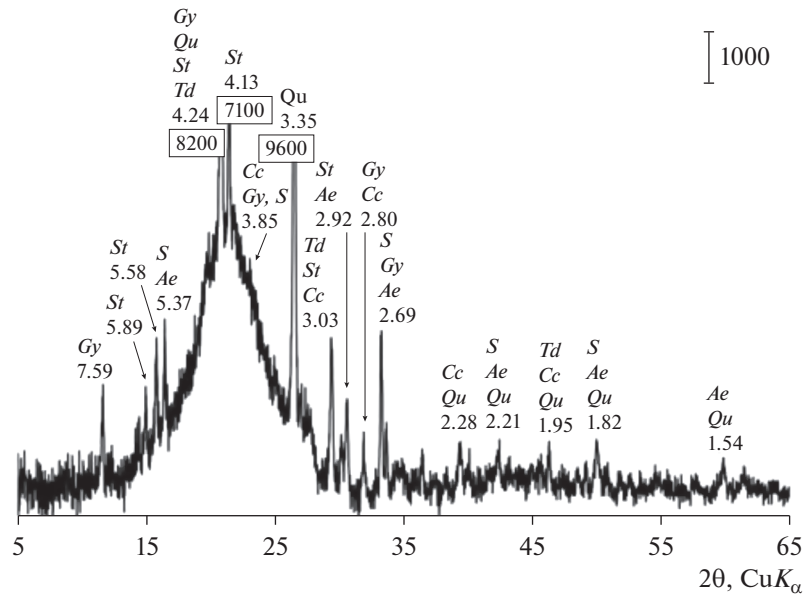
Археи, в основном метилотрофные метаногены порядка *Methanomassiliicoccales*, составляли 18–19% сообщества в контроле и в микрокосме с сульфатом. В микрокосме с сульфатом и лактатом их доля снижалась до 8%, что может быть обусловлено конкуренцией с сульфатредукторами за низкомолекулярные доноры электронов.

Из числа известных сульфатредукторов в микрокосмах были обнаружены дельтапротеобактерии семейства *Desulfovibrionaceae*. Их доли в контрольном микрокосме и в микрокосме с сульфатом со-

ставляли 0.43 и 0.37% соответственно, а в присутствии сульфата и лактата она возрастала до 1.0%. *Desulfovibrionaceae* были представлены двумя ОТЕ, относящимися к родам *Bilophila* и *Desulfovibrio*, причем последние составляли более 90%. Эти два рода были обнаружены ранее в кишечнике кур-несушек (Huang et al., 2019), увеличение их численности в присутствии сульфата и лактата согласуется с предположением об их роли в образовании сероводорода.

В составе микробного сообщества также присутствовали бактерии, близкие к роду *Tissierella*. Эта группа образует сероводород из аминокислот за счет ферментов цистеинсинтазы (CysK) и цистеиндисульфгидразы (CdsH) (Vukhtiyarova et al., 2019). *Tissierella* spp., выделенные из фекалий человека (Ikkert et al., 2013) и с поверхности медных монет, образовывали до 30 мг H<sub>2</sub>S на литр среды. *Tissierellaceae* составляли менее 1% сообщества, их доля не возрастала в микрокосмах с сульфатом.

**Сульфат-редукция как вероятный источник сероводорода.** Таким образом, предварительный анализ микробного сообщества указывает, что вероятным источником сероводорода, образуемого в отходах помехохранилища, является сульфатредукция, осуществляемая *Desulfovibrionaceae* — представителями кишечной микрофлоры кур. В присутствии гипса, а возможно и других источников сульфата (например, сульфата лизина, используемого в кормовых добавках), и низкомолекулярных органических соединений, образуемых ферментативными микроорганизмами филумов *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, эти бактерии могут развиваться и образовывать значительные количе-



**Рис. 2.** Дифрактограмма, показывающая минералогический состав отходов помехохранилища (вверху). Обозначения: *Ae* анкерит,  $\text{Ca}(\text{Fe}, \text{Mg}, \text{Mn})(\text{CO}_3)_2$ , (PDF-79-1347); *Cc* кальцит,  $\text{CaCO}_3$ , (PDF-24-0027); *Er* эрионит,  $(\text{Na}_2, \text{K}_2, \text{Ca})_2\text{Al}_4\text{Si}_{14}\text{O}_{36} \cdot 15\text{H}_2\text{O}$ , (PDF-12-0275); *Gy* гипс,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , (PDF-03-0044); *Qu* кварц,  $\text{SiO}_2$ , (PDF-01-0649); *S* сера,  $\text{S}_8$ , (PDF-76-2242); *St* струвит,  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , (PDF-15-0762); *Td* тридимит,  $\text{SiO}_2$ , (PDF-29-1493). Микрофотография (сканирующий электронный микроскоп) отходов и элементный анализ (внизу).

ства сероводорода, выделяющегося в помехохранилищах.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ**

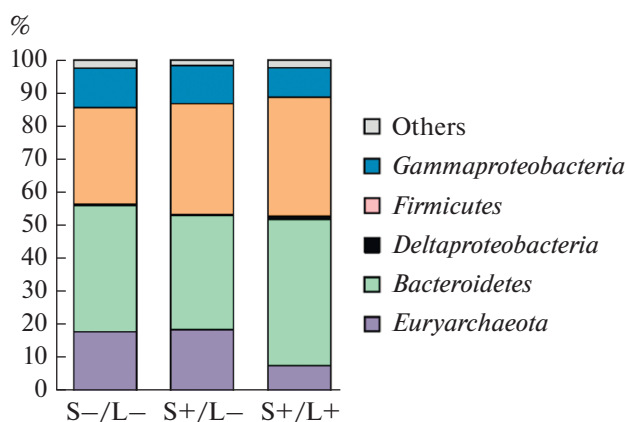
Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-14-00245) и Минобрнауки России.

**ВКЛАД АВТОРОВ**

Отбор проб и постановка микрокосмов проведена Е.А. Латыголец и М.А. Григорьевым. М. Кадырбаев измерял концентрацию сероводорода. О.П. Иккерт проводила дифракционный и элементный анализ. Выделение ДНК из микрокосмов и секвенирование гена 16S рРНК проведено Е.В. Груздевым и А.В. Мардановым. Биоинформационный анализ последовательностей выполнен А.В. Белецким. Анализ данных и подготов-

**СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ**

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



**Рис. 3.** Состав микробных сообществ микрокосмов по данным анализа генов 16S рРНК. S-/L-, микрокосм без лактата и сульфата; S+/L-, микрокосм с сульфатом без лактата; S+/L+, микрокосм с сульфатом и лактатом.

ка статьи выполнены О.В. Карначук и Н.В. Равиним. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bukhtiyarova P.A., Antsiferov D.V., Brasseur G., Avakyan M.R., Frank Y.A., Ikkert O.P., Pimenov N.V., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V.* Isolation, characterization, and genome insights into an anaerobic sulfidogenic *Tissierella* bacterium from Cu-bearing coins // *Anaerobe*. 2019. V. 56. P. 66–77.
- Dunlop M.W., Blackall P.J., Stuetz R.M.* Odour emissions from poultry litter – A review litter properties, odour formation and odorant emissions from porous materials // *J. Environ. Manage.* 2016. V. 177. P. 306–319.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Fiedler N., Kipen H., Ohman-Strickland P., Zhang J., Weisel C., Laumbach R., Kelly-McNeil K., Olejeme K., Lioy P.* Sensory and cognitive effects of acute exposure to hydrogen sulfide // *Environ. Health. Perspect.* 2008. V. 116. P. 78–85.
- Huang C.B., Xiao L., Xing S.C., Chen J.Y., Yang Y.W., Zhou Y., Chen W., Liang J.B., Mi J.D., Wang Y., Wu Y.B., Liao X.D.* The microbiota structure in the cecum of laying hens contributes to dissimilar H<sub>2</sub>S production // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. P. 770.
- Ikkert O.P., Gerasimchuk A.L., Bukhtiyarova P.A., Tuovinen O.H., Karnachuk O.V.* Characterization of precipitates formed by H<sub>2</sub>S-producing, Cu-resistant *Firmicute* isolates of *Tissierella* from human gut and *Desulfosporosinus* from mine waste // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P. 1221–1234.
- Karnachuk O., Kurochkina S., Tuovinen O.* Growth of sulfate-reducing bacteria with solid-phase electron acceptors // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 58. P. 482–486.
- Magoc T., Salzberg S.L.* FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ Preprints*. 2016. V. 4. e2409v1.
- Trabue S., Kerr B., Bearson B., Ziemer C.* Swine odor analyzed by odor panels and chemical techniques // *J. Environ. Qual.* 2011. V. 40. P. 1510–1520.
- Trabue S., Scoggin K., Li H., Burns R., Xin H., Hatfield J.* Speciation of volatile organic compounds from poultry production // *Atmos. Environ.* 2010. V. 44. P. 3538–3546.
- Wadud S., Michaelsen A., Gallagher E., Parcsi G., Zemb O., Stuetz R., Manefield M.* Bacterial and fungal community composition over time in chicken litter with high or low moisture content // *Br. Poult. Sci.* 2012. V. 53. P. 561–569.

## The Microbial Community of Poultry Farm Waste and Its Role in Hydrogen Sulfide Production

E. V. Gruzdev<sup>1,\*</sup>, E. A. Latygolets<sup>2</sup>, A. V. Beletsky<sup>1</sup>, M. A. Grigoriev<sup>2</sup>, A. V. Mardanov<sup>1</sup>, M. K. Kadyrbaev<sup>2</sup>, O. P. Ikkert<sup>2</sup>, O. V. Karnachuk<sup>2</sup>, and N. V. Ravin<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

\*e-mail: gruevg@yandex.ru

Received February 4, 2021; revised March 12, 2021; accepted March 15, 2021

**Abstract**—The microbiota of chicken litter remains largely unexplored, despite its leading role in the formation of volatile odorants and unpleasant odors. One of the main components of the odor is hydrogen sulfide, which may be formed as a result of microbial sulfate reduction. The composition of the microbial community of poultry plant waste was investigated. Samples were collected at the Mezheninovskaya large poultry farm,

15 km from Tomsk, Russia. The 16S rRNA gene profiling revealed sulfate-reducing *Desulfovibrionaceae* in the microbial community. Both their share in the community and sulfide production increased upon incubation of the waste in the medium with sulfate and lactate. The possible sulfate sources in the waste are gypsum and the feed additives introduced as sulfates, such as lysine sulfate.

**Keywords:** chicken litter microbiota, hydrogen sulfide, sulfate reduction, *Desulfovibrio*



## К 150-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА БОРИСА ЛАВРЕНТЬЕВИЧА ИСАЧЕНКО ГОДЫ ЖИЗНИ (15.06.1871–17.11.1948)

DOI: 10.31857/S002636562104008X



15 июня 2021 г. исполняется 150 лет со дня рождения выдающегося ученого, естествоиспытателя, ботаника и микробиолога, Бориса Лаврентьевича Исаченко, заслуженного деятеля науки, возглавлявшего Институт микробиологии (ИНМИ) АН СССР с 1939 по 1948 год и внесшего неоценимый вклад в развитие микробиологии в России.

Б.Л. Исаченко в 1895 г. с отличием закончил Естественное отделение физико-математического факультета Петербургского университета. После выпуска был направлен для стажировки за границу, где обучался у основоположника общей микробиологии М. Бейринка в Дельфте. Более 25 лет преподавал в Петербургском университете, читая курсы по сельскохозяйственной бактериологии и микробиологии. В 1918 г. Борис Лаврентьевич возглавил первую кафедру микробиологии в России, основанную в Петербургском университете. Б.Л. Исаченко вел активную преподавательскую деятельность — он заведовал кафедрой ботаники и позднее был ректором Высших женских сельскохозяйственных курсов, реорганизованных после революции в Сельскохозяйственный институт, а затем в Сельскохозяйственную Академию, читал курс ботаники в Женском медицинском

институте. Почти 30 лет он отдал работе в Санкт-Петербургском ботаническом саду сначала в должности заведующего станцией для испытания семян, а затем более 10 лет возглавляя это учреждение. Годы его директорства пришлись на трудные времена после революции и гражданской войны. Тем не менее, Б.Л. Исаченко удалось не только сохранить, но и преумножить коллекции, провести крупные хозяйственные мероприятия, создать новые научные лаборатории. За время работы в Ботаническом саду он организовал специальные курсы по обучению семенному делу, основал и редактировал журнал “Записки по семеноведению”, вел тематически разнообразные исследовательские работы по семеноводству, собранные в 3 томе его Избранных Трудов (Исаченко, 1951). В 1930 г. Исаченко, по предложению С.Н. Виноградского и В.Л. Омелянского, поддержанному И.П. Павловым, возглавил единственную на тот момент в России лабораторию общей микробиологии, расположенную во Всесоюзном институте экспериментальной медицины (ВИЭМ) в Ленинграде. В связи с реорганизацией ВИЭМа, в 1937 г. Б.Л. Исаченко был приглашен Г.А. Надсоном в основанный в 1934 г. и возглавляемый им Институт микробиологии в Москву. Почти сразу после перевода в октябре 1937 г., академик Г.А. Надсон, вместе со своим заместителем Г.К. Бургвицем, был арестован как “участник антисоветской диверсионно-вредительской организации” и расстрелян 15 апреля 1939 г. по приговору военной коллегии Верховного суда СССР. Во время следствия Б.Л. Исаченко временно исполнял обязанности директора, а после расстрела Г.А. Надсона возглавил ИНМИ. Несмотря на гнетущую политическую ситуацию, под руководством Б.Л. Исаченко к 1941 г. ИНМИ стал ведущим научным учреждением страны в области общей микробиологии. В нем велись исследования по систематике, цитологии, генетике, биохимии и экологии различных групп микроорганизмов, а также промышленной, почвенной и водной микробиологии. Блестящий администратор и организатор науки Б.Л. Исаченко активно привлекал в институт талантливых ученых, среди которых С.И. Кузнецов, Е.Н. Мишустин, Н.Д. Иерусалимский, благодаря чему ему в короткие сроки удалось добиться выдающихся на-

учных и прикладных успехов при очень скромной материально-технической базе. В 1941 г. после начала войны ИНМИ был эвакуирован в г. Фрунзе, где Б.Л. Исаченко смог организовать интенсивную научную работу. В эвакуации велись исследования по 12 научным темам, относящимся к разработке методов “ускорения и рационализации промышленных процессов”, “повышения урожайности сельскохозяйственных культур и борьбы с поражениями культурных растений”, “борьбы с инфекционными процессами и ускорения заживления инфицированных ран” и “разработке новых методов для микробиологических исследований и производств”. В 1942 г. Ученому Совету ИНМИ было присвоено право присуждения ученых степеней, и за годы войны докторами и кандидатами наук стали 12 человек. Умея увидеть потенциал не только ученого, но и руководителя и учитывая свой преклонный возраст, Б.Л. Исаченко после войны подготовил себе преемников — А.А. Имшенецкого, — будущего директора ИНМИ и С.И. Кузнецова, которому передал отдел. Им было много сделано для создания и развития микробиологии в союзных республиках — Украине и Армении. Несмотря на высокую оценку руководством страны помощи науки в войне, гонения на ученых не прекращались. В августе 1948 г. Б.Л. Исаченко был участником печально известной сессии ВАСХНИЛ, на которой разгрому подверглись генетика, физиология, цитология, вирусология и другие науки; из институтов и высшей школы было изгнано огромное количество ученых. Борис Лаврентьевич смог отстоять микробиологию, как науку, но напряжение было слишком высоким, и 17 ноября 1948 г. в возрасте 77 лет он умер от сердечного приступа.

На протяжении всей жизни, несмотря на интенсивную педагогическую и административную деятельность, Б.Л. Исаченко вел активные научные исследования. Помимо работ по ботанике и семениоведению, связанных с занимаемыми Б.Л. Исаченко должностями, он внес неоценимый вклад в развитие только зарождавшегося тогда в России направления общей микробиологии. Бориса Лаврентьевича интересовали практически все направления общей микробиологии, связанные с биосферными функциями микроорганизмов и их участием в циклах С, N, S, Fe, Са. Он является основоположником многих разделов экологической микробиологии в России и в мире. Б.Л. Исаченко первым из отечественных микробиологов исследовал микрофлору Северного Ледовитого океана, где впервые применил стерильный способ отбора проб. Исследуя разные физиологические группы микроорганизмов, доказал, что воды северных морей не являются безжизненными, тем самым опровергнув господствующую тогда гипотезу М. Левина, но, напротив, населены разнообразными бактериями. Он выявил основные

группы бактерий, контролирующих цикл азота, доказал, что продукция сероводорода в морской воде обусловлена жизнедеятельностью сульфатредукторов, а не гнилостных бактерий, как полагало большинство биологов в то время. Эти работы, обобщенные в труде “Исследования над бактериями Северного Ледовитого океана” стали на долгие годы эталоном полевых микробиологических исследований. После изучения бактерий Северного Ледовитого океана им была исследована микрофлора Карского, Балтийского, Азовского, Мраморного и Черного морей. Для последнего он доказал, что существующее сероводородное заражение обусловлено жизнедеятельностью сульфатредуцирующих бактерий. Поскольку до него никто в мире не ставил проблемы биогеохимической роли морских микроорганизмов так широко, Б.Л. Исаченко признается основоположником морской микробиологии, науки тесно связанной с гидрологией, гидрохимией и гидробиологией.

Б.Л. Исаченко является также основоположником крупнейших направлений геологической микробиологии. Исследуя южнорусские соленые озера и лиманы в связи с генезисом лечебной грязи, а также сульфатные, хлоридные и содовые озера Кулундинской степи, он доказал участие бактерий в основных этапах биогеохимического цикла серы, установил связь розовой окраски воды и осадков озер с развитием пурпурных бактерий, указал на косвенное участие бактерий в образовании соды. Им активно исследовались бактерии цикла железа. Он первым описал явление внутриклеточного образования кристаллов сульфида железа у бактерий и связал структуру лечебных грязей с отложением пирита, обусловленным развитием бактерий серного цикла. Им разработана теория биогенного образования месторождений серы, исследованы микробиологические процессы отложения карбоната кальция, доказано влияние бактерий на образование травертинов. Кроме того, он заложил основы раздела нефтяной микробиологии, исследовав микрофлору пластовых вод и нефтяных скважин в связи с генезисом нефти. По совокупности работ, посвященных выяснению участия микроорганизмов в геологических процессах, в 1934 г. Президиумом АН СССР ему была присуждена ученая степень доктора биологических наук.

Помимо хемолито- и хемоорганотрофных микроорганизмов, Б.Л. Исаченко были изучены многие группы органотрофных бактерий, участвующих в разложении углеводов, в частности целлюлозы и клетчатки, белков и липидов. Он интересовался вопросами микробного разложения хитина и лигнина, исследовал разложение и лечебные свойства торфов и участие органотрофных бактерий в образовании лечебных грязей. Им опубликован ряд статей о светящихся бактериях,

изучены взаимоотношения микробов с высшими организмами: исследованы клубеньковые бактерии, паразитарные грибы культурных растений, бактериальные заболевания некоторых растений.

Б.Л. Исаченко разрабатывал также и прикладные направления микробиологии: описав новый микроорганизм, безвредный для человека и домашних животных, но вызывающий эпизоотии у мышей и крыс, предложил до сих пор активно использующийся бактериальный способ борьбы с грызунами. Им был изучен вопрос о бактериальном способе удобрений растений азотом; исследованы причины коррозии бетонных сооружений и причины появления землистого запаха и вкуса в воде р. Москвы и предложены меры по борьбе с этими явлениями. Большое значение Борис Лаврентьевич придавал исследованию разложения фенолов сточных вод термофильными бактериями, а также явлению самовозгорания зерна в элеваторах.

Осознавая значимость ландшафта для определения биосферной роли микроорганизмов как участников биогеохимических циклов, Б.Л. Исаченко первым ввел экспедиционные работы в практику отечественной микробиологии. Он лично участвовал более чем в 40 экспедициях: в арктических походах на судах “Таймыр” (1927), “Георгий Седов” (1930) и “Александр Сибиряков” (1933); в экспедициях по исследованию озер Кавказа, Крыма, Алтайского края, Карелии; минеральных источников в районе Ессентуков, Тбилиси, Грозного, Сольцы и Липецка; месторождений нефти и серы в районах городов Баку и Фергана.

Б.Л. Исаченко опубликовал более 200 статей по микробиологии, ботанике и семеноведению, большинство из которых изданы в отечественных журналах. Многие работы остались в неопубликованном виде. Им написано несколько очерков по истории микробиологии, биографические очерки, посвященные русским биологам, большое количество статей, способствовавших популяризации микробиологии. Под редакцией и с дополнениями Б.Л. Исаченко несколько раз переиздавался учебник В.Л. Омелянского “Основы микробиологии” и практическое руководство по микробиологии. Долгие годы он был главным редактором журнала “Микробиология”. Б.Л. Исаченко был одним из организаторов Сапропелевого комитета АН СССР, являлся вице-президентом Междуна-

родного арктического общества, почетным членом Микробиологического общества в Ленинграде, действительным членом Русского географического общества, пожизненным членом Французского ботанического общества и Британского общества микологии, почетным доктором Карлова Университета в Праге. Был награжден орденом Ленина, орденом Трудового Красного Знамени и медалью “За доблестный труд в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.”.

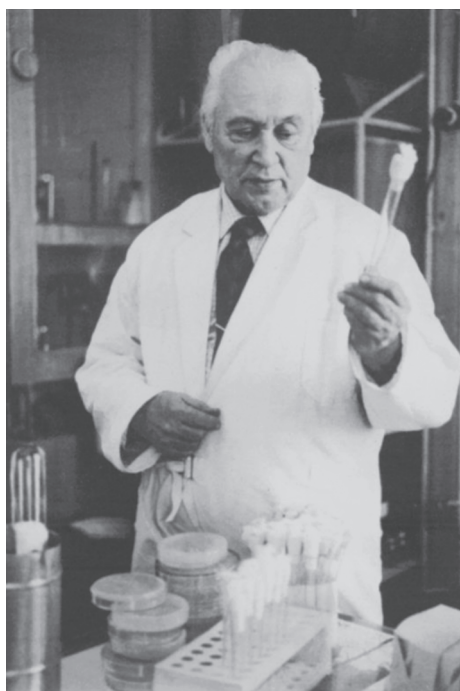
Именем Бориса Лаврентьевича назван остров в Карском море, вид лишайника (*Leptogium issatchenkoi* = *Enchylium limosum*), 2 вида цианобактерий (*Anabaenopsis issatschenkoi*, Woronichin et al., 1934 и *Anabaena issatchenkoi* = *Cuspidothrix isaatchenkoi* = *Aphanizomenon issatschenkoi* Usachev et al., 1938), бактерия, убивающая грызунов (*Bac. issatschenkoi* = *Salmonella enteritidis* var. *Issatschenko*), новый род протеолитической анаэробной бактерии, выделенной из содового озера Танатары в Кулундинской степи, восстанавливающей элементную серу или железо (*Isachenkonkia alkalipeptolytica*, Zavarzina et al., 2020).

Современная структура подразделений ИНМИ им. С.Н. Виноградского показывает, что изучение биосферной роли микроорганизмов и их участия в биогеохимических циклах, которому посвятил свою жизнь Б.Л. Исаченко, в настоящее время является магистральной линией работы института. Более того, многие руководители лабораторий могут считаться “научными правнуками и праправнуками” Бориса Лаврентьевича, поскольку А.А. Имшенецкий и, в еще большей степени, С.И. Кузнецов не только выполнили, развили и существенно расширили научную программу, которую составил, как завещание Б.Л. Исаченко, но смогли сформировать собственные научные школы. Одним из выдающихся учеников А.А. Имшенецкого и С.И. Кузнецова стал внук Б.Л. Исаченко, академик РАН Г.А. Заварзин, сумевший поднять на новый уровень изучение биосферной роли микроорганизмов, блестяще развивший многие направления природоведческой микробиологии, начатые его дедом, и создавший мировоззренческую концепцию о центральной роли микробных сообществ в становлении и устойчивом развитии биосферы Земли.

*Редколлегия журнала “Микробиология”*

**К 120-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ  
АКАДЕМИКА ЕВГЕНИЯ НИКОЛАЕВИЧА МИШУСТИНА  
(22.02.1901–03.05.1991)**

DOI: 10.31857/S0026365621040091



22 февраля 2021 г. исполняется 120 лет со дня рождения академика Евгения Николаевича Мишустина, выдающегося советского микробиолога, Героя Социалистического Труда (1981), заслуженного деятеля науки РСФСР (1961), лауреата Государственных премий СССР за монографию о термофильных микроорганизмах (1951) и цикл работ по почвенной микробиологии (1970), награжденного двумя орденами Ленина, орденами Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени.

Е.Н. Мишустин в 1924 г. окончил Московскую сельскохозяйственную академию им. К.А. Тимирязева и до 1939 г. работал в институтах ВАСХНИЛ. В 1940 г. Е.Н. Мишустин возглавил созданный им Отдел почвенной микробиологии в Институте микробиологии АН СССР, которым руководил в течение последующих 50 лет. С 1961 по 1971 гг. Е.Н. Мишустин возглавлял кафедру и лабораторию микробиологии ТСХА им. Тимирязева.

Евгений Николаевич Мишустин был активным и разносторонним ученым, одним из создателей и идеологов учения об экологии микроорганизмов, известным специалистом в области общей, почвенной и сельскохозяйственной микробиологии. Своими трудами он обогатил отечественную науку и завоевал широкое признание за рубежом. Направления научной деятельности Мишустина чрезвычайно многогранны. Развивая традиции российской почвенной микробиологии, заложенные трудами Д.А. Сабина, Д.Н. Прянишникова, В.Р. Вильямса, Н.Н. Худякова, Евгений Николаевич активно способствовал становлению и развитию почвенной микробиологии в СССР. Он создал эколого-географическое направление в почвенной микробиологии и учение о микробных ценозах, многие годы посвятил разработке проблемы микробиологической фиксации атмосферного азота и формированию современных представлений о балансе азота в почве, а также вопросам рационального использования минерального и “биологического” азота. Широко известны его работы в области санитарной микробиологии и самоочищения почв, оценки биологической активности почвы и роли микроорганизмов в синтезе и разложении гумусовых веществ, интродукции в почву микробных популяций с целью повышения ее плодородия и трансформации сложных природных (солома, лигнин, гумус, нефть) и синтетических (ксенобиотики) соединений. Большой интерес представляют исследования по микрофлоре зерна, микробиологии силоса и сенажа. В успехах России в XXI веке в производстве продовольствия, достаточного не только для самообеспечения, но и для значительного экспорта, несомненно, есть и заслуга Евгения Николаевича Мишустина.

Большое внимание Евгений Николаевич уделял преподавательской деятельности и подготовке научных кадров. Под его руководством было подготовлено 20 докторов наук и более 120 кандидатов наук. Многие его ученики стали известными учеными, возглавили микробиологические исследования в научных учреждениях России и за рубежом. Евгений Николаевич был бескорыстным, неутомимым консультантом и просто дружеским

советчиком для всех почвенных микробиологов СССР.

В течение многих лет он был заместителем академика-секретаря Отделения биологических наук АН СССР, главным редактором журнала “Известия АН СССР, Серия биологическая”, членом редколлегий журналов “Микробиология” и “Сельскохозяйственная биология”, Председателем Комиссии по научным основам сельского хозяйства Президиума АН СССР, членом комитета по Ленинским и Государственным премиям.

Е.Н. Мишустин опубликовал более 700 научных работ, в том числе 20 монографий, включая актуальные и поныне “Термофильные микроорганизмы в природе и практике”, “Санитарная микробиология почвы”, “Микроорганизмы и продуктивность земледелия”, “Минеральный и биологический азот в земледелии СССР”. Учебник “Микробиология” был и остается “настольной

книгой” студентов-микробиологов нескольких поколений и его 8-е издание вышло в 2020 г. Особый интерес представляет автобиографическая монография “Моя жизнь в науке. Воспоминания” (М., Наука, 1997).

Для тех, кому выпала удача работать вместе с Евгением Николаевичем, он был настоящим Учителем, общение с которым обогащало. Основными принципами в общении с учениками были органичное сочетание строгости и требовательности с вниманием к творчеству и научной судьбе молодых. Ученый, известный во всем мире, проявлял искреннее и неподдельное внимание к вопросам, с которыми к нему обращались. Для нас в памяти навсегда останется образ Евгения Николаевича, простого в общении, доброжелательного, с большим личным обаянием и редким чувством юмора.

*Редколлегия журнала “Микробиология”*



## ПИМЕНОВ НИКОЛАЙ ВИКТОРОВИЧ (К 60-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)

DOI: 10.31857/S0026365621040108



22 февраля 2021 г. исполнилось 60 лет со дня рождения Пименова Николая Викторовича, главного редактора журнала “Микробиология”, доктора биологических наук, заместителя директора по научной работе ФГУ “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Н.В. Пименов после окончания в 1983 г. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова поступил в очную аспирантуру Института микробиологии АН СССР и в 1987 г. успешно защитил кандидатскую диссертацию, а в 2006 г. — докторскую диссертацию. Вся научная жизнь Николая Викторовича связана с Институтом микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН: он прошел путь от младшего, а затем научного и старшего научного сотрудника до заместителя директора по научной работе, с 2012 г. и по настоящее время заведует лабораторией реликтовых микробных сообществ. С 2015 г. и по настоящее время Николай Викторович работает в должности заместителя директора по научной работе ФИЦ Биотехнологии РАН.

Н.В. Пименов — признанный специалист в области микробиологии, микробной биогеохимии

и экологии микроорганизмов, а также микробной биотехнологии, автор более 200 публикаций, в том числе 16-ти глав в монографиях. Работы Н.В. Пименова посвящены изучению геохимической деятельности микроорганизмов в природных и техногенных экосистемах. Он внес существенный вклад в изучение микробных сообществ в зонах разгрузки гидротерм океана и метановых сипов в Черном, Балтийском, Белом и Баренцевом морях. Научная новизна работ Н.В. Пименова и руководимого им коллектива заключается в комплексном подходе к этим исследованиям геофизическими, гидрогеохимическими, изотопными и молекулярными методами. Работы Н.В. Пименова широко известны отечественным и зарубежным ученым (индекс Хирша по WoS — 25, более 3700 цитирований), среди коллег он пользуется заслуженным авторитетом.

Н.В. Пименов является руководителем многих научных проектов не только по фундаментальным исследованиям микробных сообществ морских и пресных водоемов, но и прикладным исследованиям и разработкам по возможности их использования для очистки сточных вод, а также биотехнологии получения продуктов биосинтеза — белка на основе метанотрофных микроорганизмов (гаприн).

Николай Викторович неоднократно премировался издательством МАИК “Наука” по журналу “Микробиология”, награжден Почетной грамотой Президиума Российской академии наук и профсоюза работников РАН (2004 г.) и Почетной грамотой Министерства науки и высшего образования РФ (2021 г.).

В должности заместителя директора ФИЦ Биотехнологии РАН Н.В. Пименов ведет большую научно-организационную работу, являясь председателем Научно-технического совета Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, заместителем председателя Ученого совета ФИЦ Биотехнологии РАН, председателем диссертационного Совета Д002.247.02, председателем Научного совета РАН по микробиологии; входит в состав Комиссии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по поддержке и развитию биоресурсных коллекций подведомственных научных организаций и образователь-

ных организаций высшего образования, является ученым секретарем Комиссии РАН по присуждению премии им. С.Н. Виноградского.

Н.В. Пименов активно вовлечен в преподавательскую работу, читает курс лекций по микробной биогеохимии и биогеотехнологии студентам биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, а также вводные лекции по микробной биогеотехнологии на биотехнологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова; является председателем Государственной аттестационной комиссии на биологическом факультете МГУ. Н.В. Пименов – руководитель профиля “Микробиология” подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре при ФИЦ Биотехнологии

РАН, под его руководством защищено 4 и подготовлено к защите 2 кандидатские диссертации.

Заняв в 2018 году пост главного редактора журнала “Микробиология”, Николай Викторович внес свежую струю в деятельность редакционной коллегии и редакции, что позволило повысить международный авторитет журнала и существенно расширить круг публикаций по современным направлениям общей микробиологии.

Желаем Николаю Викторовичу крепкого здоровья, новых научных открытий и успехов в его многогранной деятельности.

*Редколлегия журнала “Микробиология”*