СОДЕРЖАНИЕ

Том 90, номер 6, 2021

ОБЗОРЫ

Микробная деградация пластика и пути ее интенсификации

И. Б. Котова, Ю. В. Тактарова, Е. А. Цавкелова, М. А. Егорова, И. А. Бубнов, Д. В. Малахова, Л. И. Ширинкина, Т. Г. Соколова, Е. А. Бонч-Осмоловская 627

Растительные ингибиторы плотностно-зависимой коммуникации у бактерий: разнообразие структур, механизмов действия и источников происхождения

Д. Г. Дерябин, А. А. Галаджиева, Д. Б. Косян, Г. К. Дускаев 660

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Микробное разнообразие грунтов архипелага Земля Франца-Иосифа, загрязненных нефтепродуктами

Е. М. Семенова, Т. Л. Бабич, Д. Ш. Соколова, А. С. Добрянский, А. В. Корзун, Д. Р. Крюков 681

Новые биокомпозитные материалы, включающие углеводородокисляющие микроорганизмы, и их потенциал для деградации нефтепродуктов

Ю. А. Николаев, И. А. Борзенков, Е. В. Дёмкина, Н. Г. Лойко, Т. А. Канапацкий, И. В. Перминова, А. Н. Хрептугова, Н. В. Григорьева, И. В. Близнец, Н. А. Манучарова, В. В. Сорокин, М. А. Коваленко, Г. И. Эль-Регистан 692

Микроорганизмы дерново-подзолистой почвы, деградирующие нефть и полициклические ароматические углеводороды

Н. А. Манучарова, М. А. Большакова, Т. Л. Бабич, Т. П. Турова, Е. М. Семенова, А. С. Янович, А. Б. Полтараус, А. Л. Степанов, Т. Н. Назина 706

Штамм AZ-130 из нефтезагрязненной почвы Азербайджана: изоляция, антибактериальный скрининг и оптимизация условий культивирования

А. Г. Агаева, С. Дж. Стритфилд, И. М. Гусейнова 718

Влияние скачкообразного увеличения нагрузки по аммонию на активность сообщества анаммокс-бактерий в биореакторе последовательно-периодического действия

А. Г. Дорофеев, Ю. А. Николаев, В. А. Грачёв, А. Ю. Каллистова, Ю. Ю. Берестовская, Н. В. Пименов 728

Ингибирование биосинтеза каротиноидов в пигмент-белковых комплексах LH2 и LH1-RC пурпурной серной бактерии *Thermochromatium tepidum*

М. А. Большаков, А. А. Ашихмин, З. К. Махнева, А. А. Москаленко 738

Оценка продукции гомосерин лактонов изолятами *Pseudomonas* spp.

И. Ф. Каримов, Т. О. Федорова, О. О. Жеребятьева, С. Д. Борисов, Е. А. Михайлова 747

Продукционные и структурные показатели фитопланктонного сообщества и бактериопланктона на двух станциях в открытой части устья Севастопольской бухты. Оценка влияния мидийной фермы

Е. С. Соломонова, А. И. Акимов 753

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Высокоперсистерные штаммы углеводородокисляющих бактерий как основа для повышения количества жизнеспособных клеток при длительном хранении

Ю. А. Николаев, Н. Г. Лойко, Е. В. Дёмкина, И. А. Борзенков, Т. А. Канапацкий, Г. И. Эль-Регистан 763

Contents

Vol. 90, No. 6, 2021

Reviews

Microbial Degradation of Plastics and Approaches to Its Intensification

I. B. Kotova, Yu. V. Taktarova, E. A. Tsavkelova, M. A. Egorova, I. A. Bubnov, D. V. Malakhova, L. I. Shirinkina, T. G. Sokolova, and E. A. Bonch-Osmolovskaya 627

Plant Inhibitors of Density-Dependent Communication in Bacteria: Diversity of Their Structure, Action Mechanisms, and Sources

D. G. Deryabin, A. A. Galadzhieva, D. B. Kosyan, and G. K. Duskaev 660

Experimental Articles

Microbial Diversity of Hydrocarbon-Contaminated Soils of the Franz Josef Land Archipelago

E. M. Semenova, T. L. Babich, D. Sh. Sokolova, A. S. Dobriansky, A. V. Korzun, and D. R. Kryukov 681

New Biocomposite Materials Based on Hydrocarbon-Oxidizing Microorganisms and Their Potential for Oil Products Degradation

Yu. A. Nikovaev, I. A. Borzenkov, E. V. Demkina, N. G. Loiko, T. A. Kanapatskii, I. V. Perminova, A. N. Khreptugova, N. V. Grigor'eva, I. V. Bliznets, N. A. Manucharova, V. V. Sorokin, M. A. Kovalenko, and G. I. El'-Registan 692

Microbial Degraders of Petroleum and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Sod-Podzolic Soil

N. A. Manucharova, M. A. Bolshakova, T. L. Babich, T. P. Tourova, E. M. Semenova, A. S. Yanovich, A. B. Poltaraus, A. L. Stepanov, and T. N. Nazina 706

Strain AZ-130 from Oil-Contaminated Soil of Azerbaijan: Isolation, Antibacterial Screening, and Optimization of Cultivation Conditions

A. G. Aghayeva, S. J. Streatfielda, and I. M. Huseynova 718

Effect of Abrupt Increase in Ammonium Load on Activity of the Anammox Bacterial Community in a Sequencing Batch Reactor

A. G. Dorofeev, Yu, A. Nikolaev, V. A. Grachev, A. Yu. Kallistova, Yu. Yu. Berestovskaya, and N. V. Pimenov 728

Inhibition of Carotenoid Biosynthesis in LH2 and LH1-RC Pigment-Protein Complexes of a Purple Sulfur Bacterium *Thermochromatium tepidum*

M. A. Bolshakov, A. A. Ashikhmin, Z. K. Makhneva, and A. A. Moskalenko 738

Evaluation of Homoserine Lactone Production by *Pseudomonas* spp. Isolates

I. F. Karimov, T. O. Fedorova, O. O. Zherebyateva, S. D. Borisov, and E. A. Mikhailova 747

Production and Structural Parameters of the Phytoplankton and Bacterioplankton Communities at Two Stations in the Open Part of the Sevastopol Bay Mouth: Assessment of the Effect of the Mussel Farm

E. S. Solomonova and A. I. Akimov 753

Short Communications

Highly Persistent Strains of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria as a Base for Increasing the Viable Cell Numbers during Long-Term Storage

Yu. A. Nikolaev, N. G. Loiko, E. V. Demkina, I. A. Borzenkov, T. A. Kanapatskii, and G. I. El'-Registan 763

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 627–659

ОБЗОРЫ

МИКРОБНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ПЛАСТИКА И ПУТИ ЕЕ ИНТЕНСИФИКАЦИИ

© 2021 г. И. Б. Котова[a], Ю. В. Тактарова[a], Е. А. Цавкелова[a], М. А. Егорова[a], И. А. Бубнов[a], Д. В. Малахова[a], Л. И. Ширинкина[a], Т. Г. Соколова[b], Е. А. Бонч-Осмоловская[a, b, *]

[a] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия*

[b] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 117312 Россия*

**e-mail: elizaveta.bo@gmail.com*

Поступила в редакцию 01.08.2021 г.
После доработки 02.08.2021 г.
Принята к публикации 02.08.2021 г.

Синтетические пластмассы, или пластики, во всем мире производятся в возрастающих количествах, и одновременно растет количество пластиковых отходов, которые неизбежно загрязняют окружающую среду. Процесс микробного разложения пластиков идет очень медленно, однако способность к нему найдена у многих бактерий, в том числе у симбионтов беспозвоночных, и микроскопических грибов. Наибольшее количество исследований посвящено микробному разложению полиэтилена, полистирола и полиэтилентерефталата (ПЭТ). Имеется арсенал разнообразных методов детекции процессов деградации пластиков и определения их скорости. Тем не менее, из-за отсутствия единых протоколов сравнение результатов различных авторов затруднено. Наиболее эффективным из известных в настоящее время процессов деградации пластиков является разложение ПЭТ с помощью рекомбинантных гидролаз из термофильных актинобактерий. В обзоре рассматриваются также различные способы ускорения процессов разложения пластиков.

Ключевые слова: пластики, микробная деградация, методы детекции, пути ускорения, термостабильные гидролазы

DOI: 10.31857/S0026365621060082

Синтетические пластмассы, или пластики, используются в самых различных областях человеческой деятельности, и представить себе современный мир, лишенный пластиков, трудно или даже невозможно. Одним из важнейших свойств пластиков является их высокая устойчивость к воздействиям окружающей среды, в том числе к биоразложению. Но это же их свойство породило одну из центральных проблем современности: на планете скапливаются огромные количества пластиковых отходов.

В связи с простотой производства и повсеместностью применения глобальное производство пластиков неуклонно растет, что, соответственно, ведет к росту пластикового загрязнения Земли (Geyer et al., 2017; Плакунов и соавт., 2020; Lau et al., 2020). Весомый вклад в этот процесс вносит растущее применение предметов одноразового использования. В 2015 г. годовое производство пластиков возросло до 350 млн тонн по сравнению с 2 млн тонн в 1950 г. (Geyer et al., 2017); в 2019 г. оно составило уже 368 млн тонн (Plastics Europe, 2021). Суммарно за период с 1950 по 2015 годы продукция пластиков и используемых при их производстве добавок составила 8300 млн тонн.

При сохранении существующих тенденций увеличения производства пластиков ожидается образование 33 млрд тонн пластиковых отходов к 2050 г., большая часть которых попадет на полигоны твердых бытовых отходов или просто в окружающую среду, в почву, атмосферу, водные системы, загрязняя озера, реки, моря и океаны (Rochman et al., 2013). По некоторым оценкам около 8 млн тонн макропластика и 1.5 млн тонн первичного микропластика ежегодно поступают в океан (Jambeck et al., 2015; Boucher, Friot, 2017). При сохранении существующих тенденций совокупная масса пластика океана может к 2025 г. увеличиться на порядок по сравнению с уровнем 2010 г. (Jambeck et al., 2015). Доля микропластика, поступавшего в наземные места обитания с 2012 по 2017 гг., многократно превышала его поступление в океан (Horton et al., 2017).

В глобальной продукции пластиков, за исключением синтетических нитей, производимых из

полиэстера, полиамида и акрила, наибольшую долю составляют полиэтилены (36%), чуть меньшую – полипропилен (21%) и поливинилхлорид (12%), равные доли составляют полиэтилентерефталат, полиуретан и полистирол (10% каждый) (Geyer et al., 2017). При этом в отходах доля пластиков, из которых изготавливают упаковочные материалы, возрастает (Geyer et al., 2017).

Пластмассы оказывают вредное воздействие на окружающую среду, прежде всего физически разрушая среду обитания (Sheavly, Register, 2007). Пластиковое загрязнение губительно влияет на животных и человека (Schmaltz et al., 2020). Присутствие пластиковых материалов в морях приводит к запутыванию в них морских животных (Gall, Thompson, 2015; Kühn et al., 2015; Lusher et al., 2018), переносу инвазивных видов (Kiessling et al., 2015), которые внедряются в пищевые цепи и нарушают питание морских животных (Laist, 1987; de Stephanis et al., 2013; Gall, Thompson, 2015; Brandon et al., 2019). Пластики могут служить эффективными системами доставки токсичных загрязнителей, которые являются известными репродуктивными токсинами, канцерогенами и мутагенами (Wright, Kelly, 2017; Schmaltz et al., 2020), содержащихся в них или адсорбированных из окружающей среды (Gallo et al., 2018). Это представляет потенциальную опасность и для здоровья человека, потому что люди потребляют с пищей и напитками, по разным оценкам, от 39000 до 52000 частиц микропластика в год (Schmaltz et al., 2020).

Существующие в настоящее время уровень поступления пластиков в отходы и их распределение вносят значительный вклад в усиление парникового эффекта. При сохранении существующих трендов к 2050 г. эмиссия парниковых газов из пластиков составит 15% по углероду от глобального количества парниковых газов (Zheng, Suh, 2019).

В настоящее время пластиковые отходы могут быть термически разрушены, отправлены на полигоны для отходов, оставлены в естественной среде или переработаны с получением вторичного пластика (Peng et al., 2018; Ru et al., 2020). Вторичная переработка задерживает окончательную утилизацию пластиков, но, в конечном итоге, не позволяет ее избежать. Несмотря на появление новых технологий, таких как пиролиз, преобразующий пластиковые отходы в топливо, на сегодняшний день практически все тепловые разрушения пластиков происходят путем сжигания, с получением энергии или без него (Lau et al., 2020; Ru et al., 2020).

Микроорганизмы, проявляя значительную пластичность метаболизма, обладают способностью разлагать многие химические соединения, в том числе некоторые пластики. Исследование таких микроорганизмов, их метаболизма и ферментного аппарата, а также интенсификация целевых процессов с помощью различных методов и подходов могут послужить основой для создания биотехнологии переработки пластиковых отходов, которая позволит решить комплекс экологических проблем, связанных с пластиковым загрязнением.

Настоящий обзор посвящен разнообразию микроорганизмов, разлагающих наиболее широко применяемые пластики, имеющихся у них ферментативных механизмах, и возможности интенсификации столь важного для нашей планеты процесса разложения пластиковых отходов.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПЛАСТИКАХ

В настоящее время 80% применяемых пластмасс – материалы на основе термопластичных полимеров, так называемых термопластов или термопластиков, состояние которых обратимо меняется с твердого на вязкое с повышением температуры. На основе примерно 10–15 разновидностей промышленных полимеров производится более 4000 марок конструкционных термопластиков (Мельникова, 2013). В рамках этого обзора мы собираемся рассмотреть характеристики пяти видов термопластиков, на которые приходится основная часть производства: полиэтилена, полипропилена, поливинилхлорида, полиэтилентерефталата и полистирола. Их основные свойства представлены в табл. 1.

Около 90% объема производства термопластов составляют материалы на основе полиолефинов (полиэтилены, полипропилен), полистиролы, поливинилхлориды; они выдерживают постоянные внешние напряжения до 10–15 МПа и температуры до 80 ± 20°C. Около 9% объема производства составляют материалы на основе полиэтилентерефталата, полиамидов, поликарбоната, полиформальдегида и др. Более прочные и термостойкие, они выдерживают разрушающее напряжение до 140 ± 20 МПа и температуры до 150°C (Мельникова, 2013).

Мономером полиэтилена (ПЭ) является этилен. В зависимости от метода получения производят несколько типов полиэтилена: полиэтилен низкой плотности (ПЭНП), полиэтилен высокой плотности (ПЭВП), сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ). ПЭНП отличается сильно разветвленными цепями со степенью полимеризации ~50000, плотностью 910–935 кг/м^3 и степенью кристалличности 50–60%. ПЭВП представляет собой плотный полимер, молекулы которого линейны и степень полимеризации составляет до 300000, с плотностью 930–970 кг/м^3 и степенью кристалличности 70–85% (Галыгин и соавт., 2012). Основной причиной, вызывающей различия в свойствах ПЭНП и ПЭВП, является раз-

Таблица 1. Характеристики основных видов пластиков

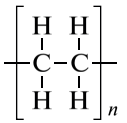
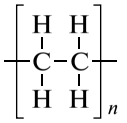
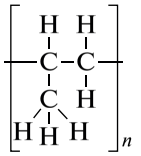
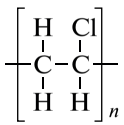
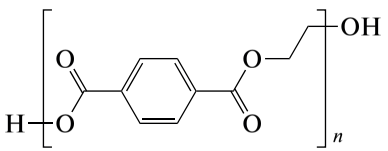
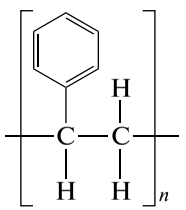
Пластик	Структурная формула	Способ изготовления	Молекулярная масса, Да	*T* плавления, °C	*T* стеклования, °C	Степень кристалличности, %	Область применения
Полиэтилен низкой плотности (ПЭНП)		Полимеризация этилена при давлении 100–288 МПа	80000–500000	103–110	–50–120	50–60	Упаковочные материалы, пленка, тара; трубы для канализации, дренажа, водо- и газоснабжения; электроизоляционный материал; термоклей; корпуса для лодок, вездеходов, деталей технической аппаратуры, предметов домашнего обихода; термоизоляция; полигоны переработки отходов, накопители жидких и твердых веществ, способных загрязнять почву и грунтовые воды (ПЭВП)
Полиэтилен высокой плотности (ПЭВП)		Полимеризация этилена при давлении 0.1–0.495 МПа	80000–300000	130–137	–50–120	75–85	
Полипропилен (ПП) изотактический		Полимеризация пропилена	300000–700000	172	–10	73–75	Упаковочные материалы, пленки, волокна, тара, трубы, детали технической аппаратуры, пластиковая посуда, предметы домашнего обихода, нетканые материалы электро-, вибро- и шумоизоляция, строительный клей, замазки, уплотняющие мастики, дорожные покрытия, липкие ленты, лабораторное оборудование (наконечники для пипеток и центрифужные пробирки)

Таблица 1. Окончание

Пластик	Структурная формула	Способ изготовления	Молекулярная масса, Да	*T* плавления, °C	*T* стеклования, °C	Степень кристалличности, %	Область применения
Поливинил-хлорид		Полимеризация винилхлорида	9000–170000	150–220	75–80	<10	Электроизоляция проводов и кабелей, строительные материалы (листы, трубы, оконные рамы, пленки для натяжных потолков, линолеум), искусственная кожа, обувные пластикаты, мебельная кромка, моющеся обои, “виниловые” грампластинки
Полиэтилен-терефталат (ПЭТ)		Поликонденсация этиленгликоля с терефталевой кислотой или переэтерификация диметилтерефталата и этиленгликоля	15000–20000	260	69–70	2.1–65	Волокно, в том числе для одежных тканей, материал для армирования автомобильных шин и других резинотехнических изделий, тара для напитков и пищевых продуктов, прозрачный строительный материал
Полистирол (ПС)		Полимеризация стирола (винилбензола) в среде бензола	50000–300000	240	100	30–35	Одноразовая посуда, детские игрушки, строительные материалы, медицинские инструменты, чашки Петри

Источники: Мельникова, 2013; Брацыхин, Шульгина, 1982; Химия и технология синтетических высокомолекулярных соединений, 1967; Lohse, 2000; Modern Polyesters: chemistry and technology, 2003; Бартнев, Френкель, 1990; Сажин и соавт., 1986).

ветвленность макромолекул: чем больше разветвлений в цепи, тем выше эластичность и меньше кристалличность полимера. Полиэтилены как низкой (ПЭНП), так и высокой плотности (ПЭВП) широко используются и востребованы практически на всех промышленных, сельскохозяйственных или бытовых рынках, главным образом, для упаковки товаров. Доля СВМПЭ в общей продукции чрезвычайно мала, но он заслуживает упоминания как весьма интересный материал, находящий все большее применение. СВМПЭ получают на металлоорганических катализаторах, его молекулярная масса более от 1.5 до 8 млн Да. Он обладает исключительной прочностью, морозостойкостью, физиологически инертен: применяется для изготовления высокопрочных технических изделий, таких как броня. СВМПЭ применяется в эндопротезировании; он также обладает исключительно низким коэффициентом трения и используется для производства искусственных "ледовых" покрытий (Захаров и соавт., 2009; Кудряшова, 2020) .

Полипропилен (ПП) также относится к полиолефинам, то есть линейным углеводородам с общей формулой C_nH_{2n}. Это высокомолекулярный продукт полимеризации пропилена при низком и среднем давлении 0.3–10 МПа и температуре 80°C на стереоспецифических катализаторах Циглера–Натта. В промышленности для производства пропилена используют продукты переработки нефти, а также природные углеводородные газы. В зависимости от способа полимеризации образуются полимеры разного стереоизомерного состава. Изотактический и синдиотактический полимеры имеют регулярно построенные цепи, располагающиеся вдоль спирали, а для атактического пластика характерна структура со стерически нерегулярной последовательностью метильных групп (Arutchelvi et al., 2008). Полипропилен – менее плотный и более твердый, чем полиэтилен, пластик, широко использующийся для производства упаковочных материалов, разнообразных товаров широкого потребления, нетканых материалов (в том числе медицинских масок), лабораторного оборудования (наконечников для пипеток и микроцентрифужных пробирок).

Поливинилхлорид (ПВХ) получают путем полимеризации винилхлорида; ему свойственна высокая химическая стойкость (устойчивость при воздействии щелочей, многих кислот и органических растворителей). Этот полимер состоит из линейных или малоразветвленных макромолекул. При низкой морозостойкости (–15°C) ПВХ является хорошим диэлектриком и находит широкое применение при изготовлении кабелей и изоляционных материалов; его используют также в производстве труб, линолеума, оконных рам, натяжных потолков и многого другого. ПВХ непосредственно для изготовления изделий не используется. Изделия изготавливают из композиционных материалов на его основе: винипласта и пластиката. Они содержат термостабилизаторы, смазки, пигменты или красители, минеральные наполнители, эластомер; пластикат к тому же содержит 30–90 массовых частей пластификатора (например, эфиров фталевой, фосфорной, себациновой или адипиновой кислот). Эти материалы используются для изготовления химической аппаратуры и коммуникаций, вентиляционных воздуховодов, труб, строительных деталей. Из прозрачного винипласта изготовляют объемную тару для пищевых продуктов, бутылки и др. Пластикат используют для изготовления изоляции и оболочек для электропроводов и кабелей, для производства шлангов, линолеума и плиток для полов, материалов для облицовки стен и обивки мебели, искусственной кожи. Прозрачные гибкие трубки из пластиката применяют в системах переливания крови и жизнеобеспечения в медицинской технике (Мельникова, 2013).

Полиэтилентерефталат (ПЭТ) представляет собой сложный эфир – продукт поликонденсации этиленгликоля с терефталевой кислотой или переэтерификации диметилтерефталата и этиленгликоля. Структура ПЭТ состоит из линейных алифатических и ароматических фрагментов. Такое чередование кристаллических и аморфных участков обеспечивает основные свойства ПЭТ: твердость и ударопрочность, прозрачность, крайне низкую газопроницаемость, водопоглощение и пластичность в холодном и нагретом состояниях (Шевлик и соавт., 2016). ПЭТ устойчив в диапазоне температур от –40 до 60°C, отличается низким коэффициентом трения и низкой гигроскопичностью. Разлагается под действием УФ-излучения (Мельникова, 2013). Основным промышленным способом получения ПЭТ является использование нефтехимических продуктов. Высокая прочность и износостойкость ПЭТ объясняются высоким содержанием ароматических терефталатных звеньев, которые ограничивают подвижность полимерных цепей (Marten et al., 2005). ПЭТ широко используется для производства тары для жидкостей и других продуктов широкого пользования, волокон и тканей (одежда).

Полистирол (ПС) – это синтетический полимер, состоящий из молекул ароматического углеводорода стирола. Химическая формула полистирола $(C_8H_8)_n$; из химических элементов он включает только углерод и водород. Степень полимеризации промышленно выпускаемых полистиролов $n = 600–2500$. Фенильные группы препятствуют упорядоченному расположению макромолекул и формированию кристаллических образований. Полистирол является гомополимером с молекулярной массой 100000–400000 г/моль. Его трудно деполимеризовать, так как вновь образованная σ-связь "углерод–углерод" прочнее, чем π-связь

винильной группы. На свойства пластика влияет характер расположения фенильных групп относительно зигзагообразной углеродной цепи. Полистирол – жесткий хрупкий аморфный полимер с высокой степенью оптического светопропускания и невысокой механической прочностью. Полистирол имеет низкую плотность (1060 кг/м^3), отличные диэлектрические свойства и хорошую морозостойкость (до −40°C). Стандартный коммерческий полистирол является атактическим, в котором фенильные группы случайным образом расположены по обеим сторонам полимерной цепи. Такое случайное расположение предотвращает образование кристаллических участков, и полимер является аморфным с температурой стеклования T_g около 90°C. Из полистирола изготавливают одноразовую посуду, упаковки, одноразовое лабораторное оборудование (чашки Петри), медицинские инструменты и стройматериалы.

Таким образом, все перечисленные пластики широко используются в самых различных областях деятельности человека. Несмотря на разные строение и структуру, их объединяет общее свойство: устойчивость к внешним воздействиям, в том числе и к биологическим факторам. Тем не менее, сейчас достоверно известно, что достаточно большое количество микроорганизмов способно разрушать пластики, используя их компоненты в качестве энергетических субстратов и источника углерода. Однако нерастворимость субстратов, крайне низкая скорость процессов, нестандартизированный состав пластиков, различная форма образцов заставляет исследователей использовать разнообразные методы детекции и количественной оценки процесса микробной деструкции пластиков.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБНОГО РАЗЛОЖЕНИЯ ПЛАСТИКОВ

Все рассматриваемые в этом обзоре наиболее широко используемые пластики нерастворимы в воде. Взаимодействие микроорганизмов с субстратом происходит на границе раздела фаз, и поэтому их биодеградации предшествует образование биопленок. Роль биопленок в разложении биопластиков подробно рассмотрена в недавнем обзоре В.К. Плакунова и соавт. (2020). Также ряд работ посвящен анализу микробного состава биопленок, образующихся на поверхности образцов различных видов пластика при инкубации их в природных местообитаниях. Так, например, был проанализирован состав биопленок, развивавшихся на образцах ПС во время их инкубации в воде Черного моря и оборотной воде нефтехимического производства в течение 60 сут, и выявлена его специфичность к материалу образцов (Турова и соавт., 2020). Одновременно было отмечено изменение состояния ПС (Лаптев и др., 2019).

Существует два принципиально разных подхода к исследованию процесса разложения пластика микроорганизмами: 1) тестирование чистых культур на способность к разложению пластика; 2) инкубация образцов пластика в присутствии природных проб или непосредственно в природных местообитаниях – почве, компосте, мусорных полигонах, воде или осадках водоемов. В последнем случае упор делается на естественный отбор штаммов, обладающих искомыми активностями.

Собственно процесс биодеградации пластиков предлагается разделить на четыре этапа (Sharma, 2018; Montazer et al., 2019):

1) биодетериорацию, состоящую в изменении свойств полимера и облегчающую его дальнейшее разложение;

2) биофрагментацию, которая приводит к гидролизу и фрагментации углеродных цепей полимера, а также к выделению промежуточных продуктов разложения;

3) биоассимиляцию, при которой мелкие углеводородные фрагменты-метаболиты метаболизируются клетками и включаются в биомассу микроорганизмов;

4) минерализацию, которая сопровождает полное разрушение пластика до CO_2 и воды.

Для каждого из этапов существует набор методов, позволяющих достоверно зарегистрировать происходящие с пластиком изменения. Основные методы детекции микробной биодеградации пластиков представлены в табл. 2.

Первичную информацию об изменениях, происходящих на поверхности пластика, можно получить с помощью различных видов микроскопии. Наиболее часто используется сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) отмытых от клеток образцов, в сравнении с контрольными образцами, инкубировавшимися в отсутствие микроорганизмов. Может быть использована атомно-силовая микроскопия и другие подходы, позволяющие изучить поверхность полимера. Используются и другие методы, позволяющие определить изменения в структуре пластика, например, проверка образцов пластика, инкубированных в присутствии микробных культур, на изменение его механических свойств (прочность на разрыв, удлинение при разрыве, модуль упругости и предел текучести).

Биофрагментация регистрируется по уменьшению средней молекулярной массы углеродных цепей полимера (M_n) и расширению молекулярно-массового распределения, определяемых с помощью гель-проникающей хроматографии, а также путем регистрации промежуточных продуктов разложения пластика, для чего используются спектрофотометрия, ГХ-МС, ВЭЖХ, ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье и ядерный

Таблица 2. Основные методы детекции микробной биодеградации пластиков

Анализируемый параметр	Метод	Признаки биодеградации пластика	Ссылки
Характер поверхности пластика	Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), атомно-силовая микроскопия (АСМ)	Изменение структуры поверхности – образование микротрещин, отверстий, перепадов высоты рельефа	Muhonja et al., 2018; Skariyachan et al., 2018; Sarmah, Rout, 2018; Delacuvellerie et al., 2019; Park, Kim, 2019; etc.
Предел прочности при растяжении (Tensile strength, TS) и удлинение при разрыве (EAB, extension at break)	Тензиометрия	Снижение TS и EAB (при деградации ПЭНП)	Skariyachan et al., 2016
Температура стеклования (перехода в “стекловидное” состояние)	Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC)	Снижение температуры стеклования	Lucas et al., 2008; Park, Kim, 2019
Измерение степени кристалличности	Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR)	Степень кристалличности повышается при биодеградации за счет “выедания” аморфной части ПЭ	Sen, Raut, 2015; Das, Kumar, 2015
Гидрофобность	Измерение контактного угла, BATH-тест	Уменьшение угла (увеличение гидрофильности)	Koutny et al., 2006; Das, Kumar, 2015
Остаточная масса полимера	Гравиметрия (взвешивание)	Снижение массы пластика	Sarmah, Rout, 2018; ; Mohan Rasu et al., 2018; Skariyachan et al., 2018; Park, Delacuvellerie et al., 2019; Kim, 2019
Химический состав	Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR)	Увеличение карбонильного индекса,образованиеинтермедиатов с дополнительными функциональными группами (карбонильными/карбоксильными), алканов; появление новых пиков, соответствующих карбонильным и простым эфирным связям	Muhonja et al., 2018; Skariyachan et al., 2018; Park, Kim, 2019; Sarmah, Rout, 2018; Delacuvellerie et al., 2019
Молекулярный вес	Ядерный магнитный резонанс (NMR, ЯМР), газовая хроматография/масс-спектрометрия (GC-MS, ГХ-МС), гель-проникающая хроматография (GPC, ГПХ)	Снижение средней молекулярной массы	Sarmah, Rout, 2018; Muhonja et al., 2018; Skariyachan et al., 2018; Park, Kim, 2019; Yamada-Onodera et al., 2001
Увеличение микробной биомассы	Анализ содержания белка (биомассы)	Увеличение количества микробного белка в присутствии полимера	Sarmah, Rout, 2018

магнитный резонанс. В частности, ИК-спектроскопия (FTIR, Fourier-transform infrared spectroscopy) позволяет получить данные о содержании в образце различных связей между атомами, таких как C–C, C–Cl, C–O, C=O и т.д. Изменение спектра может свидетельствовать о процессах окисления, дехлорирования (в случае ПВХ), разрушения цепей полимера. Термогравиметрический анализ позволяет оценить термостабильность пластика, которая теоретически будет снижаться при уменьшении и разрыве цепей полимера, но увеличиваться при разрушении или вымывании пластификаторов.

На этом и последующих этапах используется также наиболее прямой метод определения разложения пластика микроорганизмами – гравиметрический, для чего образцы пластика должны быть тщательно отмыты от ассоциированных с ними клеток.

Для некоторых пластиков, например, для ПЭТ, может быть использован ряд спектрофотометрических методов, основанных на обнаружении изменения оптической плотности культуральной жидкости, как напрямую, вследствие образования соединений, поглощающих свет, так и с применением индикатора, реагирующего на изменения pH (Pirillo et al., 2021).

Биоассимиляция пластика определяется по увеличению выхода биомассы клеток в культуре, растущей в присутствии пластика, например, по определению количества образовавшегося клеточного белка в сравнении с контролем.

Наконец, минерализация пластика определяется по количеству образовавшегося CO_2 или, в случае анаэробного процесса, продуктов терминальных восстановительных реакций – CH_4, H_2S, восстановленных соединений азота и пр.

В качестве вспомогательного метода, позволяющего провести скрининг изолятов, можно использовать тест на чашке с агаром, в котором полимер диспергируется в виде взвеси очень мелких частиц (порошка). Вокруг колонии микроорганизма, разрушающего пластик, образуется зона просветления.

Наконец, высокоточным методом является использование пластиков, меченых ^{14}C-радиоактивными изотопами (Silelicki et al., 1978), и определение метки в образовавшихся продуктах – $^{14}CO_2$ или $^{14}CH_4$. На этот метод не влияет присутствие биоразлагаемых примесей или добавок в полимере, однако его применение ограничивается сложностью проведения и стоимостью синтеза радиоактивно меченых полимеров.

Как правило, исследователи используют комплекс методов (Müller, 2005; Lucas et al., 2008; Ru et al., 2020), позволяющих зафиксировать изменения полимера, состояние микробной культуры, образование промежуточных или конечных продуктов разложения пластика.

ПРИМЕРЫ БИОДЕГРАДАЦИИ ПЛАСТИКОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Несмотря на трудоемкость исследований и сложность получения достоверных результатов, в последние два десятилетия появилось большое количество экспериментальных работ, демонстрирующих микробную деградацию пластиков с помощью перечисленных в предыдущем разделе методов. Здесь мы приведем лишь некоторые из них.

Так, биодеградация полиэтилена микроорганизмами была описана в ряде работ, опубликованных за последние 30 лет, и сейчас является одной из основных тем исследований в области разложения пластиков (Shah et al., 2008; Ammala et al., 2011; Sen, Raut 2015; Harrison et al., 2018); общепризнанным является тот факт, что процесс биодеградации в нормальных условиях протекает чрезвычайно медленно. Известно, что ПЭ, имеющий простую линейную структуру, чрезвычайно устойчив к биоразложению. Низкая скорость биоразложения ПЭ связана также с его высокой гидрофобностью (в состав молекул входят только $-CH_2$ группы) и высокой молекулярной массой (более 30 кДа), что препятствует его транспорту непосредственно в клетки (Orr et al., 2004; Sivan et al., 2006). Было показано, что в случае, когда ПЭ был единственным источником энергии для микроорганизмов, фрагменты меньшего размера использовались быстрее, чем более крупные (Kawai et al., 2004). Также сообщалось, что для достижения значимой степени биоразложения за разумный период времени средняя молекулярная масса полиэтилена должна быть ниже 5000 Да (Reddy et al., 2009). Разветвленная структура делает цепи ПЭНП более доступными, а третичные атомы углерода в местах разветвления – более уязвимыми для атаки. Молярная масса ПЭВП намного выше, что, возможно, затрудняет доступ микроорганизмов и их ферментов к полимерным цепям (Sudhakar et al., 2008; Fontanella et al., 2010). Показано, что структурные вариации полиэтиленовых полимеров, образующиеся во время полимеризации и последующей обработки, такие как ненасыщенные двойные углерод-углеродные связи, карбонильные группы и гидропероксидные группы (Ojeda et al., 2011), первыми потребляются бактериями, что приводит к быстрому росту микроорганизмов. Если для первых двух этапов, биоразрушения (биодетериорации) и биофрагментации ПЭ, было приведено достаточно фактов и доказательств их именно микробного происхождения (Albertsson, Karlsson, 1990; Ammala et al., 2011), то доказательства биоассимиляции и полной минерализации ПЭ весьма немногочисленны (Yang et al., 2014; Sen, Raut, 2016; Montazer et al., 2019).

В табл. 3 приведены примеры исследования разложения ПЭ, представленные в различных публикациях. Из-за большого разнообразия используемых полиэтиленовых материалов и широкого диапазона условий культивирования сравнение различных результатов биодеградации зачастую весьма затруднено. Это подчеркивает необходимость стандартизированных методов и протоколов для систематического изучения биоразложения синтетических пластмасс, как это было предложено Montazer и соавт. (Montazer et al., 2020).

О процессе деградации полипропилена известно очень мало. Очевидно, однако, что длинные молекулы, высокоупорядоченная структура, отсутствие групп, доступных для окисления, а также наличие боковой метильной группы затрудняют деградацию ПП (Jeon, Kim, 2016). Как правило, при инкубации образцов ПП с микроорганизмами отмечают уменьшение массы пластика, однако значения могут варьировать от 0.43% за 12 мес. (Arkatkar et al., 2009) до 6.4% за 40 сут (Auta et al., 2018) для чистого ПП и бактериальных культур, и от 1.4% за 3 мес. (Sheik et al., 2015) до 18% за 12 мес. для ПП, содержащего катализатор, и культур различных микромицетов – *Phanerochaete chrysosporium*, *Engyodontium album* (Jeyakumar et al., 2013). Биоразложение ПП оценивают по образованию биопленок, увеличению содержания белка или АТФ в культуре по сравнению с контролем без пластика, по уменьшению молекулярной массы полимера, увеличению степени гидрофильности поверхности, изменению ИК-спектров.

Проблема изучения биодеградации отходов поливинилхлорида (ПВХ) связана с высоким содержанием в типичных бытовых изделиях из этого материала различных добавок: пластификаторов, термостабилизаторов, антипиренов, биоцидов, доля которых может доходить до 50–75%. Хорошо известна способность многих микроорганизмов расти на питательных средах с пластификаторами в качестве единственного источника углерода и энергии (Berk et al., 1957; Booth et al., 1968; Webb et al., 2000; Nakamiya et al., 2005; Sabev et al., 2006; Das et al., 2012). Поэтому снижение веса пластика под воздействием микроорганизмов, или изменение таких физических свойств как гибкость и прочность на разрыв может быть связано не столько с разрушением цепей ПВХ, сколько с уменьшением доли добавок (Luzia et al., 2020; Ru et al., 2020). Решить эту проблему можно либо используя чистый порошок ПВХ (Wu et al., 2017) или пластинки чистого ПВХ, получаемые исследователями в лаборатории растворением коммерческого препарата в тетрагидрофуране (Kirbas et al., 1999; Ali et al., 2014; Khatoon et al., 2019), либо прибегая к дополнительным методам анализа. Среди них наиболее часто применяют ИК-спектроскопию, термогравиметрический анализ и гельпроникающую хроматографию (Raddadi, Fava, 2019).

Высокая прочность и износостойкость ПЭТ объясняются высоким содержанием ароматических терефталатных звеньев, которые ограничивают подвижность полимерных цепей (Marten et al., 2005) и делают ПЭТ чрезвычайно устойчивым к микробной деградации (Andredy, 1994; Zheng et al., 2005; Müller, 2006; Tokiwa et al., 2009). Степень кристалличности таких синтетических полимеров, которая обычно превышает 30–40% (Liu et al., 2004; Lee et al., 2013), а также гидрофобность поверхности в значительной степени влияют на их биоразлагаемость, так как воздействие ферментов микроорганизмов происходит, прежде всего, на аморфные участки пластика и имеет наиболее важное значение при первичной адгезии потенциальных деструкторов (Urgun-Demirtas et al., 2007; Wang et al., 2016).

Несмотря на аморфность полистирола, действие ферментов на полимер крайне затруднено, поскольку его молекулы имеют высокую молекулярную массу и неполярны, а сам полимер нерастворим в воде (Motta et al., 2009). Кроме того, боковые фенильные группы, неупорядоченно распределенные в пространстве, очень устойчивы к биоразложению (Atlas, Barta, 1987). Сведения о микробном разрушении ПС противоречивы. Так, ряд исследователей считает, что полистирол устойчив к действию микроорганизмов. Например, выделенные из почвы чистые культуры *Microbacterium* sp. NA23, *Paenibacillus urinalis* NA26, *Bacillus* sp. NB6, *Pseudomonas aeruginosa* NB26 не показали активности по отношению к пленке ПС в течение 8 мес. (Atiq et al., 2010), а лист ПС, закопанный в почву на 32 года, не имел признаков деградации (Otake et al., 1995). Другие исследователи отмечают, что полистирол разрушается микроорганизмами очень медленно, так как на 75% состоит из ароматических соединений и имеет высокую молекулярную массу. Гидрофобный характер ПС способствует его устойчивости к гидролизу, а также влияет на способность микроорганизмов прикрепиться к его поверхности. Высокая молекулярная масса и плохая растворимость в воде не позволяют микробным клеткам транспортировать ПС через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану для метаболизма. Образуемые микроорганизмами экзоферменты не могут проникнуть внутрь полимера и действуют на поверхности. В исследованиях по биодеградации ПС чаще всего применяются визуальные наблюдения за изменениями поверхности образца и его цвета, а также за появлением и развитием микробных биообрастаний с использованием флуоресцентной (для оценки жизнеспособности микробных клеток) и сканирующей электронной микроскопии; гравиметрия; детекция образовав-

Таблица 3. Разложение ПЭ бактериями

Род и вид	Источник	Время инкубации	Условия эксперимента	Результат биодеградации	Ссылка
Phormidium lucidum, Oscillatoria subbrevis	Бытовые сточные воды	42 сут	Пленка ПЭНП без обработки	Потеря веса 30%	Sarmah, Rout, 2018
Acinetobacter baumannii	Городская свалка	30 сут	37°C, ПЭ без обработки	Образование биомассы	Pramila, Ramesh, 2015
Achromobacter xylosoxidans	Почва с мусорных полигонов	50 сут	27°C, пленка ПЭВП	Потеря веса 9%	Kowalczyk et al., 2016
Alcanivorax borkumensis	Средиземное море	80 сут	Пленка ПЭВП	Потеря веса 3.5%	Delacuvellerie et al., 2019
Aneurinibacillus sp., *Brevibacillus* spp.	Мусорные полигоны и очистные сооружения	140 сут	50°C, полоски и гранулы ПЭВП Н	ПЭНП, ПЭВП полоски: 58.21 и 46.6% ПЭНП, ПЭВП гранулы: 45.7 и 37.2%	Skariyachan et al., 2018
Bacillus cereus	Мусорная свалка (Африка)	16 нед.	37°C, пленки из ПЭНП	Потеря веса 35.72%	Muhonja et al., 2018
Bacillus pumilus Bacillus subtillis	Пелагические воды	30 сут	Пластиковые пакеты из ПЭ	Потеря веса 1.5–1.75%	Harshvardhan, Jha, 2013
Brevibacillus borstelensis	DSMZ	90 сут	50°C, УФ-облученный ПЭНП	Потеря веса 11%	Hadad et al., 2005
Cupriavidus necator	Почва мусорного полигона	21 сут	Порошок ПЭНП	Потеря веса 33.7%	Montazer et al., 2019
Delftia sp.	Пластиковый мусор в почве	90 сут	ПЭНП без обработки	Изменения химических свойств	Peixoto et al., 2017
Kocuria palustris M16	Пелагические воды	30 сут	Пластиковые пакеты из ПЭ	Потеря веса 1%	Harshvardhan, Jha, 2013
Klebsiella pneumoniae	Лабораторный изолят	60 сут	Пленка ПЭНП, предобработка сухим горячим воздухом (70°C, 10 сут)	Потеря веса 18.4%	Awasthi et al., 2017
Lysinibacillus xylanilyticus, Aspergillus niger	Почва свалки, Тегеран	126 сут	Пленки ПЭ облученные и без облучения	Потеря веса 29.5 и 15.8%, для облученного и необлученного ПЭНП соответственно	Esmaeili et al., 2013
Microbacterium paraoxydans	GenBank ID	2 мес.	Обработанный ПЭНП	Потеря веса 61%	Rajandas et al., 2012
Micrococcus luteus	Почва мусорного полигона	21 сут	Порошок ПЭНП	Потеря веса 18.9%	Montazer et al., 2019
Pseudomonas aeruginosa	Почва пляжа, загрязненная нефтью	80 сут	Низкомолекулярный ПЭ (LMWPE)	Потеря веса 40.8%	Jeon, Kim, 2015
Pseudomonas citronellolis	Городская свалка	4 сут	Пленки ПЭНП	Потеря веса 17.8%	Bhatia et al., 2014
Rhodococcus ruber	Почва, загрязненная PE мусором	4 нед.	Обработанный УФ ПЭНП	Потеря веса до 8%	Gilan et al., 2004
Rhodococcus sp.	Свалка отходов	3 нед.	Обработанный ПЭНР	Потеря веса 33%	Nanda, Sahu, 2010
Stentrophomonas sp.	Пластиковый мусор в почве	90 сут	ПЭНП без обработки	Изменения химических свойств	Peixoto et al., 2017

шихся интермедиатов путем спектрофотометрии (для ароматических соединений), газовой хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и инфракрасной спектроскопии Фурье; оценка потребления и выделения газов.

Таким образом, несмотря на большие методические сложности, ряд разработанных специально для решения задачи разложения пластика методов позволяет достоверно продемонстрировать процесс деструкции основных видов пластиков, осуществляемых бактериями и грибами. Аналогичная информация об участии в этих процессах архей пока отсутствует. К сожалению, из-за различий между используемыми субстратами, а также формы образцов (пленки, порошок, гранулы и пр.) результаты невозможно сравнивать между собой. Очередной задачей исследователей является создание единого протокола исследования разложения пластиков, который должен будет решить эту задачу.

РАЗНООБРАЗИЕ СВОБОДНОЖИВУЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ПРОЦЕСС БИОДЕГРАДАЦИИ ПЛАСТИКОВ

Несмотря на то, что процесс разложения пластиков идет очень медленно, способность осуществлять его была найдена у многих бактерий и микромицетов.

Микроорганизмы, разлагающие ПЭ и другие виды пластика, чаще всего выделяли из почвы, мусорных полигонов, компоста, морской воды и активного ила (Montazer et al., 2020). Так, описана биофрагментация и использование в качестве источника углерода и энергии ПЭНП, не подвергавшегося предварительной обработке, штаммами *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter pittii* и *Micrococcus luteus* (Montazer et al., 2019). Процесс сопровождался образованием алканов и накоплением в клетках биоразлагаемых полимеров – полигидроксиалканоатов. Известно более чем 20 родов бактерий, для которых показана возможность биодеградации различных типов ПЭ (Ghatge et al., 2020). Бактерии, способные к разложению ПЭ, и скорости осуществляемого процесса представлены в табл. 2. Способность разлагать ПЭ была обнаружена также у грибов родов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Zalerion* (El-Shafei et al., 1998; Yamada-Onodera et al., 2001; Volke-Sepúlveda et al., 2002; Bonhomme et al., 2003; Manzur et al., 2004; Koutny et al., 2006; Hasan et al., 2007; Ahebnazar et al., 2010; Nowak et al., 2011; Pramila, Ramesh, 2011; Sheik et al., 2015; Paco et al., 2017). Грибы обладают мощной ферментативной системой и способностью выживать в жестких условиях окружающей среды при низком содержании питательных веществ и влаги. Помимо этого, они обладают способностью широко распространять гифы, которые могут проникать в трещины и углубления в пластике (Jeyakumar et al., 2013).

Для бактерий родов *Bacillus* spp. (Sudhakar et al., 2008; Abrusci et al., 2013), *Rhodococcus* spp. (Bonhomme et al., 2003; Gilan et al., 2004; Fontanella et al., 2010) и *Pseudomonas* spp. (Rajandas et al., 2012), а также для грибов родов *Aspergillus* и *Fusarium* (Hasan et al., 2007; Sahebnazar et al., 2010), была показана деполимеризация ПЭ после различных видов предварительной обработки, такой как ультрафиолетовое облучение (УФ) и/или термическая обработка, которая делает углеродные цепи полимера чувствительными к биоразложению (Ammala et al., 2011).

Сообщения об успешной микробной деградации полипропилена весьма немногочислены. Так, было показано, что консорциум бактерий (*Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Brevibacillus* sp., *B. agri*, and *B. brevi*), выделенных из водоочистных сооружений и мусорных полигонов, за 140 сут инкубации при 50°C уменьшил массу ПП-гранул на 44%, а пленок – на 56% (Skariyachan et al., 2008). Гравиметрические показатели были подтверждены данными ИК-спектроскопии Фурье, СЭМ и рядом других методов. Рост на минеральной среде с ПП как единственным источником углерода и энергии, сопровождавшийся уменьшением массы ПП, был показан для *Bacillus cereus* и *Sporosarcina globispora* (Auta et al., 2017). Однако основная часть положительных результатов по микробной деградации ПП была получена в результате предобработки пластика и будет освещена ниже.

Исследование способности грибов и бактерий к разложению ПВХ оказалась затруднена присутствием в этом пластике пластификаторов, которые могут являться истинными субстратами растущих на ПВХ микроорганизмов (Kirbas et al., 1999; Webb et al., 2000; Peciulyte, 2002; Sabev et al., 2006). В опытах с чистым ПВХ была продемонстрирована активность *Phanerocheate chrysosporium*, *Lentinus tigrinus*, A*spergillus niger* и *A. sydowii*, подтвержденная увеличением биомассы грибов, выделением CO_2 и сканирующей электронной микроскопией образца (Ali et al., 2014). Авторы продемонстрировали рост гриба на среде с пластиком, снижение массы лишенного пластификаторов и примесей полимера на 31% за 2 мес., минерализацию (к четвертой неделе выделение CO_2 составило 13.74 мг/л), а также сопутствующее росту биомассы усиление активности пероксидазы. Источником грибов, способных разлагать ПВХ, может быть загрязненная этим пластиком почва. Недавно было показано, что подобные условия привели к селекции штаммов *Mucor* sp. и *Penicillium* sp., способных расти на среде с ПВХ и, основываясь на результатах ИК-спектрометрии, вызвать частичное разрушение пластика (Pardo-Rodríguez, Zorro-Mateus, 2021).

Бактерий, участвующих в повреждении изделий из ПВХ, начали изучать одновременно с грибами. В одной из первых работ выделенные с поверхности пластиковых изделий представители родов *Pseudomonas*, *Brevibacterium* и *Achromobacter* в лабораторных условиях снижали на 20% вес и уменьшали гибкость ПВХ с пластификатором ди-*изо*-октилсебацинатом (Booth et al., 1968). Тем не менее, работ о воздействии бактерий на ПВХ значительно меньше, чем о воздействии грибов, и многие из имеющихся связаны с утилизацией пластификаторов. Наибольший интерес представляет исследование биодеградации пленок ПВХ культурами *Bacillus flexus* и *Pseudomonas citronellolis*. Обе культуры за 45 сут инкубации вызвали фрагментацию пленок ПВХ, изменение данных ИК-спектроскопии, уменьшение термостабильности и снижение M_n примерно на 10%, а *P. citronellosis* вызывал уменьшение гравиметрического веса образцов ПВХ на 19% в течение 30 сут (Giacomucci et al., 2019). Авторы отмечают, что используемые ими пленки содержали до 30% различных добавок (цитраты, адипаты и полиадипаты, эпоксидированное соевое масло, Zn), и полученные результаты позволяют предполагать разрушение как цепей полимера, так и добавок. Искусственный консорциум из *Pseudomonas otitidis*, *Bacillus aerius*, *B. cereus* и *Acanthopleurobacter pedis* вносили в экспериментальные образцы почвы с погруженными в нее пластиковыми пленками (Anwar et al., 2016). По сравнению с контрольными почвенными образцами добавление консорциума не только привело к значительному повреждению поверхности пластика (данные СЭМ) и изменению профилей ИК- и УФ-спектроскопии, но также к снижению M_n на 78.5% (с 72.65 до 15.63 кДа за 9 мес.; до 66.61 кДа в контроле), что указывает на разрушение цепей полимера. Этот исключительный результат сильно выбивается из результатов аналогичных работ и требует дополнительного подтверждения.

Разложением ПЭТ занимаются много и активно, и наиболее выдающиеся результаты, достигнутые с помощью использования ПЭТ-разлагающих ферментов, будут изложены в соответствующем разделе обзора. Нельзя не упомянуть, однако, наиболее известный микроорганизм, эффективно разлагающий ПЭТ – *Ideonella sakaiensis* (Yoshida et al., 2016). *I. sakaiensis* вызывает практически полную дегредацию пленок РЭТ за 6 нед. инкубации при 30°C. Однако основными источниками ферментов, разлагающих ПЭТ, в настоящее время являются термофильные актинобактерии, выделяемые из компоста и развивающиеся при температуре 50–60°C, способствующей деградации полимерного субстрата, – *Thermomonospora fusca* (Kleeberg et al., 1998), *Thermobifida alba* (Hu et al., 2010), *Saccharomonospora viridis* (Kawai et al., 2014), *Thermomonospora kurvata* (Wei et al., 2014).

Данных по разложению полистирола микроорганизмами довольно много, но они противоречивы и трудно поддаются сравнению из-за различий в структуре полимера и разных методов детекции его разложения. Так, при том, что большинство клеток *Rhodococcus ruber* прикрепилось к субстрату (ПС) в течение нескольких часов, 0.8% снижение массы полимера было отмечено лишь после 8 нед. культивирования (Mor, Sivan, 2008). Из проб, полученных с полей орошения в Индии, были выделены два штамма бактерий *Exiguobacterium sibiricum* и *Exiguobacterium undae*, способных использовать твердый прозрачный ПС и гранулы ПС как источник углерода и энергии (Chauhan et al., 2018). С помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что поверхность становится более шероховатой, что приводит к снижению ее гидрофобности. ИК-спектроскопия Фурье показала, что образуются окисленные группировки в молекулах, а гравиметрия подтвердила убыль массы ПС на 0.4% за 30 сут. Однако штамм *Bacillus paralicheniformis*, выделенный из Аравийского моря, был способен разрушать 34% по массе пленки ПС за 60 сут (Kumar et al., 2021). Для грибов рода *Curvularia* было показано, что гифы “прилипают” к поверхности атактического полистирола и проникают в нее; при этом потеря массы составила 2–5% за 2–3 мес. (Motta et al., 2009). При инкубации *Enterobacter* sp., *Citrobacter sedlakii*, *Alcaligenes* sp., *Brevundimonas diminuta* с ПС как единственным источником углерода и энергии показали до 12% убыли субстрата за месяц. Установлено, что грибы бурой гнили *Gloeophyllum striatum* и *Gloeophyllum trabeum* способны атаковать ПС с помощью реакций Фентона при участии гидрохинона, при этом после 20 сут инкубации происходит существенная деполимеризация ПС и снижение молекулярной массы почти на 50% (Krueger et al., 2015). Факт биодеградации лигнополистирола грибами белой гнили *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* и *Trametes versicolor* был отмечен еще в 1992 г. (Milstein et al., 1992). Восьминедельная инкубация *Cephalosporium* sp. с ПС привела к потере массы пластика на 2.17 ± 0.16%, а с *Mucor* sp. – на 1.81 ± 0.13%, что было дополнительно подтверждено регистрацией изменений поверхности ПС от гладкой к шероховатой, снижением pH среды, появлением интермедиатов и снижением молекулярной массы (Chaudhary et al., 2019).

Наряду с исследованием чистых культур, микробное разложение ПС исследовалось и для природных ассоциаций микроорганизмов. Присутствие ПС вызывало сукцессию микробного сообщества активного ила в аэробных и анаэробных условиях (Wei et al., 2020). Микроорганизмы активного ила образовывали на кубиках ПС биопленки, увеличивающиеся с первой по девятую недели инкубации. Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектроскопия выявили изменения в

структуре ПС, а ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье показала появление в среде интермедиатов неизвестного состава. При добавлении двух типов меченого изотопом ^{14}C полистирола (α- и β-^{14}C) к почве и активному илу сточных вод оказалось, что через 8 нед. только 0.01% ПС окислился до $^{14}CO_2$, а через 75 сут общий уровень конверсии составил 0.7% (Giullet et al., 1974). Невысокие активности зафиксированы при деградации ^{14}C-ПС смешанными культурами 17 штаммов лигнинразрушающих грибов, а также микробными сообществами ила, различных почв, навоза и мусорной свалки (от 0.04 до 3.0% за 16 нед.) (Sielicki et al., 1978; Kaplan et al., 1979). Существенно более высокие скорости деградации пенополистирола выявили в образцах с мусорной свалки Саримукти, Индонезия, где убыль массы пеноПС за 7 нед. инкубации составила 18.23% (Hidayat et al., 2020). СЭМ показала образование пор на поверхности пластика, а ИК-спектроскопия Фурье подтвердила образование более простых функциональных групп в молекулах и появление С–О-групп. Предполагается, что в разложении пенополистирола участвовали бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus*.

МИКРООРГАНИЗМЫ-СИМБИОНТЫ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ, РАЗЛАГАЮЩИЕ ПЛАСТИК

Известно, что ряд беспозвоночных животных может потреблять пластики, и в последние годы интерес к этому явлению, а также к микробиомам кишечника этих организмов резко возрос. Первое упоминание о том, что некоторые насекомые могут оставлять отверстия в полиэтиленовой упаковке относится к 2007 г. (Riudavets et al., 2007). Позднее из кишечника *Plodia interpunctella* (южной амбарной огневки) были выделены штаммы *Enterobacter asburiae* и *Bacillus* sp., способные разрушать ПЭ в виде пленки за 60 сут на 6 и 10% соответственно, с уменьшением молекулярного веса остаточного ПЭ.

Описана способность личинок большой восковой моли *Galleria mellonella* быстро разлагать полиэтилен (убыль массы составила 13% за 14 ч) с образованием этиленгликоля (по данным Фурье-инфракрасной спектроскопии). Из кишечника личинок *G. mellonella* был выделен штамм *Enterobacter* sp., вызывающий изменения физических и химических свойств пленки ПЭ, зарегистрированные методами Фурье-инфракрасной спектроскопии, ЖХ-МС, СЭМ и АСМ после 31 сут инкубации (Ren et al., 2019). Личинки *G. mellonella* проявили также способность к деградации ПС (Lou et al., 2020): происходила значительная потеря массы пластика, появление С=О и С–О-групп в молекулах и образование длинноцепочечных жирных кислот. Изучение состава микробиоты кишечника личинок *G. mellonella* показало, что при употреблении пластика в кишечнике начинают доминировать представители родов *Bacillus* и *Serratia*. При этом разрушение ПС отдельными выделенными штаммами шло менее эффективно, чем кишечным сообществом в целом.

Позднее была описана биодеградация ПЭ и других пластиков личинками различных насекомых, таких как мучной хрущак *Tenebrio molitor* (Billen et al., 2020), темный хрущак *Tenebrio obscurus* (Brandon et al., 2018; Peng et al., 2019), супер хрущак *Zophobas atratus* (Peng et al., 2020), малая пчелиная огневка *Achroia grisella* (Kundungal et al., 2019), а также улитками *Achatina fulita* (Song et al., 2020). Из кишечника личинок *T. molitor* были выделены штаммы *Acinetobacter* sp. и *Bacillus* sp., способные к росту на ПЭНП только в кокультуре; при этом масса ПЭНП за 30 сут снижалась на 18% (Yin et al., 2020).

Интересные результаты показаны для личинок мучного хрущака *T. molitor*, способных расти, используя в качестве корма порошок ПВХ (Peng et al., 2020). Происходила частичная деградация цепей полимера до небольших хлорорганических соединений, и снижение M_n на 33.4–36.4%. Однако полная минерализации пластика шла очень медленно. Подобная активность *Tenebrio molitor* была продемонстрирована также для полиэтилена и полистирола (Wu et al., 2019). Важно отметить, что добавление в корм антибиотика значительно снижало эффективность биодеградации, что свидетельствует о роли микробиома кишечника личинок в этом процессе. Анализ вариабельных фрагментов генов 16S рРНК кишечного сообщества личинок показало преимущественное развитие на корме из ПВХ представителей семейств *Streptococcaceae* (в основном род *Lactococcus*), *Spiroplasmataceae*, *Enterobacteriaceae* и *Clostridiaceae*, не доминировавших на стандартном корме из отрубей.

Способность разрушать ПС была изучена для личинок двух разновидностей мучного хрущака (*T. molitor* и *T. obscurus*) и их микробиоты (Yang et al., 2015a, 2015b; Peng et al., 2019). По данным радиоизотопного анализа за 24 ч 47.7% меченого ^{13}C пеноПС минерализовалось до CO_2, 49.2% выделялось с фекалиями, и небольшая часть встраивалась в липиды. С помощью ГХ-МС были зарегистрированы следующие интермедиаты разложения полистирола: пентанон, 4-гидрокси-4-метилбензен, 2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанол, оксалат, бутил-6-этилокт-3-ил-эфир, фенол, 2,4-*бис*(1,1-диметилэтил), 1,2-бензендикарбоксилат, бутил-2-метилпропиловый эфир. Микробное сообщество кишечника личинок при употреблении в пищу пеноПС претерпевало значительную сукцессию: от преобладания молочнокислых и энте-

робактерий к доминированию стрептококков, а затем спироплазм и энтерококков. Важная роль кишечной микробиоты в процессе деградации пеноПС была доказана подавлением ее активности с помощью антибиотиков, что практически прекращало разложение пластика. Из кишечника личинок были выделены и идентифицированы 30 изолятов, которые затем инкубировали как чистые культуры в течение 28 сут в присутствии ПС. Значимый прирост числа клеток показали штаммы *Bacillus cereus*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Chryseobacterium* sp., *Exiguobacterium* sp.; при росте последнего организма на ПС в течение 60 сут в культуральной жидкости с помощью ГХ были выявлены многочисленные пики интермедиатов, а пластик потерял около 7.5% массы.

Личинка *Zophobas atratus* потребляла в сутки 0.58 г – в 4 раза больше, чем личинки мучного хрущака. С помощью различных методов анализа было доказано, что в ее кишечнике происходит деполимеризация ПС и образование низкомолекулярных интермедиатов, при этом 36.7% углерода пеноПС минерализуется до CO_2 в течение 16 сут (Yang et al., 2020). Из кишечника личинки *Zophobas atratus* был выделен штамм *Pseudomonas aeruginosa*, способный к деградации ПС, и показано, что в процессе разрушения ПС повышается экспрессия сериновой гидролазы (Kim et al., 2020). Личинки жука *Plesiophthalmus davidis* за 14 сут потребили 34.27 ± 4.04 мг пеноПС на личинку и выжили, питаясь только этим пластиком. После 20 сут инкубации накопительных культур кишечной микробиоты этого насекомого с ПС наблюдали образование биопленок на поверхности пластика и ее морфологические изменения (образование полостей). ИК-спектроскопия Фурье показала появление С–О-связей в молекулах. Анализ микробного сообщества показал, что в кишечнике в значительных количествах присутствовала *Serratia marcescens*; при кормлении личинок ПС в течение 2-х нед. ее количество увеличивалось в 6 раз (Woo et al., 2020).

Недавно была исследована способность широко распространенного вида улитки *Achatina fulica* перерабатывать пеноПС (Song et al., 2020). Улитка потребляла18.5 ± 2.9 мг ПС в течение 4 нед., выделяла микропластик с суммарной потерей массы в среднем на 30.7%. Аналитические методы подтвердили изменение молекулярной массы остаточного ПС и образование окисленных групп в молекулах. Анализ микробного сообщества с помощью высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК выявил существенные сдвиги в сторону увеличения представителей семейств *Enterobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* и *Aeromonadaceae*, что указывает на их возможное участие в процессе биодеградации.

МЕХАНИЗМЫ МИКРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ПЛАСТИКОВ

Полиэтилен и другие пластики, содержащие только углерод-углеродные связи в основной цепи, очень устойчивы к внешним воздействиям, в том числе и к микробному разложению (Wei, Zimmermann, 2017); тем не менее, у микроорганизмов существует целый ряд механизмов, приводящих к их деградации (Sheel, Pant, 2018). В процессе микробной биодеградации ПЭ, как правило, происходит биофрагментация полимера микробными ферментами с последующей биоассимиляцией получившихся мелких (с молярной массой меньше 500 г/моль) фрагментов (Bonhomme et al., 2003; Montazer et al., 2019).

В настоящее время известны две группы ферментов, участвующих в разложении ПЭ, и обе они задействованы в разложении других трудноразлагаемых полимеров – углеводородов и лигнина. В первом случае это алкангидроксилазы (Yoon et al., 2012; Jeon, Kim, 2015; Gravouil et al., 2017) и монооксигеназы (Jeon, Kim, 2015; Moreno, Rojo, 2019), во втором – лакказы (Santo et al., 2013; Sheel, Pant, 2018) и марганецпероксидаза (Iiyoshi et al., 1998; Mukherjee, Kundu, 2014).

Алкангидроксилазы (EC 1.14.15.3) являются ключевыми ферментами, участвующими в аэробном разложении алканов бактериями (Monahan et al., 2020). Начальная стадия включает гидроксилирование связей С–С с образованием первичных или вторичных спиртов, которые затем окисляются до альдегидов или кетонов, а затем до карбоновых кислот. Карбоксилированные н-алканы аналогичны жирным кислотам, которые могут катаболизироваться бактериями через систему β-окисления. С помощью транскриптомного анализа было показано, что у *Rhodococcus ruber* в присутствии ПЭ экспрессируются ферменты деградации алканов и пути β-окисления жирных кислот (Gravouil et al., 2017). Полная система алкангидроксилаз из *Pseudomonas aeruginosa*, выделенного с загрязненного нефтью пляжа, была экспрессирована в *E. coli*, в результате чего 19.3% низкомолекулярного ПЭ (low-molecular weight polyethylene, LMWPE) за 80 сут было минерализовано до CO_2 (Yoon et al., 2012). Для многих микроорганизмов, разлагающих ПЭ, также была показана их способность использовать линейные н-алканы, такие как парафин ($C_{44}H_{90}$, Mw = 618). Было обнаружено, что линейные молекулы парафина потребляются несколькими микроорганизмами в течение 20 сут (Haines and Alexander, 1975). Однако ни о разрыве связей С–С в основной цепи полиэтиленовых полимеров, ни об образовании продуктов гидролиза карбоновых кислот с длинной углеродной цепью не сообщалось (Eubeler et al., 2010; Yoon et al., 2012; Jeon, Kim, 2015; Gewert, 2015).

Таблица 4. Микроорганизмы и микробные сообщества, активные по отношению к полистиролу (ПС)

Источник пробы	Условия культивирования	Микроорганизм(ы)	Изменения в культуре с ПС	Проявление активности деструкции ПС	Методы детекции	Ссылки
Чистая культура	Минимальная среда, pH 7, 20°C, ПС модифицирован полилактатом, 28 сут	*Pseudomonas aeruginosa*	Прирост клеток и внеклеточного белка	Потеря массы ПС 10%, изменение поверхности сополимера	Спектроскопия, pH-метрия, гравиметрия, СЭМ	Shimpi et al., 2012
Почва, загрязненная полиэтиленом	Минеральная среда SM, 35°C, 4 и 8 нед.	*Rhodococcus ruber* C208	Образование биопленки на поверхности ПС	Снижение массы хлопьев ПС на 0.5 и 0.8%	Гравиметрия, прирост биомассы биопленки, оценка содержания белка, СЭМ	Mor, Sivan, 2008
Чистые культуры	2–3 мес.	*Curvularia* sp.	Гифы гриба проникают в субстрат	Потеря массы атактического ПС 2–5%	Гравиметрия, СЭМ	Motta et al., 2009
Мусорная куча	4 мес.	*Bacillus subtilis*		Потеря массы ПС	Гравиметрия	Asmita et al., 2015
Чистые культуры	Минеральная среда с ПС, в некоторых случаях с желатином, 30 сут	*Enterobacter* sp., *Citrobacter sedlakii*, *Alcaligenes* sp., *Brevundimonas diminuta*		Изменение структуры ПС, потеря массы до 12.4%, интермедиаты деструкции ПС (*Enterobacter*)	СЭМ, гравиметрия, ВЭЖХ, ЯМР- и ИК-спектроскопия Фурье, анализ генов16S рРНК	Sekhar et al., 2016
Почва	Питательный бульон с ПС, 30 сут	*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.		Потеря массы ПС 23%	Гравиметрия	Mohan et al., 2016
Почва	Питательный бульон, 8 сут	*Bacillus* sp.		Потеря массы ПС 56%; убыль стирола 40%	Гравиметрия	Mohan et al., 2016
Почва	Питательный бульон, 30 сут	*P. aeruginosa, B. subtilis, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes*		Потеря массы ПС 5, 20–59, 5, 38, 8–11%	Гравиметрия	Mohan et al., 2016
Чистые культуры	Богатая питательная среда, 28°C, 20 сут	*Gloeophyllum striatum, Gloeophyllum trabeum*		Деполимеризация ПС, потеря массы ПС 50%	ВЭЖХ, ГХ-МС, спектроскопия, гравиметрия	Krueger et al., 2015

Таблица 4. Продолжение

Источник пробы	Условия культивирования	Микроорганизм(ы)	Изменения в культуре с ПС	Проявление активности деструкции ПС	Методы детекции	Ссылки
Чистые культуры	Богатая питательная среда, 28°C, 21 сут	*Pleurotus ostreatus, Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor*	Обрастание сополимера мицелием	Повреждение поверхности, потеря массы лигноПС от 10 до 50%; увеличение продукции лакказ и пероксидаз	Гравиметрия, СЭМ, УФ-спектроскопия, ферментный анализ	Milstein et al., 1992
Чистые культуры	Питательный бульон, пеноПС, растворен в диметилформамиде и твине 80, или дихлорметане, 30 сут	*Pestalotiopsis* sp. *Ceriporia* sp. *Cymatoderma dendriticum P. aeruginosa B. subtilis* (*Serratia marcescens*)		Появление микропор, образование поверхностных (карбонильных) групп. Разложение 15.7–74.4%, пеноПС (грибы) и 38.3–63.4%, (бактерии)	Гравиметрия, СЭМ, ИК-спектроскопия Фурье	Yanto et al., 2019
Поля орошения, Индия	Минеральная среда LCFBM, 30°C, ПС гранулы ПС, 30 сут	*Exiguobacterium sibiricum*, *Exiguobacterium undae*	Образование биопленки на поверхности ПС	Изменение структуры поверхности ПС, формирование окисленных групп, убыль массы ПС на 0.4%	Анализ изменений гидрофобности поверхности, атомная силовая микроскопия, ИК-Фурье спектроскопия, гравиметрия	Chauhan et al., 2018
Донные отложения Аравийского моря на глубине 3538 м	30°C, соленость 4%, пленка ПС	*Bacillus paralicheniformis*		Убыль массы пленки ПС 34% идентифицированы гены монооксигеназы, диоксигеназы, пероксидазы	Термический анализ, сканирующая калориметрия, СЭМ, ИК-Фурье-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия	Kumar et al., 2021

Таблица 4. Окончание

Источник пробы	Условия культивирования	Микроорганизм(ы)	Изменения в культуре с ПС	Проявление активности деструкции ПС	Методы детекции	Ссылки
Чистые культуры	Инкубация 8 недель	*Cephalosporium, Mucor*	Нет данных	Потеря массы ПС на 2.7 и 1.81%; изменения поверхности ПС, появление интермедиатов	СЭМ, ИК-Фурье-спектроскопия, ГХ-МС	Chaudhary, Vijayakuma, 2019
Активный ил очистных сооружений	*In situ*, аэробно и анаэробно с кубиками ПС, 9 нед.	Нет данных	Образование биопленки кубиках ПС	Изменения в структуре ПС, появление окисленных групп в молекулах	СЭМ, рентгеноспектроскопия, ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье	Naz et al., 2013
Почва и активный ил сточных вод	*In situ* аэробно и анаэробно с α- и β-^{14}C-ПС	Нет данных	Нет данных	0.01% ПС окислился до $^{14}CO_2$ через 8 нед. и 0.7% – через 75 сут	Радиоизотопный метод	Guillet et al., 1974
Лигнинразрушающие грибы, образцы ила, почвы, навоза, свалки	*In situ* аэробно и анаэробно с ^{14}C-ПС	Нет данных	Нет данных	Убыль массы ПС от 0.04 до 3.0%	Радиоизотопный метод	Sielicki et al., 1978; Kaplan et al., 1979
Морская вода, оборотная вода нефтехимического производства	*In situ* аэробно	Нет данных	Образование пленки бактерий и водорослей	Пластификация ПС и снижение величины максимального напряжения при растяжении	СЭМ, ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье, ГХ-МС	Лаптев и соавт., 2019
Образцы почвы	*In situ* аэробно и анаэробно, ПС, крахмал	Нет данных	Нет данных	Потеря массы ПС 81.3%	Гравиметрия	Nikolic et al., 2014
Речная вода	*In situ* аэробно, ПС, крахмал	Нет данных	Нет данных	Потеря массы 45.8–93.1% в течение 27 сут	Гравиметрия	Nikolic et al., 2013

К ферментам, участвующим в разложении лигнина, относятся марганецпероксидаза (EC 1.11.1.13), лигнинпероксидазы (EC 1.11.1.14) и лакказы (EC 1.10.3.2), и для них также установлено участие в разложении ПЭ (Restrepo-Florez et al., 2014; Krueger et al., 2015). Внеклеточная медь-зависимая лакказа из *Rhodococcus ruber* вызывала снижение среднего молекулярного веса и Mn облученного УФ полиэтилена, увеличивая содержание карбонильных групп в полимере (Santo et al., 2013). Еще одним ферментом, участвующим в биодеградации синтетических пластиков, в том числе ПЭ, является марганецпероксидаза (EC 1.11.1.13). Показано, что лигнин-разлагающие грибы *Phanerochaete chrysosporium* и *Trametes versicolor* и штамм IZU-154, а также частично очищенная марганецпероксидаза из *P. chrysosporium* вызывали деградацию ПЭ, причем процесс стимулировался ионами Mn (Iiyoshi et al., 1998). Также была продемонстрирована способность этого фермента осуществлять биодеградацию предварительно облученного ультрафиолетом ПЭ (Mukherjee, Kundu, 2014). Есть указания на существование подобных механизмов и у бактерий. Так, у *Bacillus cereus* была показана стимуляция синтеза лакказы и марганецпероксидазы при инкубации с ПЭ, предварительно подвергнутым УФ-облучению (Sowmya et al., 2014). Показано, что лигнинпероксидаза *Streptomyces* sp. вызывала деградацию ПЭ после термообработки (Pometto et al., 1992).

Таким образом, эти и некоторые другие экспериментальные данные указывают на участие перечисленных ферментов в разложении полиэтилена. Следует отметить, однако, что в большинстве случаев пластик предварительно подвергался УФ или термообработке, что делало его более доступным для действия ферментов.

Сведения о механизмах деградации ПП отсутствуют. Информации о механизмах разложения ПВХ также практически нет; однако было показано, что разложение ПВХ *P. chrysosporium* основывается на действии пероксидазы (Khatoon et al., 2019). При этом видимые повреждения поверхности пластика (данные СЭМ) и изменение профиля ИК-спектроскопии были значительно более выражены при обработке ПВХ раствором очищенной пероксидазы из *P. chrysosporium*, чем при инкубации пластика в присутствии культуры.

Механизмы деструкции ПЭТ активно изучаются; его биодеградация осуществляется путем ограниченного ферментативного гидролиза сложноэфирной связи полимерной основы. Ферменты бактерий и грибов вызывают гидролиз сложноэфирных связей в составе ПЭТ до образования терефталата и этиленгликоля. Промежуточными продуктами ферментативного гидролиза также являются *моно*-(2-гидроксиэтил) терефталат и *бис*-(2-гидроксиэтил) терефталат (Vertommen et al., 2005; Ronkvist et al., 2009), которые также могут разрушаться до терефталата и этиленгликоля под действием эстераз (Austin et al., 2018; Maurya et al., 2020). При этом активность ПЭТ-гидролаз подвергается ингибированию промежуточными продуктами MHET и BHET, что показано на примере полиэфиргидролазы Tf-Cut2 из *Thermobifida fusca* (Barth et al., 2015a).

Среди основных ПЭТ-гидролизующих ферментов выделяют гидролазы, кутиназы, ПЭТазу, выделенную из *Ideonella sakaiensis*, сходную по своей природе с кутиназами, а также липазы и эстеразы, образуемые различными грибами и бактериями (табл. 5).

Кутиназы (E.C. 3.1.1.74) имеют широкую субстратную специфичность и проявляют гидролитическую активность как в отношении нерастворимых триглицеридов (типичные субстраты липаз), так и растворимых сложных эфиров (субстраты эстераз) (Taniguchi, 2019). Среди продуцентов кутиназ, которые гидролизуют ПЭТ, описаны представители *Fusarium solani*, *Thermobifida fusca*, *Thermobifida cellulolysilitica*, *Humicola insolens* и *Pseudomonas mendocina*. Ферментативный гидролиз ПЭТ при участии кутиназ относят к так называемой поверхностной эрозии синтетических полимеров (Zhang et al., 2004; Wei et al., 2014). В отличие от других ферментов, разлагающих биополимеры, (например, целлюлозу или полигидроксиалканоаты), специфические связывающие домены, ответственные за адсорбцию клеток к субстрату, в кутиназах отсутствуют (Chen et al., 2013; Wei et al., 2014). Их адсорбция на поверхности ПЭТ определяется гидрофобными участками, находящимися в непосредственной близости от каталитического центра фермента, что было показано на примере нескольких кутиназ *Thermobifida* (Herrero Acero et al., 2011). Авторы показали, что именно различия в электростатических и гидрофобных свойствах поверхности кутиназ из *T. cellulolysilitica* и *T. fusca* определяют различия в их гидролитической активности, что приводит к высоким выходам продуктов гидролиза у *T. fusca*. Кутиназы более активны в отношении биоразложения ПЭТ, среди них много термостабильных ферментов, которые способны вызывать значительную потерю веса аморфных ПЭТ-пленок (Wei et al., 2016). Кутиназы из гриба *Fusarium solani* и бактерии *Pseudomonas mendocina* действуют при 50°C, а кутиназа, выделенная из гриба *Humilica insolens*, проявляет термостабильность в диапазоне 70–80°C, однако их активность в 10 раз выше при использовании ПЭТ с 7% кристалличности, чем при использовании пластика с 35% кристалличности (Ronkvist et al., 2009).

Фермент ПЭТаза (ПЭТ-гидролаза; EC 3.1.1.101) из *Ideonella sakaiensis* 201-F6 (Yoshida et al., 2016), сходен по данным секвенирования с кутиназами,

Таблица 5. Ферменты, участвующие в разложении ПЭТ

Фермент	Номер в базе данных NCBI или EC-номер (код фермента; шифр КФ)	Микроорганизм-деструктор ПЭТ	Субстрат	Диапазон температур (оптимальная температура, °C)	Ссылка на источник
Поли(этилен терефталат)гидролазы/ПЭТ-гидролазы/ПЭТазы 3.1.1.101					
Термостабильная ПЭТ-гидролаза PET2	C3RYL0	*Bacteroidetes*	Агаровые пластины, содержащие наночастицы ПЭТ	50	Danso et al., 2018
ПЭТ-гидролаза PET5	R4YKL9	*Oleispira antarctica* RB-8	Агаровые пластины, содержащие наночастицы ПЭТ	50	Danso et al., 2018
Термостабильная ПЭТ-гидролаза PET6	UPI0003945E1F	*Vibrio gazogenes*	Агаровые пластины, содержащие наночастиц ПЭТ	50	Danso et al., 2018
ПЭТ-гидролаза PET12	A0A0G3BI90	*Polyangium brachysporum*	Агаровые пластины, содержащие наночастицы ПЭТ	50	Danso et al., 2018
ПЭТ-гидролаза TfH	WP_011291330.1	*Thermobifida fusca* (*Thermomonospora fusca*) SM43793	ПЭТ	30–60 (60)	Silva et al., 2011
ПЭТ-гидролаза Tha_Cut1	ADV92525.1	*Thermobifida alba* DSM43185	ПЭТ	50	Ribitsch et al., 2012
ПЭТ-гидролаза Cut1	E9LVI0	*T. fusca*	ПЭТ	65–70	Dresler et al., 2006
ПЭТ-гидролаза Cut2	E5BBQ3	*T. fusca*	ПЭТ	50	Chen et al., 2008
ПЭТ-гидролаза Cut2	E9LVH9	*Thermobifida cellulosilytica*	ПЭТ	50	Acero et al., 2011
ПЭТ-гидролаза Cut190	W0TJ64	*Saccharomonospora viridis*	ПЭТ	65–75	Kawai et al., 2014
ПЭТ-гидролаза Tcur0390	CDN67546.1	*Thermomonospora curvata* DSM 43183	Наночастицы ПЭТ *бис*(бензоилоксиэтил) терефталат (3ПЭТ)	50 25–70 (55)	Wei et al., 2014
ПЭТ-гидролаза Tcur1278	CDN67545.1	*Th. curvata* DSM 43183	Наночастицы ПЭТ	50–60 (60)	Wei et al., 2014
ПЭТ-гидролаза PE-H	6SBN	*Pseudomonas aestusnigri* VGXO14	Аморфная пленка ПЭТ	30	Bollinger et al., 2020

Таблица 5. Продолжение

Фермент	Номер в базе данных NCBI или EC-номер (код фермента; шифр КФ)	Микроорганизм-деструктор ПЭТ	Субстрат	Диапазон температур (оптимальная температура, °C)	Ссылка на источник
Сериновая ПЭТ-гидролаза Thh_Est	AFA45122.1	*Thermobifida halotolerans* DSM44931	ПЭТ	50 25	Ribitsch et al., 2012
ПЭТаза	GAP38373.1	*Ideonella sakaiensis* 201-F6	ПЭТ	15–42 (30–37)	Tanasupawat et al., 2016
ПЭТ-гидролаза ISF6_4831	A0A0K8P6T7	*Ideonella sakaiensis*	ПЭТ	15–42 (30–37)	Yoshida et al., 2016
ПЭТаза	EC 3.1.1.101	*Ideonella sakaiensis* 201. F6.48	ПЭТ	15–42 (30–37)	Yoshida et al., 2016
МГЕТаза (моно(этилен-терефталат)гидролаза)	EC 3.1.1.102	*Ideonella sakaiensis* 201. F6.48	Моно(2-гидроксиэтил) терефталевая кислота	15–42 (30–37)	Yoshida et al., 2016
1,2-Диоксигеназа терефталевой кислоты	EC 1.14.12.15	*Ideonella sakaiensis* 201. F6.48	Терефталевая кислота	15–42 (30–37)	Yoshida et al., 2016
1,2-Дигидрокси-3,5-циклогексадиен-1,4-дикарбоксилат дегидрогеназа	EC 1.11.13	*Ideonella sakaiensis* 201. F6.48	Протокатеховая кислота	15–42 (30–37)	Yoshida et al., 2016
3,4-Диоксигеназа	EC 1.3.1.53	*Ideonella sakaiensis* 201. F6.48	Протокатеховая кислота	15–42 (30–37)	Yoshida et al., 2016
Эстеразы 3.1					
Эстераза del71Cbotu_EstA	5AH1	*Clostridium botulinum*	ПЭТ	25	Biundo et al., 2016
Рекомбинантная эстераза Thh_Est		*Thermobifida halotolerans*	ПЭТ пленки	50	Ribitsch et al., 2012
n-Нитробензилэстераза BsEstB	ADH43200.1	*Bacillus subtilis* 4P3-11	ПЭТ 3ПЭТ	40–45 (40)	Ribitsch et al., 2012
Полиэстераза					
Термостабильная полиэстераза Cut190 S226P/R228S	BAO42836.1	*Saccharomonospora viridis* AHK190	ПЭТ	60–65	Kawai et al., 2014
Полиэстераза		*Penicillium citrinum*	ПЭТ, 3ПЭТ	30–50	Liebminger et al., 2007

Таблица 5. Окончание

Фермент	Номер в базе данных NCBI или EC-номер (код фермента; шифр КФ)	Микроорганизм-деструктор ПЭТ	Субстрат	Диапазон температур (оптимальная температура, °C)	Ссылка на источник
Кутиназы EC 3.1.1.74					
Кутиназа LC	AEV21261.1	*Thermobifida fusca*	ПЭТ пленки	30–80 (50)	Sulaiman et al., 2012
Кутиназа PmC		*Pseudomonas mendocina*	Низкокристаллический ПЭТ, ПЭТ пленки	50	Ronkvist et al., 2009
Грибная кутиназа FsC	1CEX	*Fusarium solani pisi*	ПЭТ	30–60 (50)	Ronkvist et al., 2009
Грибная кутиназа HiC	4OYY	*Humicola insolens* *Thermomyces insolens*	ПЭТ Низкокристаллический ПЭТ	30–85 (80) 70	Ribitsch et al., 2012; Ronkvist et al., 2009
Кутиназа Thc_Cut1	ADV92526.1	*Thermobifida cellulosilytica* DSM44535	ПЭТ	50	Acero et al., 2011
Кутиназа Thc_Cut2	ADV92527.1	*Thermobifida cellulosilytica* DSM44535	ПЭТ	50	Acero et al., 2011
Кутиназа Tha_Cut1	ADV92525.1	*Thermobifida alba* DSM43185	ПЭТ	50	Ribitsch et al., 2012
Кутиназа Thf42_Cut1	ADV92528.1	*Thermobifida fusca* DSM44342	ПЭТ	50	Acero et al., 2011
Термостабильная кутиназа TfCut2	G62A/F209A	*Thermobifida fusca*	Низкокристаллический ПЭТ	40–70 (65)	Furukawa et al., 2019
Липазы EC 3.1.1.3					
Грибная липаза	EC 3.1.1.3	*Thermomyces insolens*	ПЭТ-пленка с низкой кристаличностью	50–80 (60)	Ronkvist et al., 2009
Термофильная грибная липаза TLL		*Thermomyces lanuginosus*	ПЭТ	55–60	Fernandez-Lafuente, 2010
Липаза	CCUG 33812	*Aspergillus oryzae*	ПЭТ, ПЭТ упаковочный	40	Wang et al., 2008
Липаза ETE Lipase	L 4777	*Candida antarctica*	ПЭТ упаковочный	30–90 (40)	Andersen, 1999
Липаза		*Triticum aestivum*	ПЭТ-олигомеры	25	Nechwatal et al., 2006
Лакказа ScL		*Streptomyces coelicolor*	ПЭТ упаковочный	55	Liu et al., 2008

но имеет более широкий активный центр с дополнительными дисульфидными мостиками (Kawai et al., 2020). Этот фермент проявляет наивысшую гидролитическую активность в отношении ПЭТ с низкой кристалличностью при температуре окружающей среды, но он не термоустойчив, что отличает его от других кутиназ, которые проявляют высокую термостабильность.

Ферменты эстеразы (3.1) действуют на границе раздела между водной средой и нерастворимыми в воде субстратами. На примере эстеразы *Clostridium botulinum* обнаружена важная роль цинк-связывающего домена в ПЭТ-гидролитической активности этих анаэробных бактерий, отличающая эти ферменты от кутиназ аэробных микроорганизмов (Biundo et al., 2018; Kawai et al., 2019). Генная инженерия и введение определенных мутаций по этому участку эстераз облегчали адсорбцию *Clostridium botulinum* на ПЭТ и повышали гидролитическую активность (Biundo et al., 2016). Эстеразы гидролизуют сложные эфиры с алифатической областью с преимущественно более короткой цепью по сравнению с теми, которые подвергаются действию липаз (Freddi et al., 2011). Поэтому лишь незначительное число эстераз, таких как *n*-нитробензилэстераза, выделенная из *Bacillus subtilis* (BsEstB), способны участвовать в гидролизе ПЭТ (Ribitsch et al., 2011). Эстеразы обладают меньшим потенциалом для поверхностного гидролиза сложных полиэфиров, чем кутиназы или липазы, однако эстераза *Thermobifida* Thh_Est обладает активностью для поверхностного гидролиза ПЭТ, сравнимой с кутиназами из того же рода (Ribitsch et al., 2012).

Липазы (EC 3.1.1.3) проявляют низкую активность в отношении биодеградации ПЭТ из-за ограниченной доступности к субстрату (Zimmermann, Billig, 2011). Имеются данные о деградации ПЭТ липазами из дрожжей *Candida cylindracea*, мицелиального гриба *Aspergillus oryzae* и бактерии *Pseudomonas* sp. (Wang et al., 2008; Ma et al., 2012; Maurya et al., 2020).

Для полиэстеразы, выявленной у *Penicillium citrinum*, была показана частичная биодеградация ПЭТ и модельного субстрата *бис*-(бензоилоксиэтил) терефталата (3ПЭТ) с высвобождением продуктов разложения *моно*-(2-гидроксиэтил) терефталата и *бис*-(2-гидроксиэтил) терефталата, однако количество терефталиевой кислоты было незначительным (Liebminger et al., 2007). Среди известных своей ПЭТ-гидролазной активностью отмечают рекомбинантную термостабильную полиэстеразу из дрожжей *Saccharomonospora viridis* AHK190 (Kawai et al., 2014), рекомбинантную эстеразу, выделенную исходно из *Thermobifida halotolerans* и способную деполимеризовать ПЭТ с образованием ТА и МНЕТ (Ribitsch et al., 2012), а также нитробензилэстеразу из *Bacillus subtilis* (Ribitsch et al., 2011).

Имеется некоторое количество работ, посвященное механизмам разложения ПС. Слабыми участками полимерной цепи полистирола являются третичные атомы углерода, присоединенные к фенильным группам. Именно они уязвимы для атаки свободных радикалов, и ряд химических реакций может здесь привести к разрыву цепи и инициировать образование карбонильных групп (Niessner, Gausepohl, 2003). Образование карбонильных групп, а также пероксидных групп ускоряет деградацию полимера (Meekum, Kenharaj, 2002; Botelho et al., 2004).

Первыми этапами процесса могут быть ферментативная деполимеризация, воздействие агрессивных метаболитов микроорганизмов и химическая реакция полимера с имеющимися в нем добавками (Milstein et al., 1992; Mooney et al., 2006; Krueger et al., 2015; Tischler et al., 2015; Ho et al., 2018; Chauhun et al., 2018). Предполагается, что растущие на поверхности полистирола микроорганизмы должны образовывать ферменты или выделять агрессивные метаболиты, способствующие разложению полимера на олигомеры и мономеры, однако пока неизвестно ни одного микробного фермента, который мог бы разлагать ПС. Предполагают, что это могут быть грибные лигнинпероксидазы. Сильное деградирующее действие на полимерные материалы оказывают выделяемые плесневыми грибами органические кислоты (лимонная, щавелевая, янтарная, уксусная, глюконовая, молочная, фумаровая). При совместном развитии нескольких видов плесневых грибов они могут обмениваться производимыми органическими кислотами, тем самым обеспечиваются подходящие жизненные условия на ПС даже для таких грибов, для которых этот полимер непригоден при развитии в виде чистой культуры.

На втором этапе происходит биодеградация олиго- и мономеров, в частности стирола. Преобладающим путем окисления является путь боковой цепи стирола (так называемый “верхний” путь) (Oelschlaegel et al., 2018). Стирол в аэробных условиях непосредственно окисляется монооксигеназой стирола с образованием эпоксида стирола, который затем окисляется до фенилацетальдегида изомеразой оксида стирола. Далее эта молекула катаболизируется в фенилуксусную кислоту дегидрогеназой. Фенилуксусная кислота преобразуется в фенилацетил-KoA с помощью лигазы и затем подвергается дearоматизации в нескольких ферментативных реакциях, чтобы окончательно войти в ЦТК через образование ацетил-KoA и сукцинил-KoA (изучено у представителей родов *Pseudomonas*, *Xanthobacter*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*).

Pseudomonas putida CA-3 может накапливать полигидроксиалканоаты при выращивании на стироле (O'Leary et al., 2005), используя оригинальный путь биодеградации ("нижний" путь). Он включает окисление ароматического кольца с последующим вступлением в цикл β-окисления и превращением в ацетил-КоА. Ацетил-КоА может затем либо входить в ЦТК, либо в путь биосинтеза жирных кислот *de novo*, который даст в качестве конечного продукта полигидроксиалканоаты средней длины. У уже упоминавшегося штамма *Bacillus paralicheniformis*, выделенного из донных отложений Аравийского моря и способного разрушать 34% от общей массы пленки ПС за 60 сут, были идентифицированы гены, кодирующие ферменты монооксигеназу, диоксигеназу, пероксидазу, эстеразу и гидролазу, участвующие в деградации ПС.

Гены, отвечающие за окисление боковой цепи, часто располагаются в одном консервативном генном кластере, обозначаемом *styABC* (*D*). Гены *styA* и *styB* кодируют монооксигеназный комплекс, обусловливающий деградацию стирола. Монооксигеназа стирола представляет собой двухкомпонентный флавопротеин, который катализирует НАДН-и ФАД-зависимое эпоксидирование стирола до оксида стирола. StyA является монооксигеназой, а StyB функционирует как флавин-адениндинуклеотидредуктаза для снабжения StyA необходимыми электронами. Ген *styC* кодирует изомеразу стирола, а *styD* – фенилацетальдегидегидрогеназу (Oelschlaegel et al., 2012; Morrison et al., 2013; Crabo et al., 2017; Oeleschlaegel et al., 2018).

ПУТИ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА БИОДЕГРАДАЦИИ ПЛАСТИКОВ

Исследование процесса разложения пластиков неизменно сопровождается поисками путей его ускорения. Скорость разложения полимера микроорганизмами в первую очередь зависит от площади контактной поверхности, поэтому для ускорения процесса деградации используются тонкие полимерные пленки или порошок (Montazer et al., 2020).

Для ускорения процесса деградации часто используют различные физические воздействия на пластик, меняющие его структуру и делающие ее более доступной для биодеградации. Наиболее часто используют ультрафиолетовое излучение (УФ) и термическую обработку. Так, было показано, что скорость биодеградации ПЭНП может быть увеличена путем его предварительной фото- или термической обработки (Volke-Sepúlveda et al., 2002; Chatterjee et al., 2010). Под влиянием этих воздействий меняется степень кристалличности ПЭ и его морфологические особенности, снижается размер полимерной цепи, образуются окисленные группы, такие как карбоксил, карбонил и гидроксил, что ускоряет процесс разложения полимера микроорганизмами (Albertsson, 1980; Hadad et al., 2005, Esmaeili et al., 2013). Продолжительность УФ обработки должна составлять не менее 250 ч, а температуры (70–80°C) – не менее суток (Yamada-Onodera et al. 2001; Abrusci et al., 2011, Montazer et al., 2019).

Аналогичные эффекты УФ облучения и термической обработки наблюдаются и при разложении ПЭТ. Его сложноэфирные связи, более подверженные биоразложению, например, микробными эстеразами или липазами, оказываются экранированы ароматическими группами, вследствие чего вся структура пластика остается устойчивой к биоразложению (Webb et al., 2013). Дополнительные воздействия, такие как УФ облучение, а также термическая обработка, значительно усиливают действие микробных гидролитических ферментов (Wei, Zimmermann, 2017).

Образованию карбонильных групп в ПЭ способствует предобработка кислотой, что повышает степень биодеградации полимера. При исследовании микробного разложения ПЭНП использовалась предобработка его порошка 65%-ым раствором азотной кислоты в течение 10 сут (Rajandas et al., 2012) или 99% раствором азотной кислоты в течение 6 сут (Hasan et al., 2007). В обоих случаях, согласно данным Фурье-инфракрасной спектроскопии, было показано увеличение биодеградации ПЭ. Было также показано, что при сочетании фотоокисления и химической предобработки под действием азотной кислоты наблюдали синергетический эффект повышения скорости биодеградации (Hasan et al., 2007).

Активно исследуется влияние температуры культивирования на процесс разложения полимеров. Так, сообщается о высокой способности к деградации пластика термофильными бактериальными консорциумами *Brevibacillus* spp. и *Aneurinibacillus* sp. (Skariyachan et al., 2008). При сравнении процесса деградации ПЭ *Pseudomonas aeruginosa* при 7, 23, 37 и 44°C было показано, что наибольшая убыль субстрата (6.25% за 30 сут) происходила при 44°C (Tamnou et al., 2021).

В решении проблемы разложения ПЭТ одной из основных задач является поиск микроорганизмов с термостабильными и высокоактивными при повышенных температурах ферментами, поскольку при температуре, выше температуры стеклования (65°C) аморфные части полимера становятся более гибкими и доступными для воздействия гидролитических ферментов (Ronkvist et al., 2009).

Одним из важных препятствий к микробной деградации пластиков является их гидрофобность, затрудняющая контакт клеток с поверхностью пластика. Образование поверхностно-активных веществ бактериями является ключевым фактором при бактериальном разложении

ПЭ, поскольку секреция молекул биосурфактанта снижает поверхностное натяжение и облегчает прикрепление бактерий к поверхности ПЭ (Vimala, Mathew, 2016; Журина и соавт., 2020). Также было показано, что добавление 0.05% минерального масла способствует образованию биопленки и повышает биодеградацию ПЭ (Hadad et al., 2005). Установлено, что при разложении ПЭТ гидролитическая активность ПЭТаз может быть увеличена благодаря использованию анионных поверхностно-активных сурфактантов, что позволит анионизированным поверхностям ПЭТ привлекать больше катионных ПЭТаз (Furukawa et al., 2019).

Процесс разложения пластиков ускоряется при использовании смеси субстратов, когда, помимо пластика, в среде присутствует более доступный источник углерода и энергии. Установлено, что смешивание ПЭ с полимерами природного происхождения, такими как крахмал, может повысить его биоразлагаемость. Было показано, что фермент α-амилаза способен разлагать образцы смеси ПЭНП–крахмал в водном растворе; при этом вес и предел прочности на разрыв образцов полимера после обработки ферментом уменьшаются на 48 и 87% соответственно (Karimi, Biria, 2019). По данным гель-проникающей хроматографии (ГПХ) было выявлено значительное снижение как молярной массы, так и вязкости ПЭНП более чем на 70 и 60% соответственно. Данные этих экспериментов показали, что основная цепь полимера, а также боковые ответвления были расщеплены ферментом, что позволяет предположить, что α-амилаза оказывает смешанный ко-метаболический эффект на биодеградацию ПЭНП в смесях полимер–крахмал.

Также было замечено, что в бинарных биопленках процессы биоразрушения протекают интенсивнее, когда партнеры составляют трофическую цепь, в которой один штамм может осуществлять первичную модификацию полимерной цепи, а другой – потреблять образующиеся промежуточные продукты. Важной дополнительной функцией одного из компонентов микробной ассоциации может быть способность к образованию биосурфактантов, которые помогают метаболизировать нерастворимые в воде соединения (Плакунов и соавт., 2020). При разложении ПС смешанными культурами (как правило, на первых стадиях разрушения пластика) возможно воздействие на полимер агрессивных продуктов метаболизма (например, кислот), продуцируемых компонентами сообщества, растущими на доступных источниках углерода и энергии и не образующих ферментов прямого воздействия на полимер (Naz et al., 2013; Ho et al., 2018; Chauhan et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопление пластиковых отходов в окружающей среде однозначно свидетельствует о том, что природные микробные сообщества не справляются с их разложением. Действительно, все экспериментальные данные свидетельствуют о том, что достоверно регистрируемый процесс разложения пластиков идет очень медленно. Тем не менее, результаты активных и многогранных исследований последних лет свидетельствуют о том, что микроорганизмы и в этой, казалось бы, безнадежной борьбе демонстрируют свое могущество. Прежде всего, поражает разнообразие грибов и бактерий, для которых была доказана способность разлагать различные виды пластиков: это представители разных филумов, при этом имеющих большое количество культивируемых представителей – *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и др. Можно предположить, что в действительности разнообразие прокариот, разлагающих пластики, гораздо больше. Следует отметить также, что далеко не все экологические ниши были исследованы на предмет присутствия в них микроорганизмов, способных к разложению пластиков, и, возможно, расширение спектра исследуемых местообитаний приведет к выделению новых целевых микроорганизмов. Лишь очень небольшое количество работ посвящено анаэробному разложению пластиков; между тем, эти процессы, безусловно, заслуживают внимания исследователей, так как анаэробные местообитания широко распространены на нашей планете, в том числе и в глубинных, лишенных кислорода слоях мусорных полигонов. Необыкновенно интересные результаты были получены при исследовании беспозвоночных животных, которые с помощью микробных симбионтов усваивают труднодоступные субстраты, например, воска. Можно предположить, что таких симбиотических сообществ существует гораздо больше, причем в местообитаниях самого разного типа. Среди биотопов, перспективных для поиска новых микроорганизмов, способных к разложению пластиков, можно назвать экстремальные местообитания, где на пластики будут воздействовать и физико-химические факторы, и устойчивые к этим факторам микроорганизмы.

Примером успешного исследования механизмов разложения пластиков можно считать быстро продвигающиеся исследования ферментов, вызывающих разложение ПЭТ. Рекомбинантные ПЭТазы демонстрируют высокую скорость разложения полимерного субстрата, причем важным фактором является их термостабильность, позволяющая вести процесс при высоких температурах. Этот несомненный успех дает возможность надеяться на создание в недалеком будущем технологии ферментативной переработки ПЭТ.

Можно предположить, что в ближайшие годы количество работ, посвященных микробному разложению пластиков, будет только увеличиваться. Это обусловливает необходимость разработки единых протоколов исследования процессов биодеградации пластиков, что позволит ученым из разных стран действовать единым образом при решении этой очень трудной и важной задачи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 19-14-18001 и “Экспансия” № 20-14-50477.

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

Бартнев Г.М., Френкель С.Я. Физика полимеров / Под ред. Ельяшевич А.М. Л.: Химия, 1990.

Брацыхин Е.А., Шульгина Э.С. Технология пластических масс. Учебное пособие для техникумов. 3-е изд. перераб. и дополн. Л.: Химия, 1982.

Галыгин В.Е., Баронин Г.С., Таров В.П., Завражин Д.О. Современные технологии получения и переработки полимерных и композиционных материалов. Тамбов: Изд-во ФГБОУ ВПО “ТГТУ”, 2012. 180 с.

Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Плакунов В.К. Экспресс-метод определения взаимосвязи биокоррозии полиэтилена биопленками *Chromobacterium violaceum* с их способностью формировать внеклеточный полимерный матрикс // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 52–58.

Zhurina M.V., Gannesen A.V., Martyanov S.V., Plakunov V.K. Express method for determining the relation between polyethylene biocorrosion by *Chromobacterium violaceum* biofilms and their ability to form extracellular matrix // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 44–.

Захаров В.А., Микенас Т.Б., Никитин В.Е., Мозгунова Н.В. Патент РФ № 2346006. Катализатор и способ получения сверхвысокомолекулярного полиэтилена с использованием этого катализатора. Опубл. 10.02.2009. Бюл. № 4.

Кудряшова Д.П. Тенденции мирового рынка сверхвысокомолекулярного полиэтилена // Вестник химической промышленности. 2020. http://vestkhimprom.ru/posts/tendentsii-mirovogo-rynka-sverkhvysokomolekulyarnogo-polietilena

Лаптев А.Б., Николаев Е.В., Куршев Е.В., Горяшник Ю.С. Особенности биодеструкции термопластов на основе полиэфиров в различных климатических зонах. 2019. http://viam-works.ru

Мельникова М.А. Полимерные материалы: свойства, практическое применение. Благовещенск: Амурский гос. ун-т, 2013. 86 с.

Описание и марки полимеров // Полимерные материалы. Изделия Оборудование Технологии. http://www.polymerbranch.com/catalogp/view/3.html

Плакунов В.К., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Журина М.В. Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы деградации и способы защиты // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 631.

Plakunov V.K., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Zhurina M.V. Biocorrosion of synthetic plastics: degradation mechanisms and methods of protection // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 647.

Сажин Б.И., Лобанов А.М., Романовская О.С., Эйдельнант М.П., Койков С.Н., Шуваев В.П., Борисова М.Э. Электрические свойства полимеров / Под ред. Сажина Б.И. Л.: Химия, 1986. 224 с.

Справочник химика 21. Химия и химическая технология. https://www.chem21.info/

Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Груздев Д.С., Лаптев А.Б. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ с поверхности полиэтилентерефталатных материалов при экспозиции в водных срелах // Микробиология. 2020. Т. 89. № 1. С. 99–110.

Tourova T.P., Sokolova D.S., Nazina T.N., Gruzdev 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.

Химия и технология синтетических высокомолекулярных соединений. Карбоцепные полимеры / Под ред. Школиной М.А. М.: “Наука”, 1967. 852 с.

Шевлик Н.В., Строганова С.С., Тычинская Л.Ю., Коваль В.Н., Щербина Л.А. Синтез и свойства аморфного светопрозрачного С-ПЭТ // Полимерные материалы и технологии. 2016. Т. 2. С. 35.

Abrusci C., Pablos J.L., Corrales T., López-Marín J., Marín I., Catalina F. Biodegradation of photo-degraded mulching films based on polyethylenes and stearates of calcium and iron as pro-oxidant additives // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2011. V. 65. P. 451.

Abrusci C., Pablos J.L., Marín I., Espí E., Corrales T., Catalina F. Comparative effect of metal stearates as pro-oxidant additives on bacterial biodegradation of thermal- and photo-degraded low density polyethylene mulching films. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2013. V. 83. P. 25–32. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.04.002.

Acero E.H., Ribitsch D., Steinkellner G., et al. Enzymaticsurface hydrolysis of PET: Effect of structural diversityon kinetic properties of cutinases from Thermobifida //Macromolecules. 2011. V. 44. P. 4632–4640.

Ahebnazar Z., Shojaosadati S.A., Mohammad-Taheri M., Nosrati M. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium // Waste Manag. 2010. V. 30. P. 396.

Albertsson A.C., Karlsson S. The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene // Prog. Polym. Sci. 1990. V. 15. P. 177. https://doi.org/10.1016/0079-6700(90)90027-X

Ali M.I., Ahmed S., Robson G., Javed I., Ali N., Atiq N., Hameed A. Isolation and molecular characterization of polyvi-

nyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates // J. Basic Microbiol. 2014. V. 54. P. 18.

Ammala A., Bateman S., Dean K., Petinakis E., Sangwan P., Wong S. An overview of degradable and biodegradable polyolefins // Prog. Polym. Sci. 2011. V. 36. P. 1015–1049. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.12.002

Andersen B.K., Borch K., Abo M., Damgaard B. Method of treating polyester fabrics. US 5997584. 1999.

Andredy A. Assessment of environmental biodegradation of synthetic polymers // J. Macromol. Sci. Part C. Polymer Reviews. 1994. V. 34. P. 25.

Anwar M.S., Kapri A., Chaudhry V., Mishra A., Ansari M.W., Souche Y., Nautiyal C.S., Zaidi M.G.H., Goel R. Response of indigenously developed bacterial consortia in progressive degradation of polyvinyl chloride // Protoplasma. 2016. V. 253. P. 1023.

Arkatkar A., Arutchelvi J., Bhaduri S., Uppara P.V., Doble M. Degradation of unpretreated and thermally pretreated polypropylene by soil consortia. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2009. V. 63. P. 106.

Arutchelvi J., Sudhakar M., Arkatkar A., Doble M., Bhadur S., Uppara P.V. Biodegradation of polyethylene and polypropylene // Indian J. Biotechnol. 2008. V. 7. P. 9.

Asmita A., Shubhamsingh T., Tejashree S. Isolation of plastic degrading micro-organisms from soil samples collected at various locations in Mumbai, India // Int. Res. J. Environ. Sci. 2015. V. 4. P. 77.

Atiq N., Safia A., Ali M.I., Andleeb S. Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil // Afr. J. Microbiol. Res. 2010. V. 4. P. 1537.

Atlas R.M., Bartha R. Biogeochemical cycling: Nitrogen, sulfur, phosphorus, iron, and other elements // Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Menlo Park, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1987. P. 333.

Austin H.P., Allen M.D., Donohoe B.S., Rorrer N.A., Kearns F.L., Silveira R.L. Characterization and engineering of a plastic degrading aromatic polyesterase. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2018. V. 115. E4350–E4357.

Auta H.S., Emenike C., Fauziah S.H. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. // Environ. Intern. 2017b. V. 102. DOI: 10.1016/j.envint.2017.02.013.

Auta H.S., Emenike C.U., Jayanthi B., Fauziah S.H. Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment // Marine Pollut. Bull. 2018. V. 127. P. 15.

Barth M., Oeser T., Wei R., Then J., Schmidt J., Zimmermann W. Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca* // Biochem. Eng. J. 2015. V. 93. P. 222. https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2014.10.012

Berk S., Ebert H., Teitell L. Utilization of plasticizers and related organic compounds by fungi // Ind. Eng. Chem. 1957. V. 49. P. 1115.

Bhatia M., Girdhar A., Tiwari A., Nayarisseri A. Implications of a novel *Pseudomonas* species on low density polyethylene biodegradation: an *in vitro* to *in silico* approach // SpringerPlus. 2014. V. 3. Art. 497. P. 1. https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-497

Billen P., Khalifa, L., Van Gerven F., Tavernier S., Spatari S. Technological application potential of polyethylene and polystyrene biodegradation by macro-organisms such as mealworms and wax moth larvae // Sci. Total Environ. 2020. V. 735. Art. 139521. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139521

Biundo A., Ribitsch D., Steinkellner G., Gruber K., Guebitz G.M. Polyester hydrolysis is enhanced by a truncated esterase: less is more // Biotechnol. J. 2016. V. 12. https://doi.org/10.1002/biot.201600450

Biundo A., Reich J., Ribitsch D., Guebitz G.M. Synergistic effect of mutagenesis and truncation to improve a polyesterase from *Clostridium botulinum* for polyester hydrolysis // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 3745.

Bollinger A., Thies S., Knieps-Grünhagen E., Gertzen C., Kobus S., Höppner A., Ferrer M., Gohlke H., Smits S.H.J., Jaeger K. A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – structural and functional insights // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 114. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00114

Bonhomme S., Cuer A., Delort A.M., Lemaire J., Sancelme M., Scott C. Environmental biodegradation of polyethylene // Polym. Degrad. Stab. 2003. V. 81. P. 441.

Booth G.H., Cooper A.W., Robb J.A. Bacterial degradation of plasticized PVC // J. Appl. Bacteriol. 1968. V. 31. P. 305.

Botelho G., Queiros A., Machado A., Frangiosa P., Ferreira J. Enhancement of the thermooxidative degradability of polystyrene by chemical modification // Polym. Degrad. Stab. 2004. V. 86. P. 493.

Boucher J., Friot D. Primary Microplastics in the Oceans: A Global Evaluation of Sources. Gland, Switzerland: IUCN, 2017. P. 43.

Brandon A.M., Gao S.H., Tian R., Ning D., Yang S.S., Zhou J., Wu W.-M., Criddle C.S. Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome // Environ. Sci. Technol. 2018. V. 52. P. 6526. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02301

Brandon J.A., Jones W., Ohman M.D. Multidecadal increase in plastic particles in coastal ocean sediments // Sci. Adv. 2019. V. 5. Art. eaax0587. https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0587

Chatterjee S., Roy B., Roy D., Banerjee R. Enzyme-mediated biodegradation of heat treated commercial polyethylene by *Staphylococcal* species // Polym. Degrad. Stab. 2010. V. 95. P. 195. https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.11.025

Chaudhary A.K., Vijayakumar R. Studies on biological degradation of polystyrene by pure fungal cultures // Environ. Dev. Sustain. 2019. V. 22. P. 4495.

Chauhan D., Agrawal G., Deshmukh S., Roy S.S., Priyadarshini R. Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation // RSC Adv. 2018. V. 8. P. 37590–37599.

Chen S., Tong X., Woodard R.W., Du G.C., Wu J., Chen J. Identification and characterization of bacterial cutinase // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 25854.

Chen S., Su L., Chen J., Wu J. Cutinase: characteristics, preparation and application // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. P. 1754. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.005

Crabo A.G., Singh B., Nguyen T., Emami S., Gassner G.T., Sazinsky M.H. Structure and biochemistry of phenylacetaldehyde dehydrogenase from the *Pseudomonas putida* S12 styrene catabolic pathway // Arch. Biochem. Biophys. 2017. V. 616. P. 47.

Danso D., Schmeisser C., Chow J. Zimmermann W., Wei R., Leggewie C., Li X., Hazen T., Streit W. R. New insights into the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. e02773-17.

Das G., Bordoloi N.K., Rai S.K., Mukherjee A.K., Karak N. Biodegradable and biocompatible epoxidized vegetable oil modified thermostable poly(vinyl chloride): Thermal and performance characteristics post biodegradation with *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. // J. Hazard. Mat. 2012. V. 209–210. P. 434–442.

Das M.P., Kumar S. An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens* // 3 Biotech. 2015. V. 5. P. 81–86.

Delacuvellerie A., Cyriaque V., Gobert S., Benali S., Wattiez R. The plastisphere in marine ecosystem hosts potential specific microbial degraders including *Alcanivorax borkumensis* as a key player for the low-density polyethylene degradation // J. Hazard. Mater. 2019. V. 380. e120899.
https://doi.org/10.1016/j.jhazmat

de Stephanis R., Giménez J., Carpinelli E., Gutierrez-Exposito C., Cañadas A. As main meal for sperm whales: plastics debris // Mar. Pollut. Bull. 2013. V. 69. P. 206–214.

Devi R.S., Kannan V.R., Natarajan K., Nivas D., Kannan K., Chandru S., Antony A.R. The role of microbes in plastic degradation // Environmental Waste Management / Ed. Ram Chandra. Taylor & Francis Group, LLC, 2016. P. 341–370.

Dresler K., van den Heuvel J., Muller R.J., Deckwer W.D. Production of a recombinant polyester-cleaving hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Escherichia coli* // Bioproc. Biosyst. Eng. 2006. V. 29. P. 169–183.

El-Shafei H., EI-Nasser N.H.A., Kansoh A.L., Ali A.M. Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and *Streptomyces* species // Polym. Degrad. Stab. 1998. V. 62. P. 361–365.

Esmaeili A., Pourbabaee A.A., Alikhani H.A., Shabani F., Esmaeili E. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil // PLoS One. 2013. V. 8. e71720.

Eubeler J.P., Bernhard M., Knepper T.P. Environmental biodegradation of synthetic polymers: Biodegradation of different polymer groups // Trends Analyt. Chem. 2010. V. 29. P. 84–100.

Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst // J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 2010. V. 62. P. 197–212.

Fontanella S., Bonhomme S., Koutny M., Husarova L., Brusso J.M., Courdavault J.P., Pitteri S., Samuel G., Pichon G., Lemaire J., Delort A.-M. Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives // Polym. Degrad. Stab. 2010. V. 95. P. 1011–1021.
https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.009

Freddi G., Schwab H., Guebitz G.M. Hydrolysis of polyethyleneterephthalate by *p*-nitrobenzylesterase from *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Prog. 2011. V. 27. P. 951–960.

Furukawa M., Kawakami N., Tomizawa A., Miyamoto K. Efficient degradation of poly(ethylene terephthalate) with *Thermobifda fusca* cutinase exhibiting improved catalytic activity generated using mutagenesis and additive-based approaches // Sci. Rep. 2019. V. 9. Art. 16038.

Gall S.C., Thompson R.C. The impact of debris on marine life // Marine Pollut. Bull. 2015. V. 92. P. 170–179.

Gallo F., Fossi C., Weber R., Santillo D., Sousa J., Ingram I., Nadal A., Romano D. Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures // Environ. Sci. Eur. 2018. V. 30. P. 13.

Geyer R., Jambeck, J., Law K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. // Sci. Adv. 2017. 3:e1700782. doi: 10.1126/sciadv.1700782.

Ghatge S., Yang Y., Ahn J.-A., Hur H.-G. Biodegradation of polyethylene: a brief review // Appl. Biol. Chem. 2020. V. 63. Art. 27.
https://doi.org/10.1186/s13765-020-00511-3

Giacomucci L., Raddadi N., Soccio M., Lotti N., Fava F. Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus* // New Biotechnol. 2019. V. 52. P. 35–41.

Gilan I., Hadar Y., Sivan A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65. P. 97–104.

Gravouil K., Ferru-Clément R., Colas S., Helye R., Kadri L., Bourdeau L., Moumen B., Mercier A., Ferreira T. Transcriptomics and lipidomics of the environmental strain *Rhodococcus ruber* point out consumption pathways and potential metabolic bottlenecks for polyethylene degradation // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. P. 5172–5181.

Guillet J.E., Regulski T.W., McAneney T.B. Biodegradability of photodegraded polymers. II. Tracer studies of biooxidation of Ecolyte PS polystyrene // Environ. Sci. Technol. 1974. V. 8. P. 923–925.
https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.035

Hadad D., Geresh S., Sivan A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis* // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 98. P. 1093–1100.

Haines J.R. Microbial degradation of high-molecular-weight alkanes // Appl. Microbiol. 1975. V. 28. P. 1084–1085.

Harrison J.P., Boardman C., O'Callaghan K., Delort A.M., Song J. Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: A critical review // R. Soc. Open Sci. 2018. V. 5. Art. 171792.
https://doi.org/10.1098/rsos.171792

Harshvardhan K., Jha B. Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India // Marine Pollut. Bull. 2013. V. 77. P. 100–106.

Hasan F., Shah A.A., Hameed A., Ahmed S. Synergistic effect of photo and chemical treatment on the rate of biodegradation of low density polyethylene by *Fusarium* sp. AF4 // J. Appl. Polym. Sci. 2007. V. 105. P. 1466–1470.
https://doi.org/10.1002/app.26328

Herrero Acero E., Ribitsch D., Steinkellner G., Gruber K., Greimel K., Eiteljoerg I., Trotscha E., Wei R., Zimmermann W., Zinn M., Cavaco-Paulo A., Freddi G., Schwab H., Guebitz G. Enzymatic surface hydrolysis of PET: Effect of structural

diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida* // Macromolecules. 2011. V. 44. P. 4632–4640.

Hidayat T.R., Indrawati I., Herlina T. Biodegradation styrofoam by soil bacteria from Sarimukti Cipatat Bandung final disposal site // AL-Kaunivah J. Biol. 2020. V. 13. P. 218–227.

Ho B.T., Roberts T.K., Lucas S. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach // Crit. Rev. Biotechnol. 2018. V. 38. P. 308–320.

Horton A.A., Walton A., Spurgeon D.J., Lahive E., Svendsen C. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities // Sci. Total Environ. 2017. V. 586. P. 127–141.

Hu X., Thumarat U., Zhang X., Tang M., Kawai F. Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 771–779.
https://doi.org/10.1007/s00253-010-2555-x

Iiyoshi Y., Tsutsumi Y., Nishida T. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase // J. Wood Sci. 1998. V. 44. P. 222–229.

Jambeck J.R., Geyer R., Wilcox C., Siegler T.R., Perryman M., Andrady A., Narayan R., Law K.L. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean // Science. 2015. V. 347. P. 768–771.

Jeon H.J., Kim M.N. Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2015. V. 103. P. 141–146.

Jeon H.J., Kim M.N. Isolation of mesophilic bacterium for biodegradation of polypropylene // Int. Biodeter. Biodegr. 2016. V. 115. P. 244–249. doi:10.1016/j.ibiod.2016.08.025

Jeyakumar D., Chirsteen J., Doble M. Synergistic effects of pretreatment and blending on fungi mediated biodegradation of polypropylenes // Bioresour. Technol. 2013. V. 148. P. 78–85.

Kaplan D.L., Roy H., Jim S. Biodegradation of polystyrene, poly(metnyl methacrylate), and phenol formaldehyde // Appl. Environ. Microbiol. 1979. V. 38. P. 551–553.

Karimi M., Biria D. The promiscuous activity of alpha-amylase in biodegradation of low density polyethylene in a polymer-starch blend // Nat. Sci. Rep. 2019. V. 9. Art. 2612.

Kawai F., Watanabe M., Shibata M., Yokoyama S., Sudate Y., Hayashi S. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi // Polym. Degrad. Stab. 2004. V. 86. P. 105–114.
https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.03.015

Kawai F., Oda M., Tamashiro T., Waku T., Tanaka N., Yamamoto M., Mizushima H., Miyakaw T., Tanokura M. A novel Ca^{2+}-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 10053–10064.

Kawai F., Kawabata T., Oda M. Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. P. 4253–4268.

Kawai F., Kawabata T., Oda M. Current state and perspectives related to the polyethylene terephthalate hydrolases available for biorecycling // ACS Sustainable Chem. Eng. 2020. V. 8. P. 8894–8908.

Khatoon N., Jamal A., Ali M.I. Lignin peroxidase isoenzyme: a novel approach to biodegrade the toxic synthetic polymer waste // Environ. Technol. 2019. V. 40. P. 1366–1375.

Kiessling T., Gutow L., Thiel M. Marine litter as habitat and dispersal vector // Marine Anthropogenic Litter / Eds. Bergmann M., Gutow L., Klages M. Springer, Cham. 2015.

Kim H.R., Lee H.M., Yu H.C., Jeon E., Lee S., Li J.J. et al. Biodegradation of polystyrene by Pseudomonas sp. isolated from the gut of superworms (Larvae of Zophobas atratus). Environ. Sci. Technol. 2020. V. 54. P. 6987–6996. doi: 10.1021/acs.est.0c01495

Kimura Y., Oda K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) // Science. 2016. V. 351. P. 1196–1199.

Kleeberg I., Hetz C., Kroppenstedt R.M., Müller R.J., Deckwer W.-D. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 1731–1735.
https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1731-1735.1998

Kirbaş Z., Keskin N., Güner A. Biodegradation of polyvinylchloride (PVC) by white rot Fungi // Bull. Environm. Contamin. Toxicol. 1999. V. 63. P. 335–342.

Koutny M., Sancelme M., Dabin C., Pichon N., Delort A., Lemaire J. Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. P. 1495–1503.
https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.10.007

Kowalczyk A., Chyc M., Ryszka P., Latowski D. Achromobacter xylosoxidans as a new microorganism strain colonizing high-density polyethylene as a key step to its biodegradation // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. P. 11349–11356.

Krueger M.C., Hofmann U., Moeder M., Schlosser D. Potential of wood-rotting fungi to attack polystyrene sulfonate and its depolymerisation by *Gloeophyllum trabeum* via hydroquinone-driven fenton chemistry // PLoS One. 2015. V. 10. e0131773.

Kühn S., Rebolledo E.L.B., van Franeker J.A. Deleterious effects of litter on marine life // Marine Anthropogenic Litter. 2015. P. 75–116.

Kundungal H., Gangarapu M., Sarangapani S., Patchaiyappan A., Devipriya S.P. Efficient biodegradation of polyethylene (HDPE) waste by the plastic-eating lesser waxworm (Achroia grisella). // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2019. V. 26. P. 18509–18519. doi: 10.1007/s11356-019-05038-9

Kumar G.A., Hinduja M., Sujitha K., Rajan N.N., Dharani G. Biodegradation of polystyrene by deep-sea *Bacillus paralicheniformis* G1 and genome analysis // Sci. Total Environ. 2021. V. 774. e145002.

Kundungal H., Manjari B., Sarangapany S. et al. Efficient biodegradation of polyethylene (HDPE) wate by the plastic-eating lesser waxworm (Achoria grisella). // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. V. 26. P. 18509–18519.

Laist D. Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. Marine Poll. Bull. 1987. V. 18. P. 319–326.

Lau W.W.Y., Shiran Y., Bailey R.M. et al. Evaluating scenarios toward zero plastic pollution // Science. 2020. V. 369. P. 1455–1461.

Lee J.H., Lim K.S., Hahm W.G., Kim S.H. Properties of recycled and virgin poly(ethylene terephthalate) blend fibers // J. Appl. Polym. Sci. 2013. V. 128. P. 1250–1256.

Liebminger S., Eberl A., Sousa F., Heumann S., Fischer-Colbrie G., Cavaco-Paulo A., Guebitz G.M. Hydrolysis of PET and *bis*-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum* // Biocatal. Biotransform. 2007. V. 25. P. 171–177.

Liu Y., Wu G., Gu L. Enzymatic treatment of PET fabrics for improved hydrophilicity // AATCC Rev. 2008. V. 8. P. 44–48.

Lohse D.J. Polyolefins // Applied Polymer Science: 21st Century / Eds. C.D. Craver, C.E. Carraher. Pergamon, 2000. P. 73–91. ISBN 9780080434179.
https://doi.org/10.1016/B978-008043417-9/50008-8

Lou Y., Pererva E., Yang S.-S., Lu B., Liu B., Ren N., Corvini P.F.-X., Xing D. Bio-degradation of polyethylene and polystyrene by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) and the effect of co-diet supplementation on the core gut microbiome // Environ. Sci. Technol. 2020. V. 54. P. 2821–2831.
https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07044

Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo J.-E. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques: a review // Chemosphere. 2008. V. 73. P. 429–442.

Lusher A.L., Hernandez-Milian G., Berrow S., Rogan E., O'Connor I. Incidence of marine debris in cetaceans stranded and bycaught in Ireland: Recent findings and a review of historical knowledge // Environ. Pollut. 2018. V. 232. P. 467–476.

Luzia M.R.F., Sarrouh B., Lofrano R.C.Z. Evaluation of the biodegradation of phthalic contaminants originated from polyvinyl chloride commercial films // Acta Sci. Technol. 2020. V. 42. e47010.

Macali A., Semenov A., Venuti V., Crupi V., D'Amico F., Rossi B., Corsi I., Bergami E. Episodic records of jellyfish ingestion of plastic items reveal a novel pathway for trophic transference of marine litter // Sci. Rep. 2018. V. 8. Art. 6105.
https://doi.org/10.1038/s41598-018-24427-7

Manzur A., Limón-González M., Favela-Torres E. Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi // J. Appl. Polym. Sci. 2004. V. 92. P. 265–271.
https://doi.org/10.1002/app.13644

Marten E., Müller R.J., Deckwer W.D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters // Polym. Degrad. Stab. 2005. V. 88. P. 371–381.

Maurya A., Bhattacharya A., Khare S.K. Enzymatic remediation of polyethylene terephthalate (PET) – based polymers for effective management of plastic wastes: an overview // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. Art. 602325.

Meekum U., Kenharaj R. Comparative study of polystyrene foam degradation in the open-air and artificial weathering // Arabian J. Sci. Eng. 2002. V. 27 1C. P. 25–32.

Milstein O., Gersonde R., Huttermann A., Chen M.J., Meister J.J. Fungal biodegradation of lignopolystyrene graft copolymers // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 3225–3232.

Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters / Eds. Scheirs J., Long T.E. Hoboken, John Wiley & Sons, Ltd. 2003.
https://doi.org/10.1002/0470090685

Mohan A.J., Sekhar V.C., Bhaskar T., Nampoothiri K.M. 2016. Microbial assisted high impact polystyrene (HIP) degradation. // Bioresour. Technol. 2016. V. 213. P. 204–207. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.021

Mohanan N., Sharma P.K., Levin D.B. Characterization of an intracellular poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from the soil bacterium, Pseudomonas putida LS46. // Polym. Degrad. Stab. 2020. V. 175:109127. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109127

Montazer Z., Habibi Najafi M.B., Levin D.B. Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers // Can. J. Microbiol. 2019. V. 65. P. 1–11.
https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0335

Montazer Z., Habibi Najafi M.B., Levin D.B. Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene // Polymers. 2020. V. 12. Art. 123.
https://doi.org/10.3390/polym12010123

Mooney A., Ward P.G., O'Connor K.E. Microbial degradation of styrene: biochemistry, molecular genetics, and perspectives for biotechnological applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 1–10.
https://doi.org/10.1007/s00253-006-0443-1

Mor R., Sivan A. Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*: biodegradation of polystyrene // Biodegradation. 2008. V. 19. P. 851–858.

Moreno R., Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes in bacteria // Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. Rojo F. Springer Nature Switzerland AG, 2019. P. 118–142.

Morrison E., Kantz A., Gassner G.T., Sazinsky M.H. Structure and mechanism of styrene monooxygenase reductase: new insight into the FAD-transfer reaction // Biochemistry. 2013. V. 52. P. 6063–6075.

Motta O., Proto A., De Carlo F., Santoro E. Brunetti L., Capunzo M. Utilization of chemically oxidized polystyrene as co-substrate by filamentous fungi // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2009. V. 212. P. 61–66.
https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.09.014

Muhonja C.N., Makonde H., Magoma G., Imbuga M. Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from dandora dumpsite Nairobi-Kenya // PLoS One. 2018. V. 13. e0198446.

Mukherjee S., Kundu P.P. Alkaline fungal degradation of oxidized polyethylene in black liquor: studies on the effect of lignin peroxidases and manganese peroxidases // J. Appl. Polym. Sci. 2014. V. 131. P. 40738.

Müller R.-J. Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing // Biopolymers Online. 2005. V. 12. P. 365–388.

Müller R.-J. Biological degradation of synthetic polyesters – Enzymes as potential catalysts for polyester recycling // Proc. Biochem. 2006. V. 41. P. 2124–2128.
https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.018

Nakamiya K., Hashimoto S., Ito H., Edmonds J.S., Yasuhara A., Morita M. Microbial treatment of *bis*(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride with isolated bacteria // J. Biosci. Bioeng. 2005. V. 99. P. 115–119.

Nanda S., Sahu S.S. Biodegradability of polyethylene by *Brevibacillus, Pseudomonas*, and *Rhodococcus* spp. // N.Y. Sci. J. 2010. V. 3. P. 95–98.

Naz I., Batool S.A., Naeem A., Khatoon N., Atiq N., Hameed A., Ahmed S. Monitoring of growth and physiological activities of biofilm during succession on polystyrene from activated sludge under aerobic and anaerobic conditions // Environ. Monit. Assess. 2013. V. 185. P. 6881–6892.

Nikolic V., Velickovic S., Popovic A. Biodegradation of polystyrene–graft–starch copolymers in three different types of soil // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2014. V. 21. P. 9877–9886.

Nikolic V., Velickovic S., Antonovic D., Popovic A. Biodegradation of starch–graft–polystyrene and starch–graft–poly(methacrylic acid) copolymers in model river water // J. Serb. Chem. Soc. 2013. V. 78. P. 1425–1441.

Nechwatal A., Blokesch A., Nicolai M., Krieg A., Kolbe A., Wolf M., Gerhardt M. A contribution to the investigation of enzyme-catalysed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) oligomers // Macromol. Mater. Eng. 2006. V. 291. P. 1486–1494.

Niessner N., Gausepohl H. Polystyrene and styrene copolymers – an overview // Modern Styrenic Polymers: Polystyrenes and Styrenic Copolymers / Eds. Scheirs J., Priddy D.B. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2003. Ch. 2. P. 25–41.

Nowak B., Pajak J., Drozd-Bratkowicz M., Rymarz G. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions // Int. Biodeteror. Biodegr. 2011. V. 65. P. 757–767.

Oelschlägel M., Zimmerling J., Tischler D. A review: the styrene metabolizing cascade of side-chain oxygenation as biotechnological basis to gain various valuable compounds // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 490.

Oelschlägel M., Gröning J.A.D., Tischler D., Kaschabek S.R., Schlömann M. Styrene oxide isomerase of *Rhodococcus opacus* 1CP, a highly stable and considerably active enzyme // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 4330–4337.

Ojeda T., Freitas A., Birck K., Dalmolin E., Jacques R., Bento F., Camargo F. Degradability of linear polyolefins under natural weathering // Polym. Degrad. Stab. 2011. V. 96. P. 703–707.
https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.004

O'Leary N.D., O'Connor K.E., Ward P., Goff M., Dobson A.D. Genetic characterization of accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene in *Pseudomonas putida* CA-3 // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 4380–4387.

Orr I.G., Hadar Y., Sivan A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65. P. 97–104.
https://doi.org/10.1007/s00253-004-1584-8

Otake Y., Kobayashi T., Asabe H., Murakami N. Biodegradation of low density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years // Appl. Polym. Sci. 1995. V. 56. P. 1789–1796.

Paco A., Duarte K., da Costa J.P., Santos P.S.M., Pereira R., Pereira M.E., Freitas A.C., Duarte A.C., Rocha-Santos T.A.P. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum* // Sci. Total Environ. 2017. V. 586. P. 10–15.

Pardo-Rodríguez M.L., Zorro-Mateus, P.J.P. Biodegradation of polyvinyl chloride by Mucor sp. and Penicillium sp. isolated from soil. // Revista de Investigación Desarrollo e Innovación: RIDI, ISSN 2027-8306, ISSN-e 2389-9417. 2021. P. 387–400.

Park S.Y., Kim C.G. Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a land fill site // Chemosphere. 2019. V. 222. P. 527–533.

Peciulyte D. Microbial colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride plastics // Ekologija. 2002. V. 4. P. 7–15.

Peixoto J., Silva L.P., Krüger R.H. Brazilian Cerrado soil revealsan untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation // J. Hazard. Mater. 2017. V. 324. P. 634–644.
https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.037

Peng B.-Y., Su Y., Chen Z., Chen J., Zhou X., Benbow M.E., Criddle C.S., Wu W.-M., Zhang Y. Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae) // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. P. 5256–5265.
https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06963

Peng B.-Y., Chen Z., Chen J., Yu H., Zhou X., Criddle C.S., Wu W.-M., Zhang Y. Biodegradation of polyvinylchloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (*Coleoptera:* Tenebrionidae) larvae // Environ. Int. 2020. V. 145. P. 106.

Peng X., Chen M. S., Chen S., Dasgupta H.X., Ta K., Du M., Li J., Guo Z., Bai S. Microplastics contaminate the deepest part of the world's ocean // Geochem. Persp. Let. 2018. V. 9. P. 1–5.
https://doi.org/10.7185/geochemlet.1829

Pirillo V., Pollegioni L., Molla G. Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate // FEBS J. 2021. Epub ahead of print. PMID: 33792200.
https://doi.org/10.1111/febs.15850

Plastics Europe https://www.plasticseurope.org/en/newsroom/events/2021

Pometto A.L., Lee B.T., Johnson K.E. Production of an extracellular polyethylene-degrading enzyme(s) by *Streptomyces* species // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 731–733.

Pramila R., Ramesh K.V. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from municipal landfill area // J. Microbiol. Biotechnol. Res. 2011. V. 1. P. 131–136.

Pramila R., Ramesh K.V. Pontential degradation of low density polyethylene (LDPE) by *Acinetobacter baumanii* // Afr. J. Bacteriol. Res. 2015. V. 7. P. 24–28.

Raddadi N., Fava F. Biodegradation of oil-based plastics in the environment: Existing knowledge and needs of research and innovation // Sci. Total Environ. 2019. V. 679. P. 148–158.

Rajandas H., Parimannan S., Sathasivam K., Ravichandran M., Yin L.S. A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation // Polym. Test. 2012. V. 31. P. 1094–1099.
https://doi.org/10.1016/j.polymertesting

Reddy M.M., Deighton M., Gupta R.K., Bhattacharya S.N., Parthasarathy R. Biodegradation of oxo-biodegradable

polyethylene // J. Appl. Polym. Sci. 2009. V. 111. P. 1426–1432.

Ren L., Men L., Zhang Z., Guan F., Tian J., Wang B., Wang J., Zhang Y., Zhang W. Biodegradation of polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the guts of Wax Moth *Galleria mellonella* // Int. J. Environ. Res. Publ. Health. 2019. V. 16. Art. 1941.
https://doi.org/10.3390/ ijerph16111941

Restrepo-Florez J.M., Bassi A., Thompson M.R. Microbial degradation and deterioration of polyethylene – a review // Int. Biodeterior. Biodegr. 2014. V. 88. P. 83–90.

Ribitsch D., Heumann S., Trotscha E., Herrero Acero E., Greimel K., Leber, R., Birner-Gruenberger R., Deller S., Eiteljoerg I., Remler P., Weber T., Siegert P., Maurer K.H., Donelli I., Freddi G., Schwab H., Guebitz G.M. Hydrolysis of polyethylene-terephthalate by *p*-nitrobenzylesterase from *Bacillus subtilis* // Biotechnol. Prog. 2011. V. 27. P. 951–960.

Ribitsch D., Herrero Acero E., Greimel K., Dellacher A., Zitzenbacher S., Marold A., Rodriguez R.D., Steinkellner G., Gruber K., Schwab H., Guebitz G.M. A new esterase from *Thermobifida halotolerans* hydrolyses polyethylene terephthalate (PET) and polylactic acid (PLA) // Polymers. 2012. V. 4. P. 617–629.

Riudavets J., Salas I., Pons M.J. Damage characteristics produced by insect pests in packaging film // J. Stored Prod. Res. 2007. V. 43. P. 564–570.
https://doi.org/10.1016/j.jspr.2007.03.006

Rochman C., Hoh E., Kurobe T. et al. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. // Sci Rep. 2013. V. 3. 3263. https://doi.org/ 10.1038/srep03263.

Ronkvist A.M., Xie W.C., Lu W.H., Gross R.A. Cutinase catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) // Macromolecules. 2009. V. 42. P. 5128–5138.

Ru J., Huo Y., Yang Y. Microbial degradation and valorization of plastic wastes // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 442.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442

Sabev H.A., Handley P.S., Robson G.D. Fungal colonization of soil-buried plasticized polyvinyl chloride (pPVC) and the impact of incorporated biocides // Microbiology (SGM). 2006. V. 152. P. 1731–1739.

Sahebnazar Z., Shojaosadati S.A., Mohammad-Taheri M., Nosrati M. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium // Waste Manage. 2010. V. 30. P. 396–401.
https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.09.027

Santo M., Weitsman R., Sivan A. The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber* // Int. Biodeterior. Biodegr. 2013. V. 84. P. 204–210.
https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.001

Sarmah P., Rout J. Efficient biodegradation of low-density polyethylene by cyanobacteria isolated from submerged polyethylene surface in domestic sewage water // Environ. Sci. Pollut. Res. 2018.
https://doi.org/10.1007/s11356-018-3079-7

Schmaltz E., Melvin E.C., Diana Z., Gunady E.F., Rittschof D., Somarelli J.A., Virdin J., Dunphy-Daly M.M. Plastic pollution solutions: emerging technologies to prevent and collectmarineplastic pollution // Environ Int. 2020. V. 144. P. 106067.

Sen S., Raut S. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review // J. Environ. Chem. Eng. 2015. V. 3. P. 462–473.

Sekhar V.C., Nampoothiri K.M., Mohan A.J., Nair N.R., Bhaskar T., Pandey A. Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide. // J. Hazard. Mater. 2016. V. 318. P. 347–354. doi:10.1016/ j.jhazmat.2016.07.008

Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review // Biotechnol. Adv. 2008. V. 26. P. 246–265.
https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005

Sharma S.R. Bioremediation of polythenes and plastics: a microbial approach // In: R. Prasad, E. Aranda (eds.), Approaches in bioremediation, Nanotechnology in the life.sciences. 2018. Springer Nature Switzerland AG. P. 97–114.

Sheavly S.B., Register K.M. Marine debris & plastics: environmental concerns, sources, impacts and solutions // J. Polym. Environ. 2007. V. 15. P. 301–305.

Sheel A., Pant D. Microbial depolymerization (In: S. J. Varjani, E. Gnansounou G. Baskar, D. Pant, Z.A. Zakaria (eds.), Waste Bioremediation, Energy, Environment, and Sustainability. 2018. Springer Nature Singapore Pte Ltd. P. 61–103.

Sheik S., Chandrashekar K.R., Swaroop K., Somashekarappa H.M. Biodegradation of gamma irradiated low density polyethylene and polypropylene by endophytic fungi // Int. Biodeterior. Biodegr. 2015. V. 105. P. 21–29.

Shimpi N., Mishra S., Kadam M. Biodegradation of polystyrene (PS)-poly(lactic acid) (PLA) nanocomposites using Pseudomonas aeruginosa. // Macromol. Res. 2012. V. 20. P. 181–187. doi: 10.1007/s13233-012-0026-1

Sielicki M., Focht D.D., Martin J.P. Microbial degradation of [^{14}C]polystyrene and 1,3-diphenylbutane // Can. J. Microbiol. 1978. V. 2. P. 798–803.

Silva C., Da S., Silva N., Matama T., Araujo R., Martins M., Chen S., Chen J., Wu J., Casal M., Cavaco-Paulo A. Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates // Biotechnol. J. 2011. V. 6. P. 1230–1239.

Sivan A., Szanto M., Pavlov V. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 346–352.

Skariyachan S., Patil A.A., Shankar A., Manjunath M., Bachappanavar N., Kiran S. Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sp. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants // Polym. Degrad. Stab. 2018. V. 149. P. 52–68.
https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018

Son Y., Qui R., Hu J., Zhang X. et al. Biodegradation and desintegration of expanded polystyrene by land snails Achatine fulica. // Sci. Total. Environm. 2020. V. 746. 141289.

Sowmya H.V., Ramalingappa Krishnappa M., Thippeswamy B. Biodegradation of polyethylene by *Bacillus cereus* // Adv. Polym. Sci. Technol. Int. J. 2014. V. 4. P. 28–32.

Sudhakar M., Doble M., Murthy P. S., Venkatesan R. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes // Int. Biodeterior. Biodegr. 2008. V. 61. P. 203–213.
https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.011

Sulaiman S., Yamato S., Kanaya E., Kim J.J., Koga Y., Takano K. et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalatedegrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 1556–1562. doi: 10.1128/AEM.06725-11

Tamnou E.M.B., Arafo A.T., Nougang M.E. et al. Biodegradation of polyethylene by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* in acidic microcosm and effect of the environmental temperature // Environ. Challenges. 2021. V. 3. e10056. https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100056

Tanasupawat S., Takehana T., Yoshida S., Hiraga K., Oda K. Ideonella sakaiensis sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 2813–2818.

Taniguchi I., Yoshida S., Hiraga K., Miyamoto K., Kimura Y., Oda K. Biodegradation of PET: current status and application aspects // ACS Catalysis. 2019. V. 9. P. 4089–4105.

Tischler D. Microbial Styrene Degradation. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2015. P. 7–22.

Tokiwa Y., Calabia B.P., Ugwu C.U., Aiba S. Biodegradability of plastics. // Int. J. Mol. Sci. 2009. V. 10. P. 3722–3742. doi: 10.3390/ijms10093722

Urgun-Demirtas M., Singh D., Pagilla K. Laboratory investigation of biodegradability of a polyurethane foam under anaerobic conditions // Polym. Degrad. Stabil. 2007. V. 92. P. 1599–1610.

Vertommen M.A.M.E., Nierstrasz V.A., van der Veer M., Warmoeskerken M.M.C.G. Enzymatic surface modification of poly(ethyleneterephthalate) // J. Biotechnol. 2005. V. 120. P. 376–386.

Vimala P.P., Mathew L. Biodegradation of polyethylene using *Bacillus subtilis* // Procedia Technol. 2016. V. 24. P. 232–239.

Volke-Sepúlveda T., Saucedo-Castañeda G., Gutiérrez-Rojas M., Manzur A., Favela-Torres E. Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger* // J. Appl. Polym. Sci. 2002. V. 83. P. 305–314.
https://doi.org/10.1002/app.2245

Wang X., Lu D., Jönsson L.J., Hong F. Preparation of a PET-hydrolyzing lipase from *Aspergillus oryzae* by the addition of *bis*(2-hydroxyethyl)terephthalate to the culture medium and enzymatic modification of PET fabrics // Eng. Life Sci. 2008. V. 8. P. 268–276.

Wang Z., Ma Z., Li L. Flow-induced crystallization of polymers: molecular and thermodynamic considerations // Macromolecules. 2016. V. 49. P. 1505–1517.

Webb J.S., Nixon M., Eastwood I.M., Greenhalgh M., Robson G.D., Handley P.S. Fungal colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3194–3200.

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.

Wei R., Oeser T., Then J., Kuhn N., Barth M., Schmidt J., Zimmermann W. Functional characterization and structural modeling of synthetic polyester-degrading hydrolases from *Thermomonospora curvata* // AMB Express. 2014. V. 4. P. 44.

Wei R., Oeser T., Schmidt J., Meier R., Barth M., Then J., Zimmermann W. Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition // Biotechnol. Bioeng. 2016. V. 113. P. 1658–1665.
https://doi.org/10.1002/bit.25941

Wei R., Zimmermann W. Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate // Microb. Biotechnol. 2017a. V. 10. P. 1302–1307.
https://doi.org/10.1111/1751-7915.12714

Wei R., Zimmermann W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 1308.

Wei W., Hao Q., Chen Zh., Bao T., Ni B.-J. Polystyrene nanoplastics reshape the anaerobic granular sludge for recovering methane from wastewater // Water Res. 2020. V. 182. P. 116041.

Woo S., Song I., Joon Cha H. Fast and facile biodegradation of polystyrene by the gut microbial flora of *Plesiophthalmus davidis* larvae // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. e01361-20.
https://doi.org/10.1128/AEM.01361-20

Wright S.L., Kelly F.J. Plastic and human health: a micro issue? // Environ. Sci. Technol. 2017. V. 51. P. 6634–6647.

Wu Q., Tao H., Wong M.H. Feeding and metabolism effects of three common microplastics on *Tenebrio molitor* // Environ. Geochem. Health. 2019. V. 41. P. 17–26.

Yamada-Onodera K., Mukumoto H., Katsuyama Y., Saiganji A., Tani Y. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK // Polym. Degrad. Stab. 2001. V. 72. P. 323–327.

Yang J., Yang Y., Wu W.M., Zhao J., Jiang L. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. // Environ. Sci. Technol. 2014. V. 48. P. 13776–13784. doi: 10.1021/es504038a

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 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests // Environ. Sci. Technol. 2015a. V. 49. P. 12080–12086.

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 // Environ. Sci. Technol. 2015b. V. 49. P. 12087–12093.

Yamada-Onodera K., Mukumoto H., Saiganji A., Tani Y. Degradation of polyethylene by a fungus, Penicillium simplicissimum. // Polymer Degr. Stab. 2001. V. 72. P. 323-327.

Yang Y., Wang J., Xia M. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *Zophobas atratus* // Sci. Total Environ. 2020. V. 15. V. 708. Art. 135233.
https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135233

Yanto D.H.Y., Ni P.R.A.K., Fenny C.A. etc. Biodegradation of styrofoam waste by ligninolytic fungi and bacteria. // IOP Conf. Series Earth Environ. Sci. 2019. V. 308:012001 DOI:10.1088/1755-1315/308/1/012001

Yin C.-F., Xu Y., Zhou N.-Y. Biodegradation of polyethylene mulching films by a co-culture of Acinetobacter sp. strain NyZ450 and Bacillus sp. strain NyZ451 isolated from Tenebrio molitor larvae. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2020. V. 155:105089. doi: 10.1016/j.ibiod.2020.105089

Yoon M.G., Jeon J.H., Kim M.N. Biodegradation of polyeth-

ylene by a soil bacterium and *AlkB* cloned recombinant cell // J. Bioremed. Biodegrad. 2012. V. 3. Art. 145.

Yoshida S., Hiraga K., Takehana T., Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y., Toyohara K., Miyamoto K., Zheng Y., Yanful E.K., Bassi A.S. A review of plastic waste biodegradation // Crit. Rev. Biotechnol. 2005. V. 25. P. 243–250.

Yoshida S., Hiraga K., Takehana T., Taniguchi I., Yamagi H., Maeda Y., Toyohara K., Miamoto K., Kimura Y., Oda K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) // Science. 2016. V. 351. P. 1196–1199.

Zhang J., Wan X., Gong J., Gu Z. A study on the biodegradability of polyethylene terephthalate fiber and diethylene glycol terephthalate // J. Appl. Polym. Sci. 2004. V. 93. P. 1089–1096.
https://doi.org/10.1002/app.20556

Zheng Y., Yanful E.K., Bassi A.S. A review of plastic waste biodegradation. // Crit. Rev. Biotechnol. 2005. V. 25. P. 243–250. doi: 10.1080/07388550500346359

Zheng J., Suh S. Strategies to reduce the global carbon footprint of plastics // Nat. Clim. Chang. 2019. V. 9. P. 374–378.

Zimmermann W., Billig S. Enzymes for the biofunctionalization of poly(ethylene terephthalate) // Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. V. 125. P. 97–120.

Microbial Degradation of Plastics and Approaches to Its Intensification

I. B. Kotova[1], Yu. V. Taktarova[1], E. A. Tsavkelova[1], M. A. Egorova[1], I. A. Bubnov[1], D. V. Malakhova[1], L. I. Shirinkina[1], T. G. Sokolova[2], and E. A. Bonch-Osmolovskaya[1, 2, *]

[1]*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

[2]*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: elizaveta.bo@gmail.com*

Received August 1, 2021; revised August 2, 2021; accepted August 2, 2021

Abstract—Ever increasing production of synthetic plastics results in a similar increase in the amount of plastic waste, which contaminates the environment. While microbial degradation of plastics occurs very slowly, many bacteria (including invertebrate symbionts) and microscopic fungi are known to be able to carry out this process. The studies in this field have been mostly concentrated on microbial degradation of polyethylene, polystyrene, and polyethylene terephthalate (PET). Various methods for detection the processes of plastic degradation and measuring their rates are presently available. The absence of unified protocols hinders, however, comparison of the results obtained by different authors. PET degradation by recombinant hydrolases from thermophilic actinobacteria is the most efficient of the presently known processes of plastic degradation. The review discusses various approaches to acceleration of the degradation of plastics.

Keywords: plastics, microbial degradation, detection methods, approaches to acceleration, thermostable hydrolases

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 660–680

ОБЗОРЫ

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПЛОТНОСТНО-ЗАВИСИМОЙ КОММУНИКАЦИИ У БАКТЕРИЙ: РАЗНООБРАЗИЕ СТРУКТУР, МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ И ИСТОЧНИКОВ ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2021 г.
Д. Г. Дерябин[a], *, А. А. Галаджиева[a, b], Д. Б. Косян[a], Г. К. Дускаев[a]

[a] *Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, Оренбург, 460000 Россия*

[b] *Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, 460000 Россия*

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

Поступила в редакцию 03.07.2021 г.
После доработки 20.07.2021 г.
Принята к публикации 22.07.2021 г.

В обзоре систематизированы современные данные о соединениях растительного происхождения, ингибирующих плотностно-зависимую коммуникацию (англ. – quorum sensing; QS) у бактерий. Описаны основные типы QS и дано представление о них как перспективной мишени для нового направления антимикробной терапии, ориентированной на подавление продукции факторов вирулентности и образования биопленок. Представлена методология поиска и исследования растительных ингибиторов QS. Охарактеризовано разнообразие обнаруженных растительных ингибиторов плотностно-зависимой коммуникации, относящихся к терпенам и терпеноидам, фенолам и метоксифенолам, кумаринам, флавоноидам, сульфоксидам и изотиоцианатам. Проанализировано действие названных растительных соединений на бактерии с различным типом организации QS, а также молекулярные механизмы развития подобных эффектов. Рассмотрено классификационное положение растений-продуцентов ингибиторов QS и имеющихся у них путей биосинтеза вторичных метаболитов с обсуждаемой активностью. Сформулировано положение о способности растений к ингибированию плотностно-зависимой коммуникации у бактерий как новом механизме врожденного фитоиммунитета, а также возможном использовании растительных ингибиторов QS для защиты животных и человека.

Ключевые слова: quorum sensing, ингибиторы QS, растительные соединения

DOI: 10.31857/S0026365621060057

СИСТЕМЫ ПЛОТНОСТНО-ЗАВИСИМОЙ КОММУНИКАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Зависимость роста и функционирования популяций от плотности входящих в их состав организмов является общебиологическим феноменом (Hixon, 2009). Его частным случаем у прокариот является плотностно-зависимая химическая коммуникация, обеспечивающая бактериям возможность реализации сложных паттернов кооперативного поведения (Swift et al., 2001). Общим принципом организации таких систем является образование и высвобождение во внешнюю среду специализированных сигнальных молекул – автоиндукторов (АИ), концентрация которых отражает текущую плотность бактериальной популяции. При достижении критического “порога” АИ начинают рецептироваться бактериальными клетками, что изменяет в них профили генной экспрессии и запускает процессы функциональной и морфологической дифференцировки (Miller, Bassler, 2001). Поскольку процесс автоиндукции предполагает восприятие каждым из сочленов популяции плотности его окружения, за ним закрепился термин “чувство кворума” (англ. – quorum sensing; QS).

Описанное к настоящему времени разнообразие систем QS основывается на характеристиках АИ и вариантах их рецепции. Исторически первой из них является двухкомпонентная система *LuxI*/*LuxR* типа, названная так по результатам исследования природы биолюминесценции морской симбиотической бактерии *Vibrio fischeri* (в современной классификации – *Aliivibrio fischeri*). Образуемый синтазой *LuxI* автоиндуктор – ацилированный лактон гомосерина (АГЛ), диффундирует во внешнюю среду, где накапливается до критических значений, после чего совершает обратное движение и рецептируется находящимся в цитоплазме белком LuxR (рис. 1а). Последний, предсуществующий в виде гомодимера, взаимодействуя с двумя молекулами АГЛ, изменяет свою

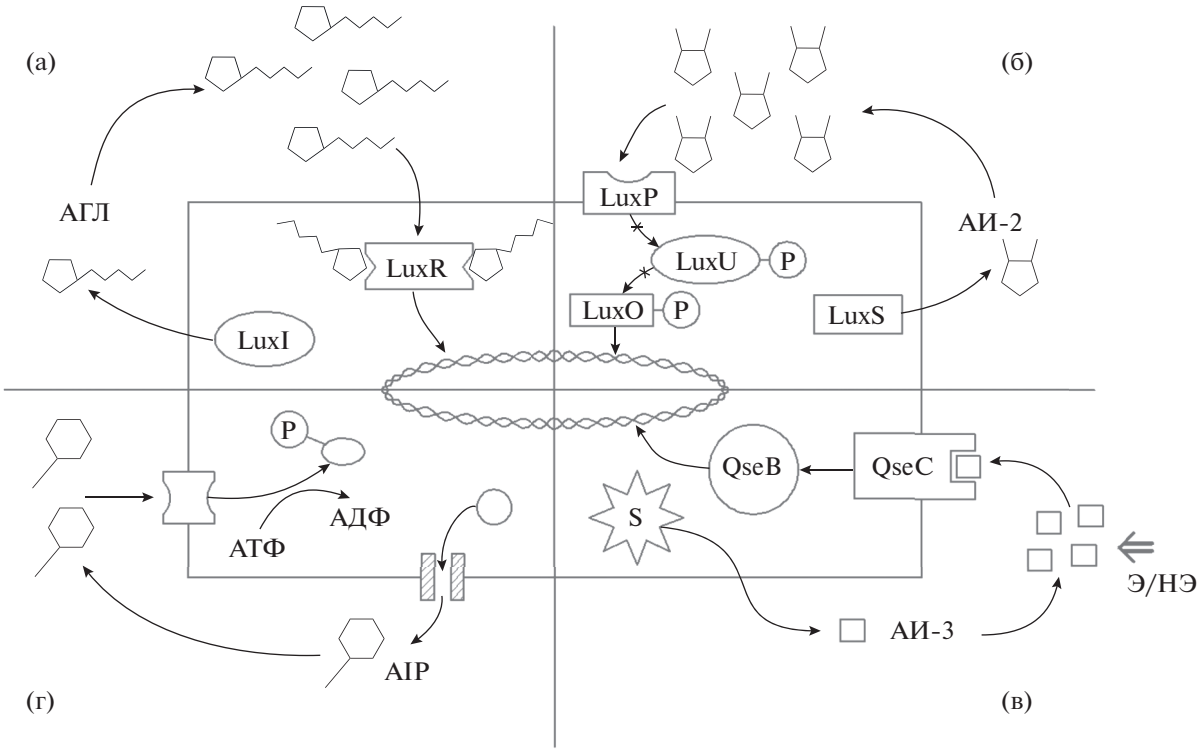


Рис. 1. Варианты систем плотностно-зависимой коммуникации у бактерий: а – система LuxI/LuxR типа, опосредуемая АГЛ (на примере *Vibrio fischeri*); б – система QS, опосредованная АИ-2 (на примере *Vibrio harveyi*); в – система QS, опосредованная АИ-3 и горомонами эпинефрином (Э) и норэпинефрином (НЭ) (на примере энтерогеморрагических штаммов *Escherichia coli*); г – система QS, опосредованная AIP (на примере *Staphylococcus aureus*).

конформацию, в результате чего приобретает способность к связыванию со специфическими последовательностями на бактериальной ДНК и запускает транскрипцию ранее молчащих генов, в том числе кассеты генов биолюминесценции (*lux*-оперона) (Egland, Greenberg, 1999). В дальнейшем оказалось, что стереотипно устроенные системы QS 1-го типа, опосредуемые различными по структуре АГЛ, характерны для широкого круга грамотрицательных бактерий, в том числе многочисленных фито- и зоопатогенов (Papenfort, Bassler, 2016).

Другим широко распространенным вариантом QS являются системы, опосредованные т.н. “автоиндуктором 2-го типа” (АИ-2) и обнаруживаемые как у грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. При этом имеющиеся у них синтазы семейства LuxS осуществляют образование предшественника 4,5-дигидрокси-2,3-пентандиона, который самопроизвольно подвергается реакциям циклизации и гидратации, ведущим к образованию “зрелого” АИ-2: тетрагидроксифурана (у *Salmonella typhimurium*) или фуранозилборатдиэфира (у морской бактерии *V. harveyi*). Структурные особенности данных молекул исключают возможность пассивной диффузии в цитоплазму бактериальных клеток, в связи с чем их рецепция осуществляется белками с мембранной локализацией (LsrB у *S. typhimurium*; LuxP у *V. harveyi*), а индукция QS-контролируемых генов происходит через запускаемые ими каскады дефосфорилирования внутриклеточных регуляторных белков (Pereira et al., 2013) (рис. 1б).

Третий тип QS первоначально связывался с системой автоиндукции у энтерогеморрагических штаммов *E. coli* (EHEC), имеющих комплекс QseBC (где *qseB* кодирует регулятор ответа, а *qseC* – сенсорную киназу) и воспринимающих гормоны эпинефрин и норэпинефрин, а также собственные структурно сходные с ними АИ-3 (Kendall et al., 2007), по современным представлениям являющиеся метаболитами пиразинона (Kim et al., 2020) (рис. 1в).

При этом подобные системы оказались характерны для некоторых других грамотрицательных бактерий, у которых они интегрированы в иерархически устроенные регуляторные сети с участием QS 1-го и 2-го типов.

В свою очередь четвертый тип организации плотностно-зависимой коммуникации типичен для грамположительных бактерий (например, *Staphylococcus aureus*) (рис. 1г), где включает циклические автоиндуцирующие пептиды (англ. – autoinducing peptides; AIP) и рецептирующие их мембранные белки-киназы, запускающие про-

цесс фосфорилирования внутриклеточных регуляторов транскрипции целевых генов (Le, Otto, 2015).

Результатом синхронной автоиндукции и координированной экспрессии генов в целостной бактериальной популяции является появление у нее совокупности свойств, реализация которых одиночными бактериальными клетками была бы неэффективной. При этом особое внимание привлекает к себе нахождение под контролем QS биосинтеза факторов вирулентности (Rutherford, Bassler, 2012), что определяется целесообразностью названного паттерна экспрессии только у значительной по численности бактериальной популяции, превышающей значение минимальной инфицирующей дозы. Кроме того, плотностно-зависимая коммуникация оказывается тесно связанной с процессами образования и функционирования бактериальных биопленок (Li, Tian, 2012), также рассматриваемых в качестве одного из важнейших факторов развития и поддержания инфекционного процесса.

Указанные обстоятельства определили интерес к поиску средств ингибирования QS болезнетворных бактерий как инструментов обнуления их патогенного потенциала в отсутствии развития бактерицидных или бактериостатических эффектов (Defoirdt, 2017). При этом ожидаемым преимуществом данного подхода должно стать отсутствие “селективного давления” на популяцию возбудителя, исключающее возможность образования новой генерации резистентных форм.

Среди предложенных стратегий поиска ингибиторов QS, включающих направленный синтез структурных антагонистов АИ, экспериментальный или виртуальный скрининг обширных библиотек химических соединений, уже нашедших свое применение в клинической практике или пищевой промышленности и т.д. (Lan et al., 2021), заметное место занимает поиск природных соединений с подобной активностью. В свою очередь высокая устойчивость растений в агрессивном бактериальном окружении, не полностью объясняемая известными механизмами их фитоиммунитета, определила перспективу поиска растительных ингибиторов QS, эволюционно направленных на бактериальные фитопатогены, снабженные механизмами плотностно-зависимой коммуникации (Koh et al., 2013).

МЕТОДОЛОГИЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПЛОТНОСТНО-ЗАВИСИМОЙ КОММУНИКАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Экспериментальному поиску анти-QS активности обычно предшествует предварительный отбор растительных субстратов с акцентом на их известное использование в традиционной (народной) медицине для лечения заболеваний бактериальной этиологии. Примерами подобного похода являются масштабные скрининги лекарственных растений, произрастающих в Северной Америке (Adonizio et al., 2006), Центральной и Восточной Европе (Tolmacheva et al., 2014), а также трав, используемых в традиционной китайской медицине (Koh, Tham, 2011). Непосредственным же материалом для исследования являются высушенные части отобранных растений, а также приготовленные на их основе экстракты, получаемые с использованием растворителей различной степени полярности (рис. 2).

Особенность выявляемого варианта биоактивности определила необходимость использования специальных тест-штаммов, позволяющих оценивать ингибирование QS на основе визуального или аппаратного учета определенных фенотипических характеристик. В наибольшей степени данный поход реализован для плотностно-зависимой коммуникации 1-го типа, что достигается использованием специально сконструированных биосенсоров, несущих АГЛ-рецептирующие белки, и при взаимодействии с соответствующим автоиндуктором запускающих в бактериальных клетках специфические биохимические реакции. Примерами являются рекомбинантные бактерии с клонированным геном LuxR-подобного белка и распознаваемым им промотором, под контролем которого находятся т.н. “репортерные” гены, в качестве которых используются *lux*-опероны (Winson et al., 1998), ген бета-галактозидазы (*lacZ*) или ген зеленого флуоресцирующего протеина (*gfp*) (Andersen, 2001). Другим известным примером является штамм *Chromobacterium violaceum* 026 (NCTC 13278), возможность использования которого для заявленной цели обеспечивается инсерцией Tn5-транспозона в ген синтазы автоиндуктора CviI с сохранением возможности его рецепции белком CviR, запускающим биосинтез сине-фиолетового пигмента виолацеина (McClean, 1997). В то же время для исследования большинства других систем плотностно-зависимой коммуникации специфичные тест-объекты до сих пор не разработаны, в связи с чем тестирование ведется на примере “диких” штаммов с полноценными системами QS и доказанной совокупностью кворум-регулируемых признаков. Аналогичный подход используется и при исследовании влияния растительных экстрактов на процесс образования бактериальных биопленок, что предусматривает проведение тестирования на релевантных грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*) (Rzhepishevska et al., 2018) или грамположительных (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.) (Cruz et al., 2018) микроорганизмах.

На следующем этапе растительные экстракты с наиболее выраженной биоактивностью стано-

Рис. 2. Основные этапы обнаружения и исследования растительных ингибиторов плотностно-зависимой коммуникации у бактерий (обведены сплошной линией) и варианты их исполнения (обведены пунктирной линией).

вятся объектом для фитохимического анализа, направленного на идентификацию в их составе химических соединений, определяющих развитие QS-ингибирующего эффекта и подавление образования бактериальных биопленок. В некоторых исследованиях эта задача решалась путем прямого фракционирования растительных экстрактов (например, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии; ВЭЖХ), позволяющей выделить из сложной смеси растительных молекул целевой компонент с последующей идентификацией его структуры методом ЯМР (Adonizio et al., 2008). Однако в ряде случаев проведение ВЭЖХ сопровождалось диссипацией искомого эффекта (Deryabin, Tolmacheva, 2015), в связи с чем более широкое распространение получил метод предварительной идентификации компонентного состава растительных экстрактов методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС), на основании которого фор-

мировались библиотеки обнаруженных химических соединений.

Для подтверждающего биотестирования привлекаются описанные выше тесты *in vitro*, а также разнообразные модели *in vivo*, призванные доказать защитный потенциал анализируемых соединений при экспериментальной инфекции у беспозвоночного *Caenorhabditis elegans* (Kong et al., 2016) или у мелких млекопитающих (van derWorp et al., 2010).

В свою очередь завершающим этапом современных экспериментальных исследований является определение молекулярного механизма действия химических соединений с подтвержденной анти-QS активностью, что может быть достигнуто на основе совокупности исследований *in silico* (при моделировании взаимодействия с синтазой автоиндуктора или рецепторным белком) (Byeon et al., 2017), а также путем проведения протеомного (Swatton et al., 2016) и транскриптомного (Asfahl, Schuster, 2017) анализа.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПЛОТНОСТНО-ЗАВИСИМОЙ КОММУНИКАЦИИ У БАКТЕРИЙ

В настоящем обзоре мы предпринимаем попытку систематизации массива современных научных данных по обсуждаемому вопросу, в том числе путем описания основных групп идентифицированных соединений растительного происхождения (рис. 3), их эффектов на различные системы плотностно-зависимой коммуникации у бактерий (табл. 1), а также вероятных механизмов регистрируемой анти-QS активности.

Терпены, терпинены и терпеноиды. Терпены – соединения, состоящие из одного или нескольких изопреновых звеньев и описываемые общей формулой $(C_5H_8)_n$. В зависимости от числа изопреновых звеньев, образующих углеродный скелет молекулы, они разделяются на монотерпены ($C_{10}H_{16}$) с одной (лимонен; 1.1.1) или двумя (пинен; 1.1.2) циклическими группами; сесквитерпены ($C_{15}H_{24}$), например, аромадендрен (1.2.1), а также ди-, три-, тетра- и политерпены. Структурно близкими к монотерпенам являются терпинены, соответствующие общей формуле ($C_{10}H_{16}$). Их особенностью является существование четырех различных изомеров (α, β, γ, δ), различающихся положением двойной связи между соседними атомами углерода. Наиболее часто встречающимися в природе являются α- и γ-терпинены (1.3.1 и 1.3.2). Цимол ($C_{10}H_{14}$; 1.4.1) имеет дополнительную двойную связь в углеводородном кольце и в этой связи часто классифицируется как "моноциклический арен" или "алкилбензен". В то же время совокупность физико-химических свойств определяют целесообразность его рассмотрения в составе обсуждаемой группы растительных соединений. В свою очередь терпеноиды также являются производными изопрена, но имеют дополнительные кислородсодержащие группы. Указанная особенность определяет их повышенную лабильность, склонность к изомеризации, циклизации и полимеризации. Как и терпены, терпеноиды классифицируются на основе количества входящих в их структуру изопреновых звеньев, а их известными примерами являются монотерпеновый ациклический альдегид цитраль ($C_{10}H_{16}O$; 1.5.1); моноциклический эфир цинеол ($C_{10}H_{18}O$; 1.5.2), а также циклический тепеноид карвон ($C_{10}H_{14}O$; 1.5.3).

Первые наблюдения о наличии анти-QS активности у терпенов и близких к ним растительных соединений связаны с ее обнаружением у эфирных масел – растительных экстрактов, получаемых из разных частей растений дистилляционным методом (табл. 1). В частности, исследование биоактивности мандаринового масла, показавшего подавление кворум-индуцируемой продукции эластазы и образования биопленки *P. aeruginosa*, позволило связать регистрируемые эффекты с присутствием лимонена (Luciardi et al., 2016). Активность данного соединения, дополняемого действием пинена, аромадендрена и других терпеноидов, подтверждена и при исследовании эвкалиптовых эфирных масел, подавляющих кворум-индуцируемые проявления у *Acinetobacter baumannii* (Luís et al., 2016).

Активность терпиненов продемонстрирована в отношении биопленкообразования у грамположительного микроорганизма *S. aureus* (Sharifi et al., 2018). В свою очередь эфирные масла с высоким содержанием *p*-цимола и его гидроксипроизводных тимола, и карвакрола подавляли биопленкообразование *E. coli* и *S. epidermidis* (Cáceres et al., 2020), что дополнялось их ингибирующим эффектом на систему "кворум сенсинга" 1-го типа у *C. violaceum*.

Для очищенного монотерпенового ациклического альдегида цитраля способность к подавлению экспрессии генов вирулентности, регулируемых системой "кворум сенсинга" 2-го типа, показана как в отношении грамотрицательного патогена *Vibrio alginolyticus* (Liua et al., 2020), так и грамположительного патогена *Streptococcus pyogenes* (Adil et al., 2019), что в последнем случае дополнялось развитием антибиопленочного эффекта и могло быть усилено в присутствии флавоноидов (см. ниже). Сходные эффекты 1,8-цинеола в отношении *S. aureus* с системой "кворум-сенсинга" 4-го типа были продемонстрированы при тестировании эвкалиптового масла, в котором данный терпеноид является превалирующим компонентом (Merghni et al., 2018). Наконец, еще один терпеноид – карвон развивал активность в отношении *Hafnia alvei* с системой QS 1-го типа, что прояв-

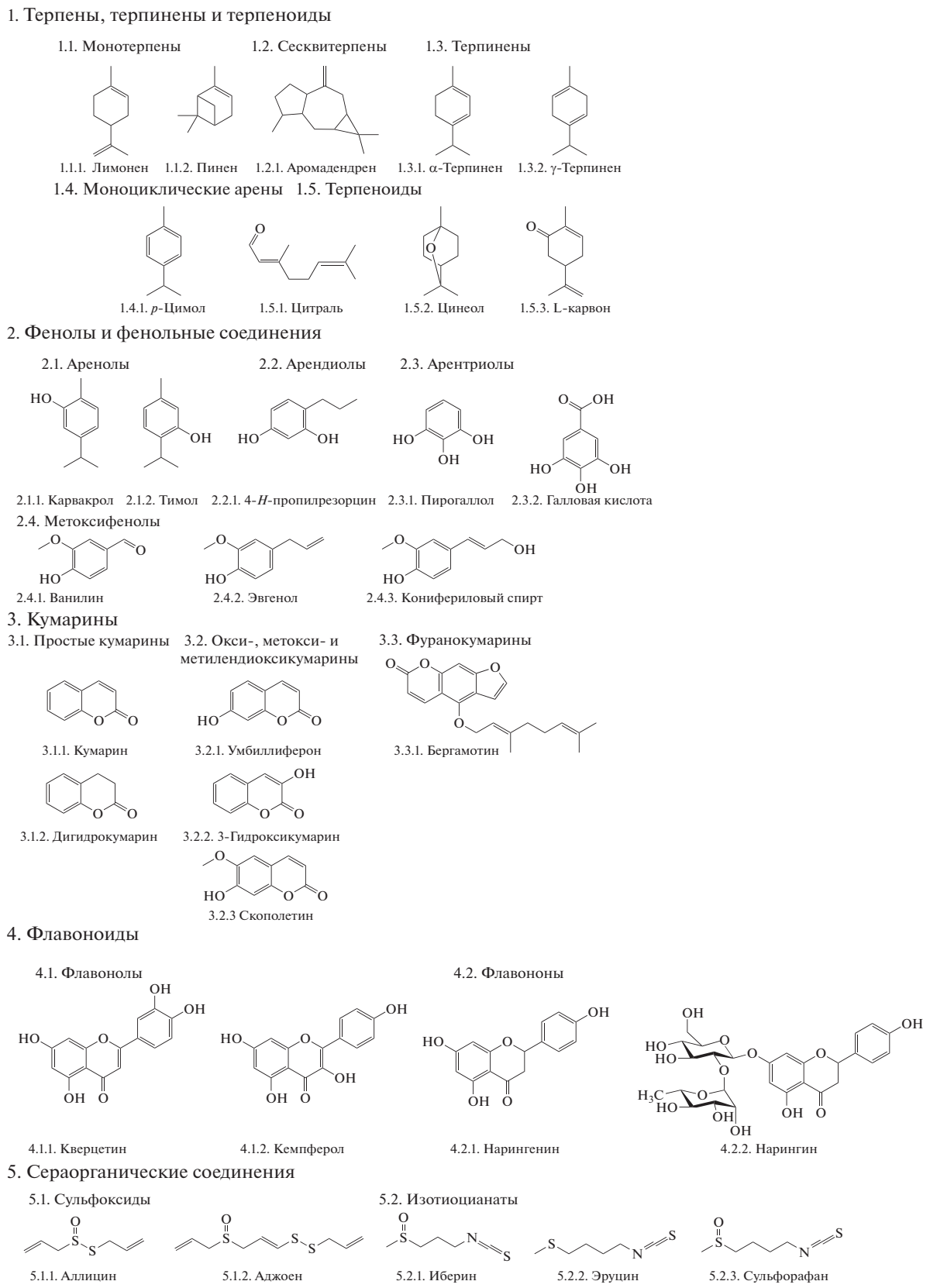


Рис. 3. Разнообразие структур химических соединений растительного происхождения, ингибирующих плотностно-зависимую коммуникацию у бактерий (пояснения в тексте).

Таблица 1. Эффекты растительных соединений на системы плотностно-зависимой коммуникации у бактерий

№	Химическое соединение	Растение-продуцент	Тест-объект	Тип QS	Регистрируемые эффекты: ингибирование QS-регулируемых признаков*	Регистрируемые эффекты: подавление образования биопленок	Литература
1. Терпены, терпинены и терпеноиды							
1.1.1	Лимонен	*Citrus reticulate* (мандарин)	*P. aeruginosa*	I	+	+	Luciardi et al., 2016
1.1.2	Пинен	*Eucalyptus globulus* (эвкалипт шаровидный); *Eucalyptus radiata* (эвкалипт лучистый)	*A. baumannii*	I	+	Нд**	Luís et al., 2016
1.2.1	Аромадендрен						
1.3	Терпинен	*Thymus daenensis* (тимьян), *Satureja hortensis* (чабер садовый)	*S. aureus*	IV	+	+	Sharifi et al., 2018
1.4.1	*p*-Цимол	*Eucalyptus globulus* (эвкалипт шаровидный)	*C.violaceum*	I	+	+	Cáceres et al., 2020
			E. coli O157:H7, *E. coli* O33	III			
			S. epidermidis	IV			
1.5.1	Цитраль		*V. alginolyticus* и *S. pyogenes*	II	+	+	Adil et al., 2019; Liua et al., 2020
1.5.2	Цинеол		*S. aureus*	IV	+	+	Merghni et al., 2018
1.5.3	L-карвон	*Thymus vulgare* (тимьян обыкновенный)	*H. alvei*	I	+	+	Li et al., 2019
2. Фенолы и фенольные соединения							
2.1.1	Карвакрол	*Thymus vulgare* (тимьян обыкновенный)	*C. violaceum* и *P. aeruginosa*	I	+	+	Burt et al., 2014; Tapia-Rodriguez et al., 2019; Cáceres et al., 2020
			S. enterica	II			
			S. aureus	IV			
2.1.2	Тимол	*Carum copticum* (ажгон) и *Thymus vulgare* (тимьян обыкновенный)	*C. violaceum* и *P. fluorescens* KM121	I	+	+	Myszka et al., 2016; Snoussi et al., 2019; Cáceres et al., 2020
2.2.1	4-*H*-Пропилрезорцин	*Quercus robur* (дуб обыкновенный)	*C. violaceum*	I	+	+	Дерябин соавт., 2014; Deryabin, Tolmacheva, 2015
2.3.1	1,2,3-Пирогаллол		*C. violaceum*	I	+	Нд	Ni et al., 2008; Deryabin, Tolmacheva, 2015
			V. harveyi	II			
2.3.2	Галловая кислота		*C. violaceum* и *P. aeruginosa*	I	+	+	Kim et al., 2019

Таблица 1. Продолжение

№	Химическое соединение	Растение-продуцент	Тест-объект	Тип QS	Регистрируемые эффекты		Литература
					ингибирование QS-регулируемых признаков*	подавление образования биопленок	
2.4.1	Ванилин	*Vanilla planifolia* (ваниль плосколистная), *Quercus robur* (дуб обыкновенный)	*C. violaceum* и *A. hydrophila*	I	+	+	Choo et al., 2006; Ponnusamy et al., 2009
2.4.2	Эвгенол	*Cuminum cyminum* (зира)	*C. violaceum* и *P. aeruginosa*	I	+	+	Sybiya Vasantha Packiavathy et al., 2012; Al-Shabib et al., 2017; Lou et al., 2019
			S. aureus	IV			
2.4.3	Конифериловый спирт	*Quercus robur* (дуб обыкновенный)	*C. violaceum*	I	+	Нд	Deryabin, Tolmacheva, 2015
			3. Кумарины				
3.1.1	Кумарин	*Dipteryx odorata, Melilotus suaveolens, Galium odoratum* (диптерикс, донник, подмаренник душистые), *Cinnamomum cassia* (коричник китайский), *Justicia pectoralis*	*C. violaceum*, *P. aeruginosa* и *A. fischeri*	I	+	+	Schreier et al., 1991; Lino et al., 1997; Wang et al., 2013; Lee et al., 2014; Gutiérrez-Barranquer et al., 2015; Deryabin, Tolmacheva, 2015
			E. coli O157:H7	II			
3.1.2	Дигидрокумарин	*Lavandula angustifolia* (лаванда узколистная), *Melilotus officinalis* (донник)	*C. violaceum*, *H. alvei* и *P. aeruginosa*	I	+	+	Kovaleva et al., 2009; Elharas et al., 2013; Hou et al., 2017; D'Almeida et al., 2017
3.2.1	Умбеллиферон	*Archangelica officinalis* (дудник лекарственный), *Ferula communis* (ферула обыкновенная), *Justicia pectoralis*	*E. coli*	II	Нд	+	Härmälä et al., 1992; Wang et al., 2013; Lee et al., 2014, Yu et al., 2015;
3.2.2	3-Гидроксикумарин	*Ferula communis* (ферула обыкновенная)	*C. violaceum*	I	+	–	Kovaleva et al., 2009; D'Almeida et al., 2017
3.2.3	Скополетин	*Scopolia carniolica* (скополия), *Cichorium intybus* (цикорий обыкновенный), *Solanum nigrum* (паслен черный), *Datura metel* (дурман индийский), *Trigonella foenum-graecum* (пажитник)	*C. violaceum*	I	+	–	Bais et al., 2001; Zhao et al., 2010; Deryabin, Tolmacheva, 2015; Han et al., 2015; Ouzir et al., 2016; Reen et al, 2018

Таблица 1. Окончание

№	Химическое соединение	Растение-продуцент	Тест-объект	Тип QS	Регистрируемые эффекты		Литература
					ингибирование QS-регулируемых признаков*	подавление образования биопленок	
3.3.1	Бергамотин	*Citrus bergamia*, *Citrus maxima* и *Citrus paradisi* (цитрусовые)	*P. aeruginosa*	I	+	+	Girennavar et al., 2008; Reen et al., 2018
			V. harvey, *S. typhimurium* и *E. coli*	II			
4. Флавоноиды							
4.1.1	Кверцетин	*Psidium guajava* (гуайява)	*C. violaceum* и *P. aeruginosa* *V. harveyi* BB886	I	+	+	Vikram et al., 2010; Vasavi et al., 2014; Ouyang et al., 2016
			V. harveyi MM32, BB120, *E. coli* O157:H7	II			
4.1.2	Кемпферол	*Centella asiatica* (центелла азиатская)	*C. violaceum* и *P. aeruginosa* *V. harveyi* BB886	I	+	+	Vikram et al., 2010; Vasavi et al., 2016
			V. harveyi MM32, BB120, *E. coli* O157:H7	II			
4.2.1	Нарингенин	*Combretum albiflorum*	*P. aeruginosa* *V. harveyi* BB886	I	+	+	Vikram et al., 2010; Vandeputte et al., 2011
			V. harveyi MM32, *BB120*, *E. coli* O157:H7	II			
4.2.2	Нарингин	*Citrus sinensis* (апельсин), *Citrus maxima* (помело)	*C. violaceum* и *Y. enterocolitica*	I	+	+	Truchado et al., 2012; Zunying et al., 2017
			V. anguillarum	II			
5. Сераорганические соединения							
5.1.1	Аллицин	*Allium sativum* (чеснок)	*P. aeruginosa*	I	+	+	Pérez-Giraldo et al., 2003; Lin et al., 2013
			S. epidermidis	IV			
5.1.2	Аджоен	*Allium sativum* (чеснок)	*P. aeruginosa* lasB-gfp, *P. aeruginosa* rhlA-gfp и *E. coli* luxI-gfp	I	+	+	Jakobsen et al., 2012
5.2.1	Иберин	*Armoracia rusticana* (хрен)	*P. aeruginosa*	I	+	+	Jakobsen et al., 2012
5.2.2	Эруцин	*Brassica oleracea* (брокколи)	*E. coli* DH5-lacZ и *P. aeruginosa*	I	+	+	Ganin et al., 2013
5.2.3	Сульфорафан	*Brassica oleracea* (брокколи)			+	+	Ganin et al., 2013

* Факторы вирулентности, пигментообразование, биолюминесценция. ** Нет данных.

лялось в ингибировании биосинтеза автоиндуктора, нарушении подвижности и подавлении образования биопленки (Li et al., 2019).

Разнообразие терпеновых соединений, а также их биологические эффекты на системы “кворум сенсинга” и биопленкоообразование патогенных бактерий представлены в недавнем обзоре Camele и соавт. (Camele et al., 2019). При этом отмечается синергизм между отдельными компонентами эфирных масел, что показано для композиций “лимонен; пинен; линалоол” и “γ-терпинен; цимол; карвакрол”.

В свою очередь наиболее общим механизмом активности терпеновых соединений, показанном *in silico* при моделировании молекулярного докинга карвона с функциональными беками *H. alvei*, в настоящее время считается подавление активности LuxI-подобных синтаз (на примере HalI), а также взаимодействие с LuxR-подобными белками (на примере HalR), дополнительно нарушающее рецепцию АГЛ (Li et al., 2019), что хорошо объясняет ингибирующий эффект в отношении QS 1-го типа, но не позволяет распространить его на иные варианты систем плотностно-зависимой коммуникации.

Фенолы. Фенолы – это обширная группа органических соединений, в молекулах которых гидроксильные (OH–) группы ковалентно присоединены к одному или нескольким атомам углерода ароматического кольца. При этом в зависимости от числа OH-групп данные соединения классифицируются на одноатомные (аренолы), двухатомные (арендиолы) и трехатомные фенолы (арентриолы). Примером первой группы являются изомерные друг другу карвакрол (2.1.1) и тимол (2.1.2) общей формулы $C_6H_3CH_3(OH)(C_3H_7)$, относимые к классу монотерпенидов фенола, и вместе с другими терпеновыми соединениями (см. выше) присутствующие в составе ряда растительных эфирных масел. Двухатомные фенолы, в зависимости от взаимного (*орто*-, *пара*- или *мета*-) расположения гидроксильных групп, делятся на пирокатехины, гидрохиноны и резорцины, примером последних из которых является 4-*H*-пропилрезорцин (2.2.1). В свою очередь наиболее известным трехатомным фенолом является пирогаллол (2.3.1) и его производное галловая (3,4,5-триоксибензойная) кислота (2.3.2). К фенольным соединениям (метоксифенолам) относятся и такие растительные соединения как ванилин (2.4.1), эвгенол (2.4.2) и конифериловый спирт (2.4.3), общими элементами структуры которых является наличие эфирной и фенольной функциональных групп.

Кворум-ингибирующая активнось карвакрола впервые была показана в отношении *C. violaceum* с системой плотностно-зависимой коммуникации 1-го типа, в то время как подавление биопленкообразования было продемонстрировано в отношении более широкого круга модельных микроорганизмов, помимо *C. violaceum* включающего *Salmonella enterica* (2-ой тип QS) и *S. aureus* (4-ый тип QS) (Burt et al., 2014). В дальнейшем анти-QS активность карвакрола была распространена и на *P. aeruginosa*, что заключалось в сочетанном подавлении кворум-зависимого биопленкообразования, подвижности и биосинтеза пиоцианина (Tapia-Rodriguez et al., 2019). Аналогичные эффекты демонстрировал и изомерный карвакролу тимол, а также богатые данным одноатомным фенолом масла ажгона (*Carum copticum*) (Snoussi et al., 2018) и тимьяна (*Thymus vulgare*) (Myszka et al., 2016), что в первом случае регистрировалось как подавление кворум-зависимого биосинтеза виолацеина у *C. violaceum*, а во втором – как нарушение биопленкообразования у *Pseudomonas fluorescens.* Двухатомный фенол 4-*H*-пропилрезорцин первично был идентифицирован в качестве одного из кворум-ингибирующих компонентов коры дуба (*Quercus cortex*) (Deryabin, Tolmacheva, 2015) и в дальнейшем, совместно с другими представителями группы арендиолов, детально охарактеризован в тестах подавления кворум-зависимого биосинтеза виолацеина и биопленкообразования у *C. violaceum* (Дерябин и соавт., 2014). Активность микромолярных концентраций трехатомного фенола пирогаллола последовательно была показана в отношении *V. harveyi* с системой QS 2-го типа (Ni et al., 2008), а в цитируемом выше исследовании (Deryabin, Tolmacheva, 2015) и в отношении *C. violaceum* с системой “кворум сенсинга” 1-го типа. В свою очередь сравнительный анализ названных и некоторых других фенольных соединений в качестве наиболее эффективного ингибитора систем плотностно-зависимой коммуникации *C. violaceum* и *P. aeruginosa* позволил назвать другой трехатомный фенол – галловую кислоту, а также метилгалат (Hossain et al., 2017) и ее алкилированные производные (Kim et al., 2019).

Среди представителей метоксифенолов хорошо документированной является анти-QS активность ванилина, впервые обнаруженная при оценке эффектов экстракта семян ванили плосколистной (*Vanilla planifolia*) на кворум-зависимые проявления у *C. violaceum* (Choo et al., 2006). В дальнейшем активность собственно ванилина была подтверждена в отношении еще одной бактерии с системой “кворум сенсинга” 1-го типа – *Aeromonas hydrophila*, что включало выраженное подавление ее биопленкообразования (Ponnusamy et al., 2009). Аналогичная активность эвгенола первоначально также была показана на примере цельного растительного экстракта – спиртовой вытяжки зиры (*Cuminum cyminum*) (Sybiya et al., 2012). При этом химически чистый эвгенол в форме наноэмульсии эффективно ингибировал кворум-зависимый биосинтез виолацеина у *C. violaceum*, образование пиоцианина и подвижность у *P. aerugino-*

sa (Lou et al., 2019), а также эффективно уменьшал биомассу биопленок у антибиотикорезистентных штаммов *S. aureus* (Al-Shabib et al., 2017). В свою очередь анти-QS активность кониферилового спирта, являющегося важным интермедиатом на биосинтетических путях образования эвгенола (см. выше), кумарина (см. ниже) и других продуктов растительного происхождения, показана при исследовании воздействия экстрактов коры дуба и отдельных присутствующих в его составе малых молекул на систему "кворум сенсинга" 1-го типа у *C. violaceum* (Deryabin, Tolmacheva, 2015).

Среди представителей рассматриваемой группы соединений наиболее детально охарактеризованным является механизм действия эвгенола, оцененный по результатам транскриптомного анализа *Klebsiella pneumoniae* с системой плотностно-зависимой коммуникации 2-го типа (Wang et al., 2019). Действие данного соединения было охарактеризовано как плейотропное, затрагивающее в общей сложности 5779 дифференциально экспрессируемых генов, связанных с множеством биосинтетических путей и биологических функций. При этом его анти-QS активность могла быть объяснена нарушением транскрипции ряда генов (*luxS*, *pfs* и *lsrK*), вовлеченных в синтез АИ-2, что подтверждается экспериментальными данными о подавлении образования названного автоиндуктора в присутствии эвгенола.

Кумарины. Кумарины – это класс природных соединений, в основе которых лежит 5,6-бензо-α-пирон (лактон *цис-орто*-оксикоричной кислоты). При этом в зависимости от особенностей строения их ядра и наличия заместителей данные соединения могут быть классифицированы на простые кумарины (кумарин, 3.1.1; дигидрокумарин, 3.1.2); окси-, метокси- и метилендиоксикумарины с различными замещениями в бензольном или пироновом кольцах (например, умбиллиферон, 3.2.1; 3-гидроксикумарин, 3.2.2 и скополетин, 3.2.3); франокумарины, содержащие дополнительное конденсированное фурановое ядро (бергамотин, 3.3.1), а также иные структурно более сложные соединения, представляющие собой результаты конденсации кумарина с пирановым, бензольным и бензофурановым кольцами. При этом большинство растительных соединений этого класса обнаруживаются в свободном состоянии, и лишь незначительное число – в виде гликозидов с D-глюкозой, присоединенной к C6, C7 или C8 атомам кумаринового ядра.

Экспериментальные наблюдения об анти-QS активности кумарина преимущественно связаны с его воздействием на ряд грамотрицательных бактерий, использующих систему плотностно-зависимой коммуникации 1-го типа: *P. aeruginosa* (подавление образования биопленки, биосинтеза феназина, подвижности); *A. fischeri* (ингибирование биолюминесценции) и др. (Gutiérrez-Barranquero et al., 2015). Другой простой кумарин – дигидрокумарин демонстрировал сходную активность: эффективно ингибировал кворум-зависимый биосинтез виолацеина у *C. violaceum* и биопленкообразование у *H. alvei* (Hou et al., 2017). При исследовании воздействия восьми представителей рассматриваемого класса соединений на образование биопленки у *E. coli* O157:H7 со 2-ым типом QS искомый эффект был подтвержден для кумарина и впервые показан для его производного – умбиллиферона (7-гидроксикумарина) (Lee et al., 2014). Дальнейший сравнительный анализ семи гидроксипроизводных кумарина в отношении кворум-зависимого биосинтеза виолацеина у *C. violaceum* и биопленкообразования у *P. aeruginosa* позволил частично разделить эти эффекты: первые из них были характерны для 3-гидроксикумарина, а вторые показаны при использовании 6-, 7- и 6,7-дигидроксикумарина (D'Almeida et al., 2017). Возможность выделения двух функциональных групп кумаринов, преимущественно нарушающих образование бактериальных биопленок и, наряду с этим, ингибирующих проявления QS, подтверждена и в работе Reen et al. (2018). Так первый вариант биоактивности был характерен для 7-гидрокси-5-метоксикумарина (скополетина), а второй – для более обширной группы соединений, в том числе включающей фуранокумарины: бергамотин и 6,7-дигидробергамотин. При этом два последних соединения, стабильно обнаруживаемые в плодах цитрусовых (*Citrus bergamia*, *C. maxima* и *C. paradisi*), развивали свою активность в отношении бактерий, использующих как I, так и II тип плотностно-зависимой коммуникации (Girennavar et al., 2008).

Объяснением подобного эффекта, неспецифичного по отношению к бактериальному виду, и используемой им системе плотностно-зависимой коммуникации, явился особенный механизм биоактивности кумаринов, заключающийся в подавлении метаболизма циклического дигуанозинмонофосфата (c-di-GMP) (Zhang et al., 2018).

Поскольку c-di-GMP в настоящее время оценивается как внутриклеточный вторичный мессенджер, дефицит которого в клетках *P. aeruginosa* активирует 535 и репрессирует 432 гена, включая гены трех регуляторных систем (*las*, *rhl* и *PQS*), результатом действия кумаринов закономерно становятся системное ингибирование факторов вирулентности и подавление образования биопленок, как названным модельным микроорганизмом, так и множеством других бактериальных видов, также осуществляющих внутриклеточную регуляцию с участием c-di-GMP.

Флавоноиды. Флавоноиды – еще одна обширная группа растительных соединений, в зависимости от особенностей химического строения (количества и расположения различных замести-

телей вокруг в т.н. “базового скелета” C6–C3–C6 из 15 атомов углерода), разделяемая на шесть классов: флавонолы, флавоны, изофлавоны, флаваноны, халконы и антоцианины (Panche et al., 2016). При этом наиболее хорошо документированные доказательства наличия кворум-ингибирующей активности к настоящему времени получены в отношении флавонолов: кверцетина (4.1.1) и кемпферола (4.1.2), а также флаванонов: нарингенина (4.2.1) и его гликозидированного производного – нарингина (4.2.2).

В работе Vasavi et al. (2014) в биотестах на *C. violaceum* ATCC 12472 и *P. aeruginosa* PAO1 впервые описана кворум-ингибирующая активность богатого флавоноидами экстракта листьев гуайявы (*Psidium guajava*) из семейства миртовых. Исследование природы подобной активности позволило связать ее с присутствием в исследуемых экстрактах флавонола кверцетина и его производного кверцетин-3-O-арабинозида, первоначально идентифицированных при проведении жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией, а в дальнейшем подтвердивших наличие искомой активности в виде химически чистых соединений. Дальнейшее тестирование кверцетина в отношении *P. aeruginosa* PAO1 показало его способность к ингибированию продукции пиоцианина, протеазы и эластазы, а также образованию биопленок, причиной чего было названо подавление транскрипции регуляторных генов “кворум сенсинга” *lasI*, *lasR*, *rhlI* и *rhlR* (на 34, 68, 57 и 50% соответственно) (Ouyang et al., 2016). В настоящее время представления о механизмах биоактивности кверцетина дополнены и его способностью к аллостерической ингибиции LuxR-подобных рецепторов LasR и RhlR (Paczkowski et al., 2017), следствием чего является нарушение связывания названных белков с ДНК в области кворум-регулируемых промоторов, а итоговым результатом – подавление транскрипции соответствующих генов.

При исследовании богатого флавоноидами этанольного экстракта многолетнего цветкового растения *Centella asiatica* из семейства зонтичных совокупность его кворум-ингибирующих эффектов продемонстрирована как при проведении тестирования на *C. violaceum* ATCC12472 (подавление биосинтеза виолацеина), так и в отношении *P. aeruginosa* PAO1 (подавление продукции пиоцианина, эластолитической и протеолитической активностей, подвижности и образования биопленок). В свою очередь проведение тонкослойной хроматографии позволило выделить из тестируемого экстракта наиболее активное соединение, каковым оказался флавонол кемпферол (Vasavi et al., 2016).

В коре тропического растения *Combretum albiflorum* из порядка миртоцветных были идентифицированы несколько флавонов, флавононов, флавонолов и халконов, в дальнейшем тестированных на способность подавлять кворум-регулируемые проявления у *P. aeruginosa* PAO1 (Vandeputte et al., 2011). При этом наибольшую активность демонстрировали флаваноны (нарингенин, эриодиктиол и таксифолин), существенно снижающие продукцию пиоцианина и образование эластазы без существенного воздействия на интенсивность бактериального роста. Кроме того, нарингенин и таксифолин ингибировали экспрессию ряда генов, формирующих многокомпонентную систему плотностно-зависимой коммуникациии у *P. aeruginosa* PAO1 (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *lasA*, *lasB* и др.), а наиболее биоактивный нарингенин выраженно блокировал образование опосредующих ее автоиндукторов: C4-АГЛ и 3-оксо-C12-АГЛ (продуктов генов *lasI* и *rhll* соответственно), а также нарушал взаимодействие первого из них с рецепторным белком RlhR.

Согласующийся результат получен в работе Truchado et al. (2012), где продемонстрировано наличие кворум-ингибирующей активности в экстракте апельсина, в значительных количествах содержащем O-гликозилированные флаваноны (нарингин, неогесперидин и гесперидин). Спектр обнаруженных эффектов, помимо воздействия на систему “кворум сенисинга” *C. violaceum*, включал подавление биосинтеза АГЛ и формирование биопленки у *Yersinia enterocolitica*, что при использовании нарингина дополнялось угнетением его подвижности. При этом, как в присутствии цельного экстракта, так и при использовании нарингина, в клетках *Y. enterocolitica* детектировано выраженное изменение уровня транскрипции гена *yenR* (кодирует рецептор для АГЛ), а также генов *flhDC* и *fliA* (кодируют белки флагелл). Другое доказательство биоактивности нарингина получено в работе Zunying et al. (2017), исследующей экстракт кожуры *Citrus maxima* (помело), в которой названный гликозилированный флаванон является доминирующим компонентом (91.62% сухого остатка). При этом спектр регистрируемых эффектов включал как подавление АИ-1-регулируемого биосинтеза виолацеина у *C. violaceum* CV026, так и АИ-2-контролируемых биопленкообразования и подвижности у *Vibrio anguillarum*. В свою очередь механизм подобной активности был связан с ингибированием процесса взаимодействия автоиндуктора и соответствующего рецепторного белка (в частности, 3-оксо-C12-АГЛ и LasR у *P. aeruginosa*) (Hernando-Amado et al., 2020), что уподобляло его аналогичному механизму действия кверцетина (см. выше).

Первое систематизированное сравнительное исследование кворум-ингибирующей активности флавоноидов проведено в работе Vikram et al. (2010), где сопоставлено воздействие 10 соединений (флавонолов – кверцетина, кемпферола, рутина; флавонов – нариненина, нарингина, неоэриоцитрина, неогесперидина, гесперидина; а также поли-

метоксифлавона – синенсетина) в биотестах на *V. harvey* и *E. coli* O157:H7. Среди них наиболее эффективными антагонистами АИ-2-опосредованной межклеточной коммуникации и ингибиторами образования биопленок оказались нарингенин, кемпферол, кверцетин и апигенин. Другое известное сравнительное исследование проведено Skogman et al. (2016), которые осуществили скрининг библиотеки из 465 природных и химически синтезированных флавоноидов при параллельном тестировании на генетически связанной паре дикого (ATCC 31532) и мутантного (CV026) штаммов *C. violaceum*. По его результатам искомая активность, оцененная по способности вызывать 85% ингибирование кворум-регулируемого биосинтеза виолацеина в одном или обеих биотестах, показана у 70 соединений. В свою очередь среди них наивысшая активность зафиксирована у 5 химически синтезированных соединений из группы флавонов, обуславливающих развитие подобного эффекта в микромолярном диапазоне концентраций, что иллюстрирует возможность дальнейшей целенаправленной селекции флавоноидов с искомой активностью.

Сераорганические соединения. Среди обширного класса сераорганических молекул растительного происхождения, имеющих в структуре одну или несколько ковалентных связей “углерод–сера”, кворум-ингибирующая активность к настоящему моменту продемонстрирована у двух групп соединений: сульфоксидов (5.1) и тиоцианатов (5.2). При этом общим элементом структуры сульфоксидов общей формулы R1–SO–R2 является присутствие двух органических радикалов, связанных с атомом серы, а отличительным моментом тиоцианатов является присутствие терминально расположенной функциональной группы N=C=S.

Известным сульфоксидом с доказанной кворум-ингибирующей активностью является аллицин (S-проп-2-ен-1-ил проп-2-ен-1-сульфинотиолат, образующийся из предшественника аллиина при повреждении клеток луковицы чеснока (*Allium sativum*)) (5.1.1) в результате каскада ферментативных реакций (см. ниже). При этом спектр биоактивности данного сераорганического соединения распространяется на грамотрицательные (*P. aeruginosa*) и грамположительные (*S. epidermidis*) микроорганизмы и включает как подавление экспрессии образуемых ими кворум-регулируемых факторов вирулентности, так и образование биопленок (Pérez-Giraldo et al., 2003; Lin et al., 2013). В частности, использование аллицина в концентрации 128 мкг/мл приводило к 50% уменьшению толщины биопленки и 70% снижению продукции экзополисахарида GFP-трансформированной культурой *P. aeruginosa* PAO1 (Lin et al., 2013), а аналогичный эффект, заключающийся в подавлении образования биопленки культурой *S. epidermidis*, формировался уже при концентрации 4 мкг/мл (Pérez-Giraldo et al., 2003).

Хорошо корреспондирующие с этим наблюдения сделаны в отношении аджоена ((E)-1-(проп-2-енилдисульфанил)-3-проп-2-енилсульфинилпроп-1-ена) (5.1.2), образующегося в процессе дальнейшей трансформации аллицина и содержащего как сульфоксидную, так и дисульфидную группы. Тестирование аджоена на репортерных штаммах *P. aeruginosa* lasB-gfp, *P. aeruginosa* rhlA-gfp и *E. coli* luxI-gfp, оценивающих эффекты в отношении отдельных систем плотностно-зависимой коммуникации 1-го типа, показало их 50% подавление в диапазоне концентраций от 15 до 100 мкМ (Jakobsen et al., 2012). В том же исследовании аджоен в дозе 80 мкг/мл выраженно ингибировал экспрессию факторов вирулентности *P. aeruginosa* (эластаза, энтеротоксины), а также не менее чем в пять раз снижал продукцию рамнолипидов. В свою очередь поиск путей повышения искомой активности, проведенный на примере библиотеки из 25 синтетических аналогов аджоена, позволил идентифицировать два наиболее активных соединения с заменой аллильного радикала на бензотиазольную группу, развивающих 50%-ное ингибирование кворум-регулируемых факторов вирулентности *P. aeruginosa* (элестаза, рамнолипид, пиоцианин) уже при концентрации 0.56 мкМ (Fong et al., 2017).

В работе Jakobsen et al. (2012) сравнительный анализ ряда растительных экстрактов показал наиболее выраженную кворум-ингибирующую активность в экстракте хрена (*Armoracia rusticana*), а хроматографическое разделение последнего с последующим использованием масс-спектрометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса позволило связать регистрируемую биоактивность с присутствием еще одного сероорганического соединения – изотиоцианата иберина (5.2.1). При этом дальнейший анализ с использованием технологий ОТ-ПЦР и ДНК-микрочипов подтвердил собственный эффект иберина, заключающийся в блокаде экспрессии широкого спектра кворум-индуцируемых генов у *P. aeruginosa*.

Исследование природы кворум-ингибирующей активности экстракта брокколи (*Brassica oleracea*) связало ее с присутствием еще двух изотиоцианатов: эруцина (5.2.2) и его производного – сульфорафана (5.2.3) (Ganin et al., 2013). При этом более активный сульфорафан в концентрации 100 мкМ обусловливал полное подавление 3-оксо-C12-АГЛ индуцируемого LasR-контролируемого QS у репортерного штамма *E. coli* DH5-lacZ, а использование данного соединения в концентрациях 37 и 100 мкМ позволило достичь 60% ингибирования образования биопленки и 70% ингибирования биосинтеза пиоцианина у *P. aeruginosa* PAO1.

Углубленный анализ механизма биоактивности сераорганических соединений с использова-

нием протеомного и транскриптомного анализа позволил связать его с воздействием на систему малых некодирующих РНК, реализующих свою регуляторную функцию в процессе РНК-интерференции. При этом эффект иберина заключался в нарушении функционирования внутриклеточной регуляторной сети Gac/Rsm (Tan et al., 2014), а аналогичный эффект аджоена проявлялся в нарушении экспрессии GacA-зависимых малых регуляторных РНК RsmY и RsmZ (Jakobsen et al., 2017), что приводило к ингибированию QS-зависимых проявлений безотносительно типа системы плотностно-зависимой коммуникации и природы автоиндуктора.

КЛАССИФИКАЦИОННОЕ ПОЛОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ ИНГИБИТОРОВ ПЛОТНОСТНО-ЗАВИСИМОЙ КОММУНИКАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Присутствие определенных химических соединений в растительных тканях определяется наличием соответствующих метаболических путей, в которых малые молекулы – ингибиторы QS являются значимыми интермедиатами или конечными продуктами биосинтеза. В свою очередь эволюционная обусловленность подобных метаболических путей указывает на возможную приуроченность анализируемых соединений к отдельным растительным кладам, учитываемым в системе классификации APG IV (2016) и отражающих процесс их филогении.

Так присутствие терпенов обеспечивается активностью двух метаболических путей: MVA и MEP, ведущих к образованию сходных “изопреновых звеньев”, в дальнейшем используемых в качестве прекурсоров для биосинтеза широкого круга молекул различного функционального назначения. При этом для большинства растений характерным является мевалонатный путь, названный так по основному интермедиату (англ. – mevalonic acid pathway; MVA) и стартующий от ацетил-KoA (Miziorko, 2011). Альтернативный путь синтеза изопреноидов – MEP (от англ. – methylerythritol phosphate pathway) начинается с пирувата и завершается образованием изопентенилпирофосфата (IPP) и диметилаллилпирофосфата (DMAPP), являющимися универсальными предшественниками изопрена, моно- и дитерпенов, каротиноидов и хлорофиллов (Banerjee, Sharkey, 2014). В свою очередь в геномах как минимум 17 растительных таксонов обнаруживается ген терпеноид-синтазы, с участием цитохрома P450 осуществляющей дальнейшую каталитическую модификацию основной структуры терпенов до терпеноидов (Boutanaev et al., 2014). Разнообразие возникающих в результате этих процессов соединений насчитывает от двадцати до тридцати тысяч малых молекул, типичных для многих хвойных растений, а у представителей клада core eudicots (настоящие двудольные) стабильно присутствующих в порядках *Myrtales* и *Apiales* (рис. 4).

Фенольные соединения синтезируются несколькими способами, среди которых у высших растений основным является шикиматный путь, названный так по основному интермедиату – шикимовой кислоте и дающий начало пути биосинтеза фенольных кислот (например, галловой кислоты), а также фенилпропаноидному пути, ведущему к образованию широкого спектра фенольных соединений (например, ванилина) (Babenko et al., 2019). В то же время в образовании ряда фенольных соединений, например, тимола и корвакрола, вовлекаются метаболические пути синтеза монотерпенов (Majdi et al., 2017), а биосинтез эвгенола и кониферилового спирта происходит на основе многоступенчатых превращений аминокислоты тирозина (Harakava, 2005). Указанные обстоятельства определяют широту распространения фенолов, оцениваемых как третья по численности группа вторичных растительных метаболитов (около девяти тысяч соединений) (Crozier et al., 2008), присутствующих как среди представителей кладов core monocots (настоящие однодольные), так и core eudicots – в порядках *Fagales*, *Apiales* и *Lamiales* (в последнем случае совместно с близкими по путям биосинтеза терпенами) (рис. 4).

Соединения группы кумаринов также являются достаточно распространенной группой малых молекул растительного происхождения, обнаруживаемых среди многочисленных представителей core eudicots, в том числе у большинства цветковых растений, принадлежащих к порядкам *Fabales*, *Sapindales*, *Asterales*, *Apiales*, *Lamiales* и *Solonales*. При этом широта представительства кумаринов определяется универсальностью путей их биосинтеза, начинающихся от ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина) и идущих через ряд фенолокислот (коричную, кумаровую, кофейную, феруловую) с вовлечением реакций гидроксилирования, гликолиза и циклизации (Sarker, Nahar, 2017). Образующиеся в результате этого простые кумарины и их производные преимущественно обнаруживаются в корнях, коре и плодах (в меньшей степени в стеблях и листьях), где одной из их важных функций является защита от фитопатогенов, что традиционно связывается с прямой антимикробной активностью кумаринов (Ververidis et al., 2007), а в настоящее время органично дополняется доказанной кворум-ингибирующей активностью и способностью к подавлению образования бактериальных биопленок.

В свою очередь широта распространения флавоноидов определяется высокой представленностью т.н. “фенилпропаноидного” биосинтетического пути, в том числе обеспечивающего

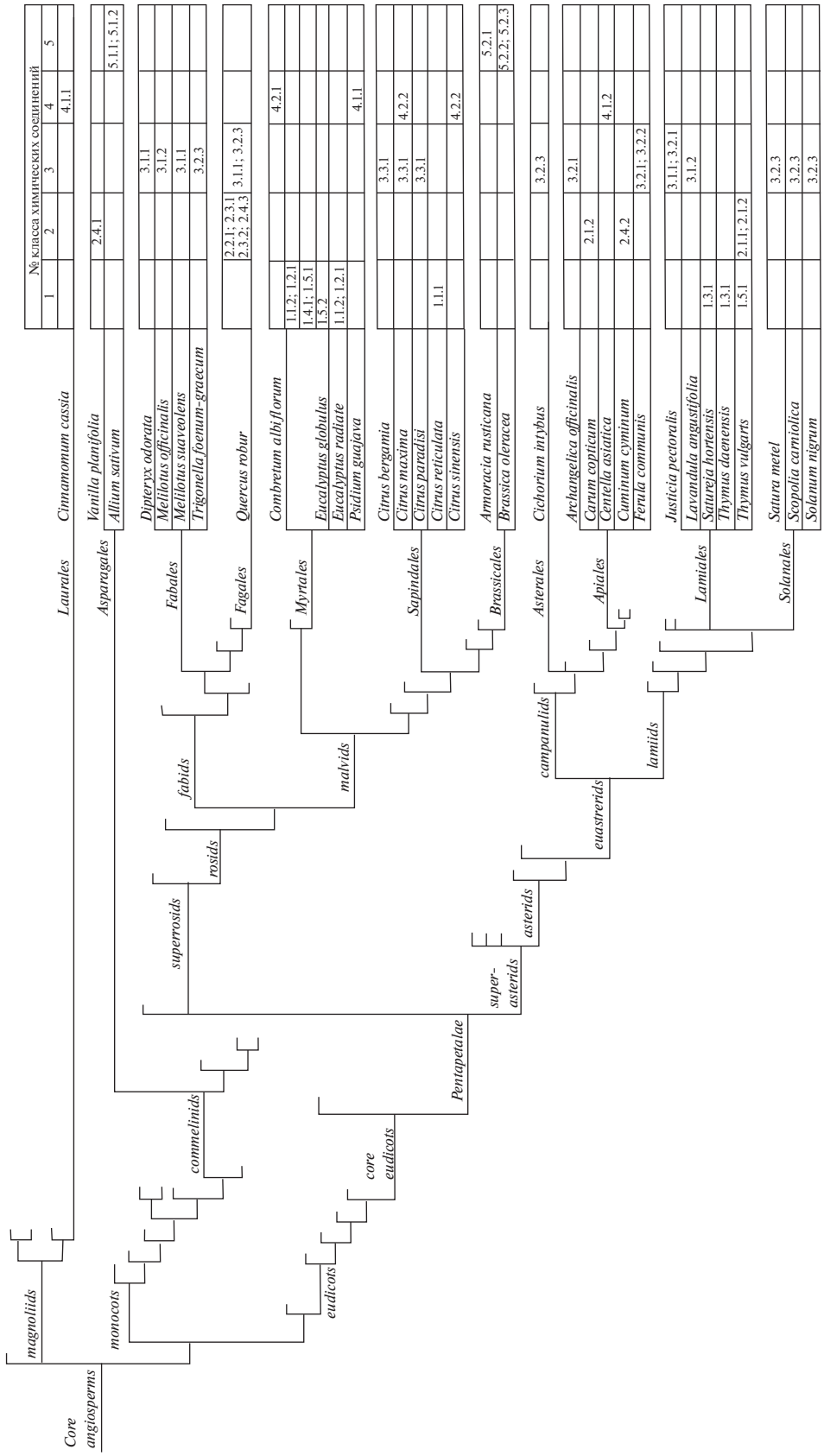


Рис. 4. Кладограмма, отображающая классификационное (филогенетическое) положение растений – продуцентов ингибиторов плотностно-зависимой коммуникации у бактерий (слева) и идентифицированные в их составе химические соединения с подобной активностью (справа).

образование многих растительных полифенолов (см. выше). Названный метаболический путь начинается с использования аминокислоты фенилаланина для образования 4-кумароил-КоА, комбинирование которого с малонил-КоА ведет к образованию халконов, а конъюгированное замыкание последних как раз и приводит к типичной трехкольцевой структуре флавона (Mathesius et al., 2003). В дальнейшем этот путь может быть продолжен через серию ферментативных модификаций с образованием флаванонов → дигидрофлавонолов → → антоцианов. При этом присутствие флавонолов может быть обнаружено у классификационно и филогенетически достаточно удаленных представителей порядков *Laurales*, *Myrtales* и *Apiales*, а флавононы присутствуют в порядке *Myrtales* и особенно широко распространены среди цитрусовых из порядка *Sapindales.* В рассматриваемом контексте особенно интересно, что образование флавоноидов может стимулироваться при контакте растений-продуцентов с АГЛ, опосредующими системы плотностно-зависимой коммуникации у бактерий (Cowan, 1999). Так обработка корней люцерны усеченной (*Medicago truncatula*) автоиндукторами 3-оксо-С12-АГЛ и 3-оксо-С16-АГЛ приводила к значительным изменениям в уровне экспрессии 154 белков, связанных с окислительным стрессом, метаболизмом фитогормонов и биосинтезом флавоноидов, что подтверждает мнение о роли последних в антибактериальном фитоиммунитете (Delves-Broughton, 2012).

Финальная рассматриваемая группа – сераорганические соединения – к настоящему моменту обнаруживается как у однодольных, так и двудольных растений. При этом среди представителей core monocots присутствие сульфоксидов показано для представителей порядка *Asparagales*, род *Allium*, где они возникают в результате серий ферментативных реакций, индуцируемых при повреждении растительных клеток (последнее косвенно подтверждает специализированную защитную функцию данной группы соединений) (Vincente, 2014). В частности, при повреждении клеток чеснока неактивный предшественник аллинин (S-2-пропенилцистеин) гидролизуется ферментом аллииназой до нестабильного тиосульфината аллицина (2-пропенил-2-пропентиолсульфината), в результате дальнейшей реарранжировки превращающегося в наиболее активный ингибитор “кворум сенсинга” – аджоен. При этом для обсуждаемой группы малых молекул также характерными являются прямые антибактериальные и антиоксидантные эффекты (Burow et al., 2007). В свою очередь внутри core eudicots обнаруживается другая группа сераорганических соединений – изотиоционатов, характерных для представителей порядка *Brassicales* (капуста, хрен). Как и для обсуждаемой выше группы сераорганических соединений, их образование также происходит по механизму ферментативного гидролиза с участием ферментов мирозиназ, в присутствии воды отщепляющих глюкозную группу от предшественников – глюкозинолатов с быстрым превращением продукта реакции в биологически активные тиоционат или изотиоцианат с широким спектром анти-QS активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плотностно-зависимая коммуникация у бактерий, часто обозначаемая термином “quorum sensing” и контролирующая их переход к вирулентному фенотипу с образованием биопленок, является одной из привлекательных мишеней для разработки нового поколения антибактериальных препаратов.

Перспективным источником для выделения и получения ингибиторов QS являются растительные субстраты, в том числе используемые традиционной (народной) медициной для терапии бактериальных инфекций. При этом проведенные скрининнговые исследования демонстрируют типичность обнаружения подобной активности у широкого круга растений различного классификационного положения, что характеризует анти-QS активность как новый механизм их защиты от бактериальных патогенов, дополняющей ранее известные механизмы врожденного фитоиммунитета.

Идентификация растительных соединений, являющихся носителями анти-QS активности, демонстрирует существенное разнообразие их структур, относящихся к терпенам и терпеноидам, фенолам и метоксифенолам, кумаринам, флавоноидам, сульфоксидам и изотиоцианатам. В свою очередь наиболее вероятной причиной подобного разнообразия является вариативность путей биосинтеза названных вторичных метаболитов у растений различного классификационного происхождения. С этой точки зрения растительные соединения с анти-QS активностью могут рассматриваться как продукты естественной эволюции растений, важным элементом которой является их коэволюция с агрессивным бактериальным окружением.

Отражением разнообразия химических структур идентифицированных соединений является и многообразие реализуемых ими механизмов подавления плотностно-зависимой коммуникации, включающих не только воздействие на синтазы автоиндукторов или воспринимающие их рецепторные белки (терпеноиды, флавоноиды), но и достаточно часто – на внутриклеточные регуляторные пути, контролирующие “глобальные” изменения профилей генной экспрессии (кумарины, сераорганические соединения). В результате для растительных соединений характерен эффект, неспецифичный в отношении определенного вида микроорганизмов, типа QS и опосредующего его АИ, что должно обеспечивать

растению-продуценту защиту от максимально широкого спектра бактериальных патогенов.

Обнаружение способности к подавлению плотностно-зависимой коммуникации у бактерий с использованием растительных субстратов и входящих в их состав химических соединений создает возможность их использования для замещения кормовых антибиотиков в системах кормления сельскохозяйственных животных, а при успехе этой стратегии формирует перспективу для тестирования наиболее эффективных молекул и их композиций в качестве кандидатных фармацевтических препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены в соответствии с планом НИР на 2019–2021 гг. ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН в рамках тематического плана по госзаданию № 0526-2019-0002.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дерябин Д.Г., Камаева А.А., Толмачева А.А., Эль-Регистан Г.И. Влияние алкилоксибензолов на индуцируемые гомосеринлактонами проявления кворум сенсинга у бактерий // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 391–397.

Deryabin D.G., Kamayeva A.A., Tolmacheva A.A., El-Registan G.I. The effects of alkylhydroxybenzenes on homoserine lactone-induced manifestations of quorum sensing in bacteria // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. P. 353–358.

Adil M., Baig M.H., Rupasinghe H.P.V. Impact of citral and phloretin, alone and in combination, on major virulence traits of *Streptococcus pyogenes* // Molecules. 2019. V. 24. Art. 4237.

Adonizio A., Dawlaty J., Ausubel F., Clardy J., Mathee K. Ellagitannins from *Conocarpus erectus* exhibit anti-quorum sensing activity against *Pseudomonas aeruginosa* // Planta Medica. 2008. V. 74.
https://doi.org/10.1055/s-0028-1084373

Adonizio A.L., Downum K., Bennett B.C., Mathee K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida // J. Ethnopharmacol. 2006. V. 105. P. 427–435.

Al-Shabib N.A., Husain F.M., Ahmad I., Baig M.H. Eugenol inhibits quorum sensing and biofilm of toxigenic MRSA strains isolated from food handlers employed in Saudi Arabia // Biotechnol. Biotechnologic. Equipm. 2017. V. 31. P. 387–396.

Andersen J.B., Heydorn A., Hentzer M., Eberl L., Geisenberger O., Christensen B.B., Molin S., Givskov M. gfp-Based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 575–585.

Asfahl K.L., Schuster M. Additive effects of quorum sensing anti-activators on *Pseudomonas aeruginosa* virulence traits and transcriptome // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 2654.

Babenko L.M., Smirnov O.E., Romanenko K.O., Trunova O.K., Kosakivska I.V. Phenolic compounds in plants: biogenesis and functions // Ukr. Biochem. J. 2019. V. 91. № 3. P. 5–18.

Bais H.P., Ravishankar G.A. Cichorium intybus L. – cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects // J. Sci. Food Agric. 2001. V. 81. P. 467–484.

Banerjee A., Sharkey T.D. Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation // Nat. Prod. Rep. 2014. V. 31. P. 1043–1055.

Boutanaev A.M., Moses T., Zi J., Nelson D.R., Mugford S.T., Peters R.J., Osbourn A. Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. E81–E88.
https://doi.org/10.1073/pnas.1419547112

Burow M., Bergner A., Gershenzon J., Wittstock U. Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum* – identification of the thiocyanate-forming protein // Plant Mol. Biol. 2007. V. 63. P. 49–61.

Burt S.A., Ojo-Fakunle V.T., Woertman J., Veldhuizen E.J. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations // PLoS One. 2014. V. 9. e93414.

Byeon J.-Y., Sim J., Ryu E.-J., Sim J., Lee H., Cho K.-H., Choi B.-K., Lee J. In silico development of quorum-sensing inhibitors // Bull. Korean Chem. Soc. 2017. V. 38. P. 728–734.

Cáceres M., Hidalgo W., Stashenko E., Torres R., Ortiz C. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities against pathogenic bacteria // Antibiotics (Basel). 2020. V. 9. Art. 147.

Camele I., Elshafie H.S., Caputo L., De Feo V. Anti-quorum sensing and antimicrobial effect of mediterranean plant essential oils against phytopathogenic bacteria // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 2619.

Choo J.H., Rukayadi Y., Hwang J.K. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract // Lett. Appl. Microbiol. 2006. V. 42. P. 637–641.

Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents // Clin. Microbiol. Rev. 1999. V. 12. P. 564–582.

Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. Phenols, polyphenols and tannins // Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet / Eds. Crozier A., Clifford M., Ashihara H. Oxford, UK: Blackwell, 2008. P. 1–24.

Cruz C.D., Shah S., Tammela P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains // BMC Microbiol. 2018. V. 18. P. 173.

D'Almeida R.E., Molina R.D.I., Viola C.M., Luciardi M.C., Nieto Peñalver C., Bardón A., Arena M.E. Comparison of

seven structurally related coumarins on the inhibition of Quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum* // Bioorg. Chem. 2017. V. 73. P. 37–42.

Defoirdt T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy // Trends Microbiol. 2018. V. 26. P. 313–328.

Delves-Broughton J. Natural Antimicrobials as Additives and Ingredients for the Preservation of Foods and Beverages. Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings. CRC Press, 2012. 26 p.

Deryabin D.G., Tolmacheva A.A. Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (Oak bark) extract // Molecules. 2015. V. 20. P. 17093–17108.

Egland K.A., Greenberg E.P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the luxl promoter // Mol. Microbiol. 1999. V. 31. P. 1197–1204.

Elharas K., Daagare A., Mesfioui A., Ouhssine M. Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus nobilis* et *Lavandula angustifolia* // Afrique Sci. 2013. V. 9. P. 134–141.

Fong J., Yuan M., Jakobsen T.H., Mortensen K.T., DelosSantos M.M., Chua S.L., Yang L., Tan C.H., Nielsen T.E., Givskov M. Disulfide bond-containing ajoene analogues as novel quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 215–227.

Ganin H., Rayo J., Amara N., Levy N., Krief P., Meijler M. Sulforaphane and erucin, natural isothiocyanates from broccoli, inhibit, bacterial quorum sensing // Med. Chem. Commun. 2013. V. 4. P. 175–179.

Girennavar B., Cepeda M.L., Soni K.A., Vikram A., Jesudhasan P., Jayaprakasha G.K., Pillai S.D., Patil B.S. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria // Int. J. Food Microbiol. 2008. V. 125. P. 204–208.

Gutiérrez-Barranquero J.A., Reen F.J., McCarthy R.R., O'Gara F. Deciphering the role of coumarin as a novel quorum sensing inhibitor suppressing virulence phenotypes in bacterial pathogens // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 3303–3316.

Han X.L., Wang H., Zhang Z.H., Tan Y., Wang J.H. Study on chemical constituents in seeds of *Datura metel* from Xinjiang // J. Chin. Med. Mater. 2015. V. 38. P. 1646–1648.

Harakava R. Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus* // Genet. Mol. Biol. 2005. V. 28. P. 601–607.

Härmälä P., Vuorela H., Hiltunen R., Nyiredy Sz., Sticher O., Törnquist K., Kaltia S. Strategy for the isolation and identification of coumarins with calcium antagonistic properties from the roots of *Angelica archangelica* // Phytochem. Anal. 1992. V. 3. P. 42–48.

Hernando-Amado S., Alcalde-Rico M., Gil-Gil T., Valverde J.R., Martinez J.L. Naringenin inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing response is based on its time-dependent competition with N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone for LasR binding // Front. Mol. Biosci. 2020. V. 7. Art. 25.
https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00025

Hixon M., Johnson D. Density dependence and independence // Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2009. P. 1–6.
https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021219

Hossain M.A., Lee S., Park N.-H., Mechesso A.F., Birhanu B.T., Kang J., Reza M.A., Suh J.-W., Park S.-C. Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing regulatory pathways // Sci. Rep. 2017. V. 7. Art. 10618.

Hou H.M., Jiang F., Zhang G.L., Wang J.Y., Zhu Y.H., Liu X.Y. Inhibition of *Hafnia alvei* H4 biofilm formation by the food additive dihydrocoumarin // J. Food Prot. 2017. V. 12. P. 842–847.

Jakobsen T.H., Bragason S.K., Phipps R.K., Christensen L.D., Gennip M.V., Alhede M., Skindersoe M., Larsen T.O., Høiby N., Barnsholt T. Food as a source for quorum sensing inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 2410–2421.

Jakobsen T.H., vanGennip M., Phipps R.K., Shanmugham M.S., Christensen L.D., Alhede M., Skindersoe M.E., Rasmussen T.B., Friedrich K., Uthe F., Jensen P.Ø., Moser C., Nielsen K.F., Eberl L., Larsen T.O., Tanner D., Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. V. 56. P. 2314–2325.

Jakobsen T.H., Warming A.N., Vejborg R.M., Moscoso J.A., Stegger M., Lorenzen F., Rybtke M., Andersen J.B., Petersen R., Andersen P.S., Nielsen T.E., Tolker-Nielsen T., Filloux A., Ingmer H., Givskov M. A broad range quorum sensing inhibitor working through sRNA inhibition // Sci. Rep. 2017. V. 7. Art. 9857.

Kendall M.M., Rasko D.A., Sperandio V. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a luxS mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* // Infect. Immun. 2007. V. 75. P. 4875–4884.

Kim B., Park J.-S., Choi H.-Y., Kwak J.-H., Kim W.-G. Differential effects of alkyl gallates on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // Sci. Rep. 2019. V. 9. Art. 7741.

Kim C.S., Gatsios A., Cuesta S., Lam Y.C., Wei Z., Chen H., Russell R.M., Shine E.E., Wang R., Wyche T.P., Piizzi G., Flavell R.A., Palm N.W., Sperandio V., Crawford J.M. Characterization of autoinducer-3 structure and biosynthesis in *E. coli* // ACS Cent. Sci. 2020. V. 6. P. 197–206.

Koh C.L., Sam C.K., Yin W.F., Tan L.Y., Krishnan T., Chong Y.M., Chan K.G. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds // Sensors (Basel). 2013. V. 13. P. 6217–6228.

Koh K.H., Tham F.Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity // J. Microbiol. Immunol. Infect. 2011. V. 44. P. 144–148.

Kong C., Eng S.A., Lim M.P., Nathan S. Beyond traditional antimicrobials: a *Caenorhabditis elegans* model for discovery of novel antiinfectives // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 1956.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01956

Kovaleva A.M., Grud'Ko I.V., Aleksandrov, A.N., Komissarenko A.N. GC/MS study of the chloroform fraction of *Melilotus officinalis* // Chem. Nat. Compd. 2009. V. 45. P. 585–586.

Le K.Y., Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1174.

Lee J.H., Kim Y.G., Cho H.S., Ryu S.Y., Cho M.H., Lee J. Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of

Escherichia coli O157:H7 // Phytomedicine. 2014. V. 21. P. 1037–1042.

Li T., Mei Y., He B., Sun X., Li J. Reducing quorum sensing-mediated virulence factor expression and biofilm formation in *Hafnia alvei* by using the potential quorum sensing inhibitor L-carvone // Front. Microbiol. 2019. V. 9. Art. 3324. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03324

Li Y.H., Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms // Sensors (Basel). 2012. V. 12. P. 2519–2538.

Lin L., Wang J., Yu J., Li Y., Liu, G. Effects of alicinon the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the production of quorum-sensing controlled virulence factors // Pol. J. Microbiol. 2013. V. 62. P. 243–251.

Lino C.S., Taveira M.L., Viana G.S. B., Matos F.J.A. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq. and its main constituents: coumarin and umbelliferone // Phytother. Res. 1997. V. 11. P. 211–215.

Liua H., Wang Y., Cao J., Jiang H., Yao J., Gong G., Chen X., Xu W., He X. Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus* // Aquaculture. 2020. V. 515. Art. 734578.

Lou Z., Letsididi K.S., Yu F., Pei Z., Wang H., Letsididi R. Inhibitive effect of eugenol and its nanoemulsion on quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Food Prot. 2019. V. 82. P. 379–389.

Lu L., Li M., Yi G., Liao L., Cheng Q., Zhu J., Zhang B., Wang Y., Chen Y., Zeng M. Screening strategies for quorum sensing inhibitors in combating bacterial infection // J. Pharm. Anal. 2021. In press. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.03.009

Luciardi M.C., Blàzquez M.A., Cartagena E., Bardon A., Arena M.E. Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* // LWT Food Sci. Technol. 2016. V. 68. P. 373–380.

Luís A., Duarte A., Gominho J., Domingues F., Duarte A.P. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils // Ind. Crops Prod. 2016. V. 79. P. 274–282.

Majdi M., Malekzadeh-Mashhady A., Maroufi A., Crocoll C. Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors // Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 115. P. 152–162.

Mathesius U., Mulders S., Gao M., Teplitski M., Caetano-Anolles G., Rolfe B.G., Bauer W.D. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 1444–1449.

McClean K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Camara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft B.W., Stewart G.S., Williams P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // Microbiology (SGM). 1997. V. 143. P. 3703–3711.

Merghni A., Noumi E., Hadded O., Dridi N., Panwar H., Ceylan O., Mastouri M., Snoussi M. Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains // Microb. Pathog. 2018. V. 118. P. 74–80.

Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2001. V. 55. P. 165–199.

Miziorko H. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis // Arch. Biochem. Biophys. 2011. V. 505. P. 131–143.

Myszka K., Schmidt M.T., Majcher M., Juzwa W., Olkowicz M., Czaczyk K. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds // Int. Biodeter. Biodegr. 2016. V. 114. P. 252–259.

Ni N., Choudhary G., Li M., Wang B. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 1567–1572.

Ouyang J., Sun F., Feng W., Sun Y., Qiu X., Xiong L., Liu Y., Chen Y. Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Appl. Microbiol. 2016. V. 120. P. 966–974.

Ouzir M., El Bairi K., Amzazi S. Toxicological properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) // Food Chem. Toxicol. 2016. V. 96. P. 145–154.

Packiavathy I.A., Agilandeswari P., Musthafa K.S., Pandian S., Ravi A. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens // Food Res. Int. 2012. V. 45. P. 85–92.

Paczkowski J.E., Mukherjee S., McCready A.R., Cong J.-P., Aquino C.J., Kim H., Henke B.R., Smith C.D., Bassler B.L. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors // J. Biol. Chem. 2017. V. 292. P. 4064–4076.

Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. Flavonoids: an overview // J. Nutr. Sci. 2016. V. 5. e47.

Papenfort K., Bassler B.L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14. P. 576–588.

Pereira C.S., Thompson J.A, Xavier K.B. AI-2-mediated signalling in bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2013. V. 37. P. 156–181.

Pérez-Giraldo C., Cruz-Villalón G., Sánchez-Silos R., Martínez-Rubio R., Blanco M., Gómez-García A. In vitro activity of allicin against *Staphylococcus epidermidis* and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation // J. Appl. Microbiol. 2003. V. 95. P. 709–711.

Ponnusamy K., Paul D., Kweon J.H. Inhibition of quorum sensing mechanism and *Aeromonas hydrophila* biofilm formation by vanillin // Environ. Engin. Sci. 2009. V. 26. P. 1359–1363.

Reen F.J., Gutiérrez-Barranquero J.A., Parages M.L., O'Gara F. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 2063–2073.

Rutherford S.T., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012. V. 2. P. a012427.

Rzhepishevska O., Limanska N., Galkin M., Lacoma A., Lundquist M., Sokol D., Hakobyan S., Sjöstedt A., Prat C., Ramstedt M. Characterization of clinically relevant model bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* for anti-biofilm

testing of materials // Acta Biomater. 2018. V. 76. P. 99–107.

Sarker S.D., Nahar L. Progress in the chemistry of naturally occurring coumarins // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Eds. Kinghorn A., Falk H., Gibbons S., Kobayashi J. Springer, 2017. V. 106. P. 241–304.

Schreier P., Wörner M. Flüchtige inhaltsstoffe aus tonkabohnen (*Dipteryx odorata* Willd.) // Eur. Food Res. Technol. 1991. V. 193. P. 21–25.

Sharifi A., Mohammadzadeh A., Zahraei Salehi T., Mahmoodi P. Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Saturejahortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 124. P. 379–388.

Skogman M.E., Kanerva S., Manner S., Vuorela P.M., Fallarero A. Flavones as quorum sensing inhibitors identified by a newly optimized screening platform using *Chromobacterium violaceum* as reporter bacteria // Molecules. 2016. V. 21. P. 1211.

Snoussi M., Noumi E., Punchappady-Devasya R., Trabelsi N., Kanekar S., Nazzaro F., Fratianni F., Flamini G., De Feo V., Al-Sieni A. Antioxidant properties and anti-quorum sensing potential of *Carum copticum* essential oil and phenolics against *Chromobacterium violaceum* // J. Food Sci. Technol. 2018. V. 55. P. 2824–2832.

Swatton J.E., Davenport P.W., Maunders E.A., Griffin J.L., Lilley K.S., Welch M. Impact of azithromycin on the quorum sensing-controlled proteome of *Pseudomonas aeruginosa* // PLoS One. 2016. V. 11. e0147698.

Swift S., Downie J.A., Whitehead N.A., Barnard A.M., Salmond G.P., Williams P. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology // Adv. Microb. Physiol. 2001. V. 45. P. 199–270.

Tan S.Y., Liu Y., Chua S.L., Vejborg R.M., Jakobsen T.H., Chew S.C., Li Y., Nielsen T.E., Tolker-Nielsen T., Yang L., Givskov M. Comparative systems biology analysis to study the mode of action of the isothiocyanate compound Iberin on *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. 2014. V. 58. P. 6648–6659.

Tapia-Rodriguez M.R., Bernal-Mercado A.T., Gutierrez-Pacheco M.M., Vazquez-Armenta F.J., Hernandez-Mendoza A., Gonzalez-Aguilar G.A., Martinez M.A., Nazzaro F., Ayala-Zavala J. F. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to carvacrol: alterations of the Quorum sensing at enzymatic and gene levels // J. Cell Commun. Signal. 2019. V. 13. P. 531–537.

The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV // Botan. J. Linnean Soc. 2016. V. 181. P. 1–20.

Tolmacheva A.A., Rogozhin E.A., Deryabin D.G. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants // Acta Pharm. 2014. V. 64. P. 173–186.

Truchado P., Giménez-Bastida J.A., Larrosa M., Castro-Ibáñez I., Espín J.C., Tomás-Barberán F.A., García-Conesa M.T., Allende A. Inhibition of quorum sensing (QS) in *Yersinia enterocolitica* by an orange extract rich in glycosylated flavanones // J. Agric. Food Chem. 2012. V. 60. P. 8885–8894.

van derWorp H.B., Howells D.W., Sena E.S., Porritt M.J., Rewell S., O'Collins V., Macleod M.R. Can animal models of disease reliably inform human studies? // PLoS Med. 2010. V. 7. P. e1000245.

Vandeputte O.M., Kiendrebeogo M., Rasamiravaka T., Stévigny C., Duez P., Rajaonson S., Diallo B., Mol A., Baucher M., El Jaziri M. The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Microbiology (SGM). 2011. V. 157. P. 2120–2132.

Vasavi H.S., Arun A.B., Rekha P.D. Anti-quorum sensing activity of *Psidium guajava L.* flavonoids against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Microbiol. Immunol. 2014. V. 58. P. 286–293.

Vasavi H.S., Arun A.B., Rekha P.D. Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J. Microbiol. Immunol. Infect. 2016. V. 49. P. 8–15.

Ververidis F., Trantas E., Douglas C., Vollmer G., Kretzschmar G., Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health // Biotechnol. J. 2007. V. 2. P. 1214–1234.

Vikram A., Jayaprakasha G.K., Jesudhasan P.R., Pillai S.D., Patil B.S. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 109. P. 515–527.

Vincente A.R., Manganaris G.A., Ortiz C.M., Sozzi G.O., Crisosto C.H. Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. Postharvest Handling. Academic Press, 2014. 192 p.

Wang Y., Dong W., Odah K.A., Kong L., Ma H. Transcriptome analysis reveals AI-2 relevant genes of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in response to eugenol at sub-MIC // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 1159.

Wang Y.-H., Avula B., Nanayakkara N. P. D., Zhao J., Khan I.A. *Cassia cinnamon* as a source of coumarin in cinnamon-favored food and food supplements in the united states // J. Agric. Food Chem. 2013. V. 61. P. 4470–4476.

Winson M.K., Swift S., Fish L., Throup J.P., Jørgensen F., Chhabra S.R., Bycroft B.W., Williams P., Stewart G.S. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 163. P. 185–192.

Yu S.M., Hu D.H., Zhang J.J. Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells // Mol. Med. Rep. 2015. V. 12. P. 3869–3873.

Zhang Y., Sass A., Acker H.V., Wille J., Verhasselt B., Nieuwerburgh F.V., Kaever V., Crabbé A., Coenye T. Coumarin reduces virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by affecting quorum sensing, type iii secretion and C-di-GMP levels // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1952.

Zhao Y., Liu F., Lou H.X. Studies on the chemical constituents of *Solanum nigrum* // Zhong Yao Cai (in Chinese). 2010. V. 33. P. 555–556.

Zunying L., Yurong P., Xiaoshuang L., Jinxin J., Mingyong Z. Chemical composition, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of pummelo peel flavonoid extract // Ind. Crops and Products. 2017. V. 109. P. 862–868.

Plant-Derived Inhibitors of Density-Dependent Communication in Bacteria: Diversity of Structures, Bioactivity Mechanisms, and Sources of Origin

D. G. Deryabin[1, *], A. A. Galadzhieva[1, 2], D. B. Kosyan[1], and G. K. Duskaev[1]

[1]*Federal Scientific Center of Biological Systems and Agrotechnologies, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia*

[2]*Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia*

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

Received July 3, 2021; revised July 20, 2021; accepted July 22, 2021

Abstract—This review summarizes the current data of plant-derived compounds that inhibit bacterial density-dependent communication (quorum sensing, QS). The most frequent types of QS are described and interpreted as promising targets for a new way of antimicrobial therapy directed on suppression of virulence factors production and biofilm formation. The methodology for screening of the plant-derived QS inhibitors and their in-depth analyses is described. Diversity of known inhibitors, which are terpenes and terpenoids, phenols and methoxyphenols, coumarins, flavonoids, sulfoxides and isothiocyanates, is shown. The effects of various plant-derived compounds on bacteria with different QS types are analyzed, and anti-QS bioactivity molecular mechanisms are characterized. The taxonomy of plant sources of QS inhibitors and the biosynthetic pathways of these secondary metabolites are discussed. A concept of bacterial density-dependent communication suppression as a novel plant innate immunity component is presented, as well as of the possible application of plant-derived QS inhibitors for animals and humans protection.

Keywords: quorum sensing, QS inhibitors, plant-derived compounds

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 681–691

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГРУНТОВ АРХИПЕЛАГА ЗЕМЛЯ ФРАНЦА-ИОСИФА, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ[1]

© 2021 г. Е. М. Семенова[a], *, Т. Л. Бабич[a], Д. Ш. Соколова[a], А. С. Добрянский[b], А. В. Корзун[c], Д. Р. Крюков[d]

[a] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия*

[b] *Институт географии РАН, Москва, 119017 Россия*

[c] *МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия*

[d] *Национальный парк "Русская Арктика", Архангельск, 163051 Россия*

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

Поступила в редакцию 20.06.2021 г.
После доработки 18.07.2021 г.
Принята к публикации 18.07.2021 г.

В настоящей работе исследованы филогенетическое разнообразие и потенциальная функциональная активность микроорганизмов образцов арктических грунтов, в различной степени загрязненных углеводородами. Методом высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК показано преобладание в библиотеках из загрязненных грунтов последовательностей бактерий филумов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Доля последовательностей бактерий филумов *Acidobacteria*, *Chloroflexi* и *Gemmatimonadetes* была ниже в библиотеках образцов загрязненных грунтов по сравнению с образцами, не загрязненными углеводородами. Выявлены последовательности генов 16S рРНК потенциальных нефтедеструкторов родов *Alkanindiges*, *Aquabacterium, Polaromonas, Pseudomonas, Sphingomonas*. Численность культивируемых углеводородокисляющих бактерий (УОБ) в пробах грунта, определяемая при 5 и 15°С, варьировала от 10^4 до 10^6 кл/г грунта. Выделено 13 чистых культур УОБ, принадлежащих к родам *Arthrobacter, Bacillus*, *Brevibacillus*, *Janthinobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas,* способных использовать углеводороды, снижая поверхностное натяжение среды. Полученные сведения расширяют имеющиеся представления о составе и физиологических особенностях микробных сообществ арктических грунтов.

Ключевые слова: арктические почвы, бактериальные сообщества, окисление углеводородов, биосурфактанты, дизельное топливо

DOI: 10.31857/S0026365621060136

В настоящее время освоение Арктики приобретает все большее значение. Арктические территории могут содержать около 90 млрд баррелей нефти, 47 трл м^3 природного газа и 44 млрд баррелей сжиженного природного газа. Более половины (58%) разведанных запасов приходится на территорию России (Henderson, Loe, 2014). Помимо добычи полезных ископаемых, Арктический регион – место развития туризма и научной деятельности.

С ростом социально-экономической активности в регионе неизбежно возрастают экологические риски. Основной загрязнитель арктических почв – нефтепродукты (в том числе дизельное топливо), которые используются для отопления, получения электричества, заправки техники. Разливы топлива неизбежны при его транспортировке и хранении. В опубликованных обзорах проанализирован рост числа публикаций, посвященных очистке от углеводородов (УВ) в холодных регионах (Verasoundarapandian et al., 2021; Yap et al., 2021). По данным этих исследователей, наибольшее число публикаций посвящено очистке от дизельного топлива.

Особенности климата Арктики и логистические трудности приводят к тому, что применение здесь физических, химических и термических методов очистки от углеводородов нерентабельно (Naseri et al., 2014). Одним из возможных решений задачи по очистке природных экосистем является биоремедиация, т.е. использование метаболических способностей природной микрофлоры. Биоремедиация – широко применяемый, экологически безопасный и экономичный способ очистки почв и водоемов от нефти и нефтепродуктов, од-

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621060136 для авторизованных пользователей.

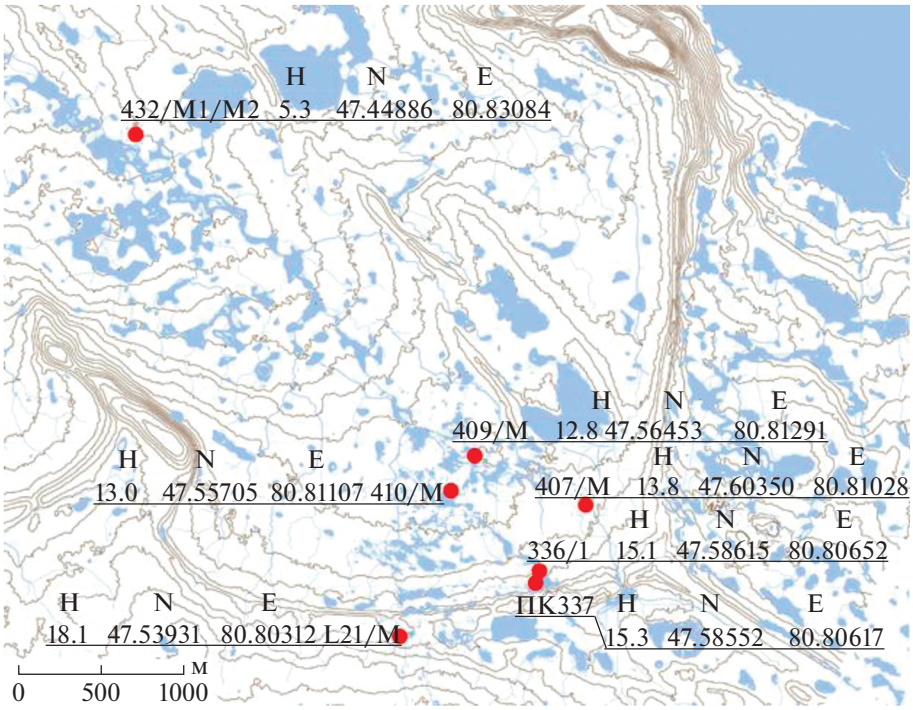


Рис. 1. Схема мест отбора проб грунтов на о. Земля Александры архипелага Земля Франца-Иосифа. H – высота над уровнем моря, N – С.Ш., E – З.Д.

нако в условиях высоких широт, возникают дополнительные трудности при его использовании (Kim et al., 2018; Yap et al., 2021).

Арктические условия характеризуются чрезвычайно низкими значениями температуры в зимний период, сильными ветрами, малым количеством осадков летом и нехваткой азота и фосфора в арктических почвах и грунтах (Malard, Pearce, 2018; Yap et al., 2021). Зачастую микроорганизмы подвергаются сразу нескольким стрессовым факторам, включающим низкую температуру и высокую соленость среды обитания. Микробное окисление углеводородов было зарегистрировано при –6°C в загрязненных почвах Шпицбергена (Rike et al., 2005). Минимальная температура, при которой в настоящее время зарегистрирована микробная активность, составляет –20°C (Rivkina et al., 2000).

Микробные сообщества полярных почв и грунтов и их метаболический потенциал слабо изучены (Harding et al., 2011; Rizzo et al., 2019; Hidalgo et al., 2020). В Генбанке мало представлены сведения о бактериальных сообществах холодных регионов, особенно выделенных из почв северных широт России (Malard, Pearce, 2018).

Целью настоящей работы было определение состава микробных сообществ проб арктических грунтов с различной степенью загрязнения дизельным топливом, отобранных на территории Национального парка “Русская Арктика” (архипелаг Земля Франца-Иосифа), и оценка способности этих сообществ и чистых культур микроорганизмов использовать углеводороды при низкой температуре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Пробы грунта отбирали летом 2019 г. на острове Земля Александры архипелага Земля Франца-Иосифа на территории Национального парка “Русская Арктика” в очаге загрязнения грунтов нефтепродуктами. Пробы отбирали на площадке, где до 2015 г. размещались склады горюче-смазочных материалов (ГСМ) (преимущественно дизельного топлива), а также в зоне миграции нефтепродуктов от очага загрязнения с поверхностным стоком и грунтовыми надмерзлотными водами (рис. 1). Усредненные по глубине пробы грунта отбирали из сезонно-талого слоя с глубины до 40 см. Пробы L21/M, ПК337, 336/1, 407/M, 409/M, 410/M представляют собой грунт разной степени загрязнения нефтепродуктами. Проба 432/M1 отобрана с поверхности береговых отложений временного водотока, проба 432/M2 – из донных отложений того же водотока. Обе пробы отобраны за пределами зоны распространения загрязнения.

Мерзлотные почвы архипелага Земля Франца-Иосифа представлены псаммоземами (Cryosol (Arenic)), пелоземами (Cryosol (Loamic)), криозе-

мами (Oxyaquic Cryosols), литоземами (Leptosols (Loamic)) и серогумусовыми (Cryosols (Loamic, Humic)). Наибольшие запасы органического углерода обнаружены в литоземах грубогумусированных в условиях защиты от сильных ветров (23.2 кг С/м^2 в верхнем полуметровом слое), а также в пелоземах и псаммоземах, содержащих погребенное криотурбациями органическое вещество (13.7 и 20.7 кг С/м^2 соответственно) (Никитин и соавт., 2020).

Состав питательных сред, условия культивирования и учета микроорганизмов. Для получения микробной суспензии усредненную навеску образцов грунта и осадков массой 10 г вносили в 90 мл стерильной водопроводной воды и перемешивали на качалке в течение 30 мин со скоростью 120 об./мин. Полученную суспензию выдерживали 5 мин для осаждения твердой фазы. Водную фракцию использовали для выделения ДНК и засева жидких селективных питательных сред. Численность микроорганизмов определяли путем посева суспензии в жидкие питательные среды методом предельных десятикратных разведений в двух повторностях. Результаты оценивали методом наиболее вероятного числа по таблице Мак Креди. Все посевы микроскопировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager.D1 (“Carl Zeiss”, Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRc и компьютерным программным обеспечением Axio Vision.

Анализируемые группы включали аэробные органотрофные, олиготрофные и углеводородокисляющие микроорганизмы. Численность аэробных органотрофных микроорганизмов оценивали в среде следующего состава (г/л): бакто-триптон – 5.0; дрожжевой экстракт – 2.5; глюкоза – 1.0; NaCl – 1.0; микроэлементы – 1 мл; pH 7.0–7.2. Олиготрофные микроорганизмы учитывали в среде состава (г/л): Na_2HPO_4 – 0.8; KH_2PO_4 – 0.5; NH_4Cl – 0.5; $MgSO_4$ – 0.2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.1; NaCl – 1.0; микроэлементы – 1 мл; дрожжевой экстракт – 0.05; pH 7.2. Углеводородокисляющие микроорганизмы учитывали в среде состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.75; K_2HPO_4 – 1.5; NH_4Cl – 1.0; NaCl – 1.0; KCl – 0.1; $MgSO_4$ – 0.2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.02; микроэлементы – 1 мл. В качестве субстрата вносили стерильное дизельное топливо в концентрации 0.5 об. %. Значение pH составляло 7.0–7.2. Посевы инкубировали при 15°С в течение 10 сут и при 5°С в течение 28 сут.

Чистые культуры олиготрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов выделяли методом последовательных пересевов, используя агаризованные среды того же состава, посевы инкубировали при 5 и 15°С. В качестве субстрата для углеводородокисляющих микроорганизмов использовали стерильное дизельное топливо, каплю которого распределяли шпателем по поверхности плотной среды. Интервал и оптимум содержания NaCl в среде для роста микроорганизмов определяли на среде LB, содержащей (г/л): бакто-триптон – 10.0; дрожжевой экстракт – 5.0; с разным содержанием NaCl. Температурные границы роста определяли на среде LB с оптимальным для каждого штамма содержанием NaCl. Посевы инкубировали стационарно в течение 7 сут при 5 или 15°С.

Аналитические методы. Белок в культуральной жидкости накопительных культур определяли методом Лоури. Величину поверхностного и межфазного натяжения на границах раздела фаз культуральная жидкость/воздух и культуральная жидкость/гексадекан, соответственно, определяли при комнатной температуре методом отрыва кольца с помощью полуавтоматического тензиометра Surface Tensiomat 21 (“Cole-Parmer”, США). Индекс эмульгирования E_{24} рассчитывали через 24 ч после добавления к 1 мл культуральной жидкости 1 мл гексадекана и интенсивного встряхивания в течение 3 мин и выражали в процентах, которые составляла эмульсия от объема смеси. Контролем служила стерильная питательная среда.

Рост на дизельном топливе определяли по изменению содержания *н*-алканов в составе алифатической фракции после культивирования относительно контрольной пробы (Борзенков и соавт., 2006).

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование гена 16S рРНК. Идентификацию чистых культур и определение состава микробного сообщества проводили методом анализа гена 16S рРНК. ДНК из полученной суспензии и чистых культур выделяли, используя набор Pure Link Microbiome DNA Purification KIT (“Thermo Fisher Scientific”, США), в соответствии с рекомендациями производителя. Для определения последовательности гена 16S рРНК чистых культур ДНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров 8-27f и 1492r. Для получения библиотек генов 16S рРНК микробных сообществ анализируемых проб был амплифицирован V4 гипервариабельный регион этого гена на основе двойного баркодирования. Библиотеки V4 региона гена 16S рРНК были созданы и использованием следующих праймеров: прямого (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT XXXXXX ZZZZ GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') и обратного (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT XXXXXX ZZZZ GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3') (Merkel et al., 2019). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реагентов MiSeqReagentKitv3 (600 циклов) (“Illumina”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

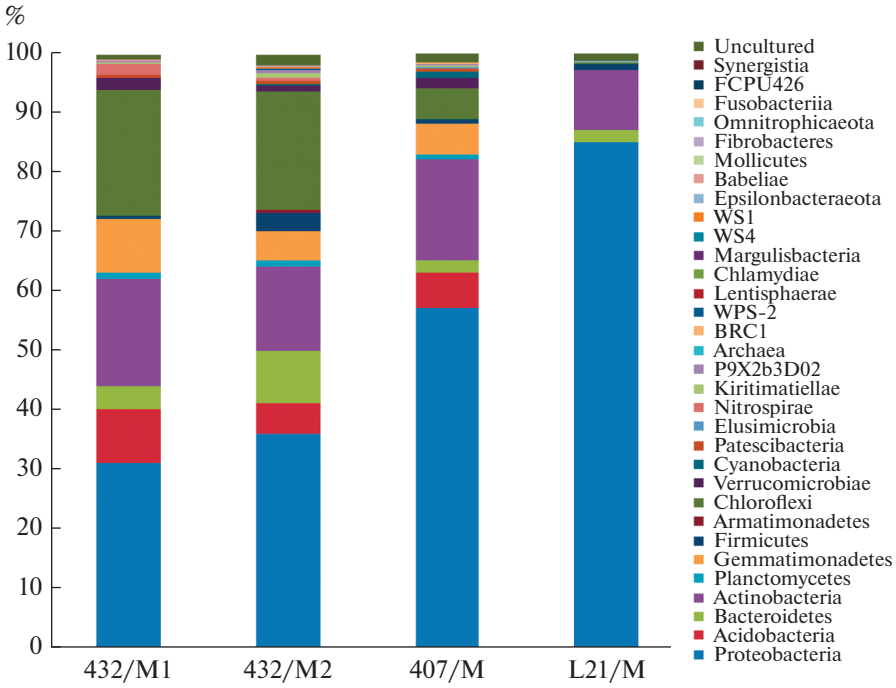


Рис. 2. Таксономическая классификация (на уровне филумов/классов) в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК прокариотных сообществ исследованных образцов арктических грунтов.

Биоинформатический анализ. Получение библиотек фрагментов последовательностей гена 16S рРНК, функциональных профилей и прогнозирование индивидуальных профилей ферментов метаболизма бензоата, нафталина и полиароматических углеводородов выполняли, как было описано ранее (Семенова и соавт., 2020). Тепловые карты функциональных профилей, предсказанных для сообществ, построены с использованием интернет-ресурса ClustVis (http://biit.cs.ut.ee/clustvis/, май 2021 г.).

Полученные последовательности гена 16S рРНК микробных сообществ и чистых культур были депонированы в ГенБанке под номерами PRJNA738511 и MZ411475–MZ411487 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетическое разнообразие прокариот в пробах арктических грунтов. Методом высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК был определен состав микробных сообществ в четырех пробах грунтов: 432/M1, 432/M2, 407/M и L21/M. В результате анализа было получено четыре библиотеки, содержащих суммарно 45457 фрагментов генов (ридов). На рис. 2 представлено филогенетическое разнообразие прокариот в исследуемых пробах на уровне филума. Микробные сообщества незагрязненных дизелем проб грунта 432/M1 и 432/M2, отобранных с разной глубины, имели похожий состав микроорганизмов. Доля последовательностей представителей домена *Archaea* в библиотеках из незагрязненных грунтов была низка и составляла 0.03–0.09% от общего количества последовательностей и снижалась до 0.01% в библиотеках из загрязненных проб грунта. В полученных библиотеках преобладали последовательности гена 16S рРНК, принадлежащие представителям филума *Proteobacteria*, причем их доля возрастала с увеличением степени загрязненности грунта углеводородами. Известно, что многие нефтеокисляющие микроорганизмы принадлежат к филуму *Proteobacteria*, поэтому увеличение их представленности в сообществе может быть связано с откликом микробного сообщества на загрязнение грунта углеводородами. Доля последовательностей бактерий филумов *Acidobacteria*, *Chloroflexi* и *Gemmatimonadetes*, напротив, снижалась в загрязненных нефтепродуктами участках. По-видимому, УВ ингибировали развитие представителей указанных филумов. Доля последовательностей *Actinobacteria* варьировала в пределах 14–18% и только в пробе L21/M снижалась до 10%.

На рис. 3 приведена тепловая карта биоразнообразия исследованных сообществ на родовом уровне. В библиотеках из незагрязненных проб преобладали последовательности некультивируемых *Chloroflexi* (54 и 40.6% от общего числа последовательностей), которые практически отсутствовали в пробах загрязненных почв. В библиотеке пробы L21/M доминировали последовательности представителей родов *Gallionella* и *Sulfuriferula*. Значи-

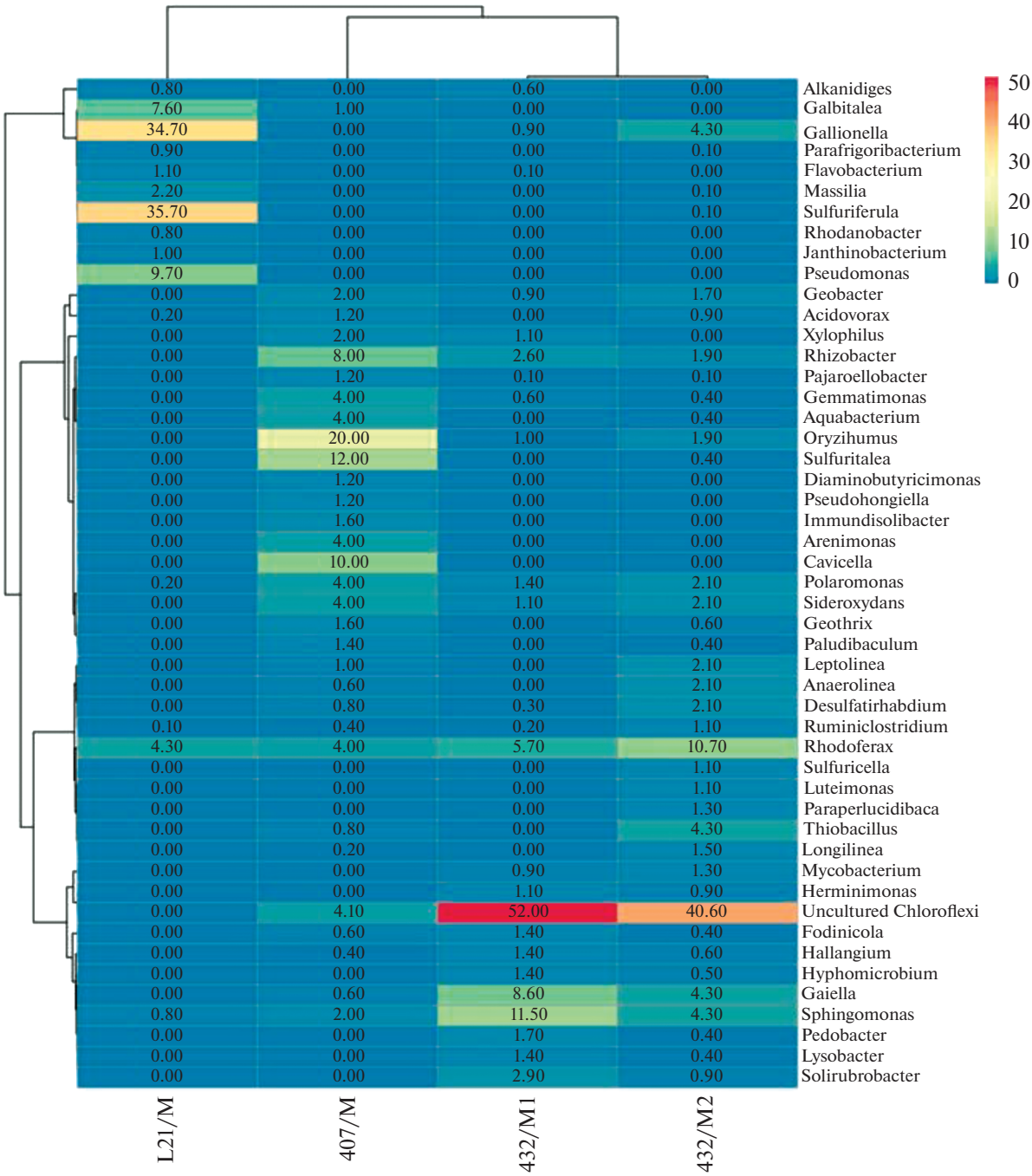


Рис. 3. Тепловая карта (heatmap) распределения доминантных родов в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК прокариотных сообществ, выделенных из образцов арктических грунтов. Двойная иерархическая дендрограмма показывает распределение микроорганизмов в этих пробах. Цветовой переход от синего к красному соответствует изменению относительных величин содержания отдельных родов в библиотеке от менее представленных к более представленным. Цифрами на диаграмме обозначены % от общего количества последовательностей в библиотеке из каждой исследованной пробы грунта.

тельное количество выявленных последовательностей гена 16S рРНК принадлежало бактериям родов *Galbitalea*, *Pseudomonas*, *Rhodoferax*. В сообществе пробы 407/М доминировали представители родов *Oryzihumus*, *Sulfuritalea*, *Rhizobacter* и *Polaromonas*. Выявленные бактерии характерны для почвенных сообществ, в том числе, олиготрофных. Пурпурные несерные бактерии рода *Rhodoferax* ранее были выявлены в составе микробных сообществ снега и воздуха Арктических островов Канады (Harding et al., 2011). Представители родов *Oryzihumus* и *Rhizobacter* – обычные обитатели

почв. Бактерии рода *Oryzihumus* были выявлены молекулярно-биологическими методами в почвах субарктической тундры, а представители *Rhizobacter* – в составе микробных матов антарктических почв (Kim et al., 2014; Tytgat et al., 2014). Бактерии родов *Janthinobacterium*, *Geobacter*, *Sphingomonas*, *Gallionella* и *Pedobacter* часто выявляют в олиготрофных местообитаниях, их также относят к бактериям, связанным с микробной трансформацией неорганических минеральных веществ (биотита, железа, апатита и т.д.) (Kim et al., 2014; Tytgat et al., 2014; Naoum, 2016). Факультативные олиготрофные бактерии родов *Flavobacterium*, *Alteromonas*, *Glaciecola* были выявлены в составе микробных сообществ морских вод Арктики и Антарктики (Mergaert et al., 2001; Van Trappen et al., 2004; Zhang et al., 2011; Li et al., 2017).

Молекулярными методами углеводородокисляющие бактерии были выявлены во всех исследованных пробах арктических грунтов. В незагрязненных пробах доминировали представители родов *Sphingomonas*, *Alkanindiges* и *Polaromonas*, в загрязненных пробах возрастала представленность бактерий родов *Pseudomonas*, *Aquabacterium* и *Janthinobacterium*, известных способностью использовать разные УВ.

Потенциальная функциональная активность микробных сообществ арктических грунтов. С помощью модуля Local Mapper программы iVikodak были предсказаны потенциальные функциональные возможности исследованных микробных сообществ (рис. 4). Во всех исследованных сообществах присутствовали микроорганизмы, способные использовать различные углеводороды, наибольшая интенсивность на тепловой карте соответствовала метаболизму бензоата, нафталина, ксилола, толуола, хлорбензола и стирола. Выявлена способность к производству экзополисахаридов микроорганизмами, входящих в состав исследованных сообществ.

С помощью базы данных KEGG были построены дендрограммы вклада бактерий в метаболизм бензоата (а), нафталина (б) и полициклических ароматических углеводородов (в) (рис. S1). Бактерии родов *Rhodoferax*, *Herpetosiphon*, *Pseudomonas* и *Sphingomonas* вносили определенный вклад в метаболизм указанных выше соединений. Последовательности генов 16S рРНК представителей филума *Chloroflexi* обнаруживали ранее в пробах воды Северно-Ледовитого океана. Было показано наличие многочисленных генов, отвечающих за разрушение ароматических углеводородов у представителей этого филума (Colatriano et al., 2018). Представители рода *Herpetosiphon* относятся к мезофильным бактериям–хищникам, способным расти на других микроорганизмах (Livingstone et al., 2018). На момент написания статьи нам не удалось обнаружить сведений о том, что бактерии этого рода могут расти на углеводородах при низкой температуре. Бактерии рода *Rhodoferax* (*Rhodoferax antarcticus*) ранее были обнаружены в пробах, загрязненных ароматическими углеводородами, и, по-видимому, принимают участие в деградации бензола (Aburto et al., 2011). Фототрофные психрофильные бактерии *Rhodoferax antarcticus*, ранее выделенные из микробного мата Антарктики, росли в интервале температуры от 0 до 25°C (Madigan et al., 2000).

Бактерии родов *Pseudomonas* и *Sphingomonas* – известные деструкторы углеводородов, которые используются при очистке от УВ загрязнений, в том числе, при низкой температуре (Thomassin-Lacroix et al., 2002). Психрофильные и психротолерантные представители этих родов были неоднократно выделены из вечной мерзлоты и других холодных местообитаний (Yakimov et al., 2004; Steven et al., 2006).

Определение численности культивируемых микроорганизмов в образцах грунта. Численность аэробных органотрофных (АОБ), олиготрофных (ОЛ) и углеводородокисляющих (УОБ) бактерий определяли при температуре 5 и 15°C (рис. S2). Показано, что численность микроорганизмов исследуемых групп при 15°C была выше, чем при 5°C. Углеводородокисляющие бактерии были обнаружены во всех исследованных пробах, где их численность варьировала в пределах 10^4–10^6 кл/г грунта. Максимальная численность была в пробах ПК337 и 409/М, загрязненных нефтепродуктами, в то время как в незагрязненных пробах 432/М1 и 432/М2 численность УОБ не превышала 10^4 кл/г грунта. Часто микроорганизмы образовывали биопленку на поверхности жидкой среды с дизельным топливом.

Численность углеводородокисляющих бактерий в пробах загрязненных нефтепродуктами арктических грунтов, их рост на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода дизельное топливо, указывает на потенциал этой группы микроорганизмов в качестве агентов для самоочищения почвы и возможность использования их в биоремедиации.

Рост накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов на дизельном топливе. Первичные накопительные культуры УОБ, в которых был отмечен рост, были отобраны для посева на дизельное топливо в жидкую минеральную среду. Посевы инкубировали в течение 45 сут при 5°C в стационарных условиях. Во всех полученных культурах было отмечено накопление белка от 45 до 190 мкг/мл (табл. 1). Максимальное количество белка зафиксировано в посевах из проб 409/М, 407/М, 432/М, 336/1. Во всех посевах отмечено снижение поверхностного натяжения культуральной жидкости с бактериями на 15.6–29.3 мН/м, а межфазного натяжения на границе культуральная жидкость/гексадекан – на 11.6–35.3 мН/м по сравнению с контролем, что свидетельствует о присутствии деструкторов углеводородов в составе ис-

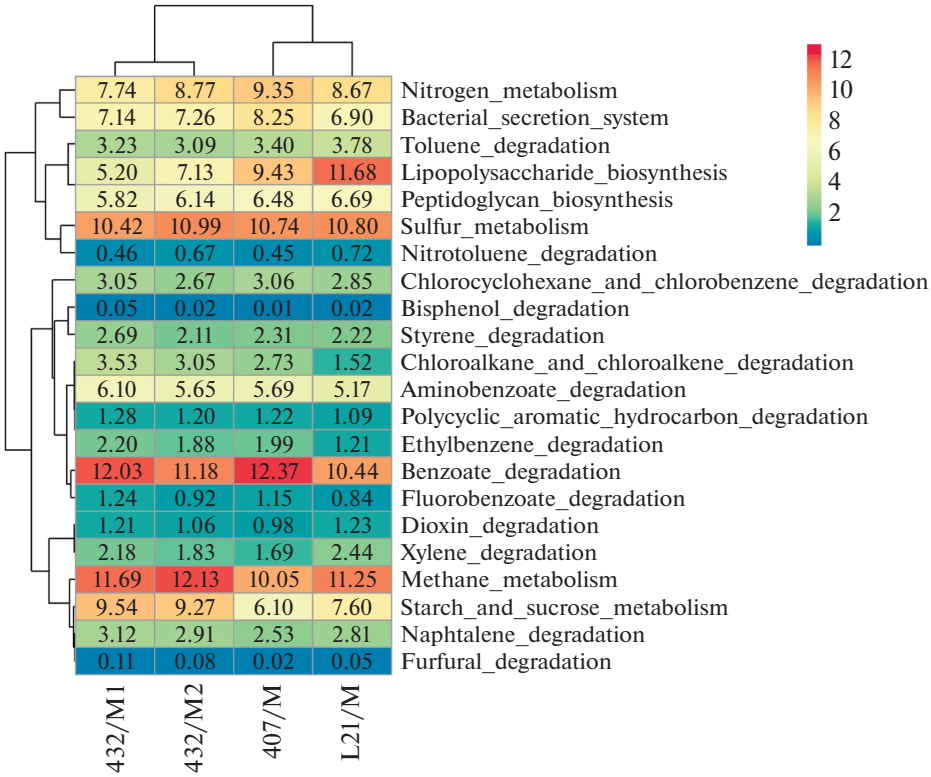


Рис. 4. Тепловая карта, показывающая сравнение функциональных профилей прокариотных сообществ, выделенных из образцов арктических грунтов, с использованием пакета программ iVikodak.

следуемых накопительных культур. Большинство накопительных культур формировали стойкую эмульсию при смешивании с гексадеканом. Величина индекса эмульгирования (E_{24}) достигала 50–70% (табл. 1).

Культивирование микроорганизмов в среде с дизельным топливом сопровождалось изменением состава алифатической фракции при росте накопительных культур 432/M1, ПК337, 409/M и 336/1 (рис. S3). Микроорганизмы из накопительной культуры 432/M1, полученной из незагрязненного участка, использовали *н*-алканы с длиной цепи C_{10}–C_{26}. Культуры из загрязненных участков ПК337 и 409/M использовали коротко- и среднецепочечные *н*-алканы, а микроорганизмы из пробы 336/1 деградировали *н*-алканы с длиной цепи C_{10}–C_{25}, но степень их потребления была невелика. Поскольку накопление белка и изменение реологических характеристик было отмечено для всех исследованных культур, можно предположить, что в тех культурах, где не было отмечено изменений в алифатической фракции, происходило использование других компонентов дизельного топлива.

Выделение чистых культур микроорганизмов и их физиологические характеристики. Из полученных накопительных культур олиготрофов и углеводородокисляющих бактерий методом последовательных пересевов было выделено и очищено 13 штаммов бактерий (табл. 2). Культуры инкубировали при 5 и 15°C.

Таблица 1. Реологические характеристики и содержание белка в накопительных культурах углеводородокисляющих бактерий при росте на дизельном топливе

Показатель	Стерильная среда	L21/M	ПК337	409/M	407/M	432/M1	336/1	410/M
Белок, мкг/мл	0	57	95	110	105	180	105	45
ПН, мН/м	64.2	47.4	39.6	34.9	41.9	41.1	43.8	43.5
МН, мН/м	45.0	30.6	9.7	17.8	23.5	22.1	22.8	30.6
E_{24}, %	0	10	50	50	60	70	70	0

ПН – поверхностное натяжение, МН – межфазное натяжение.

Таблица 2. Физиологические характеристики углеводородокисляющих бактерий, выделенных из арктических грунтов

Штамм	Ближайший типовой штамм	% сходства гена 16S рРНК	Источник выделения, температура инкубации	Интервал температур, °C, (оптимум)	NaCl, % (оптимум)	Субстрат*				
						Д/т**	C_{14}–C_{16}	нафталин	ацетат	этанол
Ar-K10	*Arthrobacter alpinus* S6-3, NR_117254	99.8	407/M, 5°C	5–28 (10)	0–>7 (3)	++	Н.д.	+/–	+	+
Ar-6-1	*Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169 MN117669	99.8	432/M, 15°C	5–50 (37)	0–>6 (3)	+/–	+/–	–	+	–
Ar-8-1	*Brevibacillus agri* DSM 6348, NR_040983	99.9	410/M, 15°C	5–45 (28)	0–4 (3)	++	+	+	+	++
Ar-OL-9	*Janthinobacterium lividum* DSM 1522, NR_026365	99.9	432/M2, 5°C	5–37 (10)	0–2 (0–0.2)	+	++	–	++	+/–
Ar-4-1	*Paenibacillus ehimensis* KCTC 3748, NR_025666	99.8	407/M, 15°C	15–50 (37)	0–1 (0.5)	–	–	+/–	+	+
Ar-K6	*Pseudomonas fildesensis* KG01, MK859934	99.8	ПК337, 5°C	5–42 (5–15)	0–4.5 (3)	+	+++	+/–	++	++
Ar-OL-10	*Pseudomonas frederiksbergensis* DSM 13022, NR_117177	99.9	432/M2, 5°C	5–30 (5–10)	0–4.5 (0.5–1)	+	+	+/–	++	+
Ar-K7	*Pseudomonas frederiksbergensis* DSM 13022, NR_117177	98.7	409/M, 5°C	5–37 (5)	0–3 (0.5–1)	+++	++	+	++	++
Ar-K18	*Pseudomonas kitaguniensis* MAFF 212408, LC500864	99.4	432/M2, 5°C	5–37 (5)	0–>6 (3)	+/–	++	+	++	+
Ar-K12	*Pseudomonas silesiensis* A3, NR_156815	99.6	407/M, 5°C	5–42(5–10)	0–3 (0.5–2)	+	+	+/–	++	++
Ar-OL-11	*Pseudomonas fildesensis* KG01, MK859934	99.5	ПК337, 5°C	5–42 (5–10)	0–4.5 (3)	+/–	++	+/–	++	++
Ar-K9	*Rhodococcus globerulus* DSM 43954, NR_118617	99.3	407/M, 5°C	5–30 (5)	0–6 (0.5–2)	++	+++	+/–	++	++
Ar-OL-41	*Sphingomonas echinoides* NRRL B-3126, G745876	98.5	407/M, 5°C	5–30 (28)	0–1 (0.2)	++	++	–	–	+

* Все исследованные штаммы росли на глюкозе и глицерине. Рост оценивали по изменению оптической плотности по сравнению с начальным засевом ($OD_{660} < 0.010$). OD_{660} 0.015–0.029 (+/–), OD_{660} 0.03–0.099 (+), $OD_{660} > 0.1$ (++), $OD_{660} > 0.3$ – (+++).
** Д/т – дизельное топливо.

Таблица 3. Реологические характеристики культуральных сред с бактериями, выросших на средах с дизельным топливом и C_{14}–C_{16} *н*-алканами

Номер штамма	Стерильная среда	*A. alpinus* Ar-K10	*B. agri* Ar-8-1	*J. lividum* Ar-OL-9	*P. fildesensis* Ar-K6	*P. frederiksbergensis* Ar-K7	*P. kitaguniensis* Ar-K18	*P. veronii* Ar-OL-11	*R. globerulus* Ar-K9
Субстрат	–	Д/т*	Д/т	C_{14}–C_{16}	C_{14}–C_{16}	Д/т	C_{14}–C_{16}	C_{14}–C_{16}	C_{14}–C_{16}
ПН, мН/м	62.4	43.3	40.4	50.0	47.6	43.8	55.1	45.1	29.3
МН, мН/м	45.0	9.7	16.9	34.0	33.5	27.8	22.7	13.8	0.5

*Д/т – дизельное топливо.

Все штаммы, выделенные при 15°C, были мезофильными спорообразующими бактериями и относились к родам *Bacillus*, *Brevibacillus* и *Paenibacillus*. Из незагрязненных образцов грунта были выделены бактерии родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Janthinobacterium*, которые не были выявлены молекулярными методами. Однако бактерии родов *Pseudomonas* и *Janthinobacterium* входили в состав микробного сообщества пробы L21/M. Для сообществ антарктических микробных матов было показано, что результаты высокопроизводительного секвенирования дают более полную картину биоразнообразия исследованных микробных сообществ, однако многие группы бактерий, не были выявлены этим методом, в отличие от культивирования (Tytgat et al., 2014). Это указывает на необходимость использования как молекулярных, так и традиционных микробиологических методов исследования для получения полной картины состава микробного сообщества природных сообществ.

Выделенные чистые культуры микроорганизмов, за исключением штамма Ar-4-1, росли при низкой температуре. Большинство штаммов относились к психрофильным микроорганизмам и имели оптимальные значения температуры для роста 5–10°C. Штаммы Ar-OL-9, Ar-OL-10, Ar-OL-11, Ar-OL-41, выделенные на среде для олиготрофов, росли на бедной среде при низкой температуре, что свидетельствует об их приспособленности к условиям высоких широт.

Среди выделенных штаммов присутствовали пресноводные и галотолерантные бактерии. Так, штаммы *Janthinobacterium lividum* Ar-OL-9 и *Sphingomonas echinoides* Ar-OL-41 не росли в среде с содержанием хлорида натрия выше 1%. Штаммы *Arthrobacter alpinus* Ar-K10 и *Bacillus wiedmannii* Ar-6-1 показали наибольшую толерантность к содержанию соли в среде и росли в присутствии 6–7% NaCl. Все выделенные штаммы росли также в отсутствие NaCl в среде. Однако для большинства изолятов оптимальные значения солености среды 2–3% NaCl, что соответствует содержанию соли в морской воде.

Большинство выделенных штаммов использовали глюкозу, ацетат, глицерин, этанол и УВ. Штаммы *Pseudomonas fildesensis* Ar-K6, *Pseudomonas kitaguniensis* Ar-K18 и *Rhodococcus globerulus* Ar-K9 росли на алифатических углеводородах, а штамм *Pseudomonas frederiksbergensis* Ar-K7 – на дизельном топливе. Штамм Ar-K9 лучше рос на смеси углеводородов C_{14}–C_{16}, чем на глюкозе. При росте на нафталине штамм Ar-K18 образовывал биопленку, прикрепленную к кристаллам нафталина.

Для восьми штаммов, показавших интенсивный рост на дизельном топливе или смеси углеводородов, были проанализированы реологические характеристики культуральных жидкостей. В отличие от накопительных культур, ни для одного штамма не было выявлено эмульгирующей активности сред. Штаммы *A. alpinus* Ar-K10, *B. agri* Ar-8-1, *P. kitaguniensis* Ar-K18, *P. veronii* Ar-OL-11 и *R. globerulus* Ar-K9 показали значительное снижение поверхностного и межфазного натяжения (табл. 3). Штамм *R. globerulus* Ar-K9 был наиболее перспективным для очистки почв от углеводородных загрязнений при низких температурах и солености 2% NaCl в среде.

Таким образом, микробные сообщества арктических грунтов, отобранных на острове Земля Александры архипелага Земля Франца-Иосифа, включают микробные популяции, способные использовать компоненты дизельного топлива, *н*-алканы, ароматические соединения и другие углеводороды при низкой температуре. Полученные сведения расширяют имеющиеся представления о составе и физиологических особенностях микробных сообществ арктических грунтов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА.

Накопительные и чистые культуры микроорганизмов изучали при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Анализ

микробных сообществ был выполнен за счет средств гранта ПАО НК “Роснефть”, предоставленного национальному парку “Русская Арктика”.

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

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

Borzenkov I.A., Milekhina E.I., Gotoeva M.T., Rozanova E.P., Belyaev S.S. The properties of hydrocarbon oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 66–72.
https://doi.org/10.1134/S0026261706010127

Никитин Д.А., Лысак Л.В., Мергелов Н.С., Долгих А.В., Зазовская Э.П., Горячкин С.В. Микробная биомасса, запасы углерода и эмиссия CO_2 в почвах Земли Франца-Иосифа: высокоарктические тундры или полярные пустыни? // Почвоведение. 2020. № 4. С. 444–462.
https://doi.org/10.31857/S0032180X20040115

Nikitin D., Lysak L.V., Mergelov N.S., Dolgikh A.V., Zazovskaya E.P., Goryachkin S.V. Microbial biomass, carbon stocks, and CO_2 emission in soils of Franz Josef Land: high-arctic tundra or polar deserts? // Euras. Soil Sci. 2020. V. 53. P. 467–484.
https://doi.org/10.1134/S1064229320040110

Семенова Е.М., Ершов А.П., Соколова Д.Ш., Турова Т.П., Назина Т.Н. Разнообразие и биотехнологический потенциал нитратредуцирующих бактерий из месторождений тяжелой нефти (Россия) // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 675–687.
https://doi.org/10.31857/S0026365620060166

Semenova E.M., Ershov A.P., Sokolova D.Sh., Tourova T.P., Nazina T.N. Diversity and biotechnological potential of nitrate-reducing bacteria from heavy-oil reservoirs (Russia) // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 685–696.
https://doi.org/10.1134/s0026261720060168

Aburto A., Peimbert M. Degradation of a benzene-toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities // Ann. Microbiol. 2011. V. 61. P. 553–562.
https://doi.org/10.1007/s13213-010-0173-6

Colatriano D., Tran P.Q., Guéguen C., Williams W.J., Lovejoy C., Walsh D.A. Genomic evidence for the degradation of terrestrial organic matter by pelagic Arctic Ocean *Chloroflexi* bacteria // Biol. Commun. 2018. V. 1. Art. 90.
https://doi.org/10.1038/s42003-018-0086-7

Harding T., Jungblut A.D., Lovejoy C., Vincent W.F. Microbes in high arctic snow and implications for the cold biosphere // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 3234–3243.
https://doi.org/10.1128/AEM.02611-10

Henderson J., Loe J. The prospects and challenges for arctic oil development // Oxford Institute for Energy Studies. 2014. Art. 54. P. 1–60.

Hidalgo K.J., Sierra-Garcia I.N., Dellagnezze B.M., de Oliveira V.M. Metagenomic insights into the mechanisms for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the oil supply chain // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 561506.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561506

Kim H.M., Jung J.Y., Yergeau E., Hwang C.Y., Hinzman L., Nam S., Hong S.G., Kim O.S., Chun J., Lee Y.K. Bacterial community structure and soil properties of a subarctic tundra soil in Council, Alaska // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 89. P. 465–475.
https://doi.org/10.1111/1574-6941.12362

Kim J., Lee A.H., Chang W. Enhanced bioremediation of nutrient-amended, petroleum hydrocarbon-contaminated soils over a cold-climate winter: the rate and extent of hydrocarbon biodegradation and microbial response in a pilot-scale biopile subjected to natural seasonal freeze-thaw temperatures // Sci. Total. Environ. 2018. V. 612. P. 903–913.
https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.227

Li D.D., Liu C., Zhang Y.Q., Wang X.J., Wang N., Peng M., Song X.Y., Su H.N., Zhang X.Y., Zhang Y.Z., Shi M. Flavobacterium arcticum sp. nov., isolated from Arctic seawater // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1070–1074.
https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001804

Livingstone P.G., Morphew R.M., Cookson A.R., Whitworth D.E. Genome analysis, metabolic potential, and predatory capabilities of *Herpetosiphon llansteffanense* sp. nov. // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. Art. e01040–18.
https://doi.org/10.1128/AEM.01040-18

Madigan M.T., Jung D.O., Woese C.R., Achenbach L.A. Rhodoferax antarcticus sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat // Arch. Microbiol. 2000. V. 173. P. 269–277.
https://doi.org/10.1007/s002030000140

Malard L.A., Pearce D.A. Microbial diversity and biogeography in Arctic soils // Env. Microbiol. Rep. 2018. V. 10. P. 611–625.
https://doi.org/10.1111/1758-2229.12680

Mergaert J., Verhelst A., Cnockaert M.C., Tan T.L., Swings J. Characterization of facultative oligotrophic bacteria from polar seas by analysis of their fatty acids and 16S rDNA sequences // Syst. Appl. Microbiol. 2001. V. 24. P. 98–107.
https://doi.org/10.1078/0723-2020-00012

Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.
https://doi.org/10.1134/S0026261719060110

Naoum J.O. Study of bacterial populations from oligotrophic soil ecosystems using high throughput sequencing technologies // Biodiversity and Ecology. Université Paris-Saclay. 2016. English (NNT: 2016SACLS196).

Naseri M., Barabadi A., Barabady J. Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic soils: influencing parameters // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2014. V. 21. P. 11250–11265.
https://doi.org/10.1007/s11356-014-3122-2

Rike A., Haugen K.B., Engene B. In situ biodegradation of hydrocarbons in arctic soil at sub-zero temperatures–Field monitoring and theoretical simulation of the microbial activation temperature at a Spitsbergen contaminated site //

Cold. Reg. Sci. Technol. 2005. V. 41. P. 189–209. https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2004.10.005

Rivkina E.M., Friedmann E.I., Mckay C.P., Gilichinsky D.A. Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point // App. Environ. Microb. 2000. V. 66. P. 3230–3233.

Rizzo C., Malavenda R., Gerçe B., Papale M., Syldatk Ch., Hausmann R., Bruni V., Michaud L., Giudice A.L., Amalfitano S. Effects of a simulated acute oil spillage on bacterial communities from Arctic and Antarctic marine sediments // Microorganisms. 2019. V. 7. Art. 632. https://doi.org/10.3390/microorganisms7120632

Steven B., Léveillé R., Pollard W.H., Whyte L.G. Microbial ecology and biodiversity in permafrost // Extremophiles. 2006. V. 10. P. 259–267. https://doi.org/10.1007/s00792-006-0506-3

Thomassin-Lacroix E.J.M., Eriksson M., Reimer K.J., Mohn W.W. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 551–556. https://doi.org/10.1007/s00253-002-1038-0

Van Trappen S., Tan T.L., Yang J., Mergaert J., Swings J. Alteromonas stellipolaris sp. nov., a novel, budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus *Alteromonas* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1157–1163. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02862-0

Tytgat B., Verleyen E., Obbels D., Peeters K., De Wever A., D'hondt S., De Meyer T., Van Criekinge W., Vyverman W., Willems A. Bacterial diversity assessment in Antarctic terrestrial and aquatic microbial mats: a comparison between bidirectional pyrosequencing and cultivation // PLoS One. 2014. V. 9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097564

Yakimov M.M., Gentile G., Bruni V., Cappello S., D'Auria G., Golyshin P.N., Giuliano L. Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 49. P. 419–432. https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.018

Verasoundarapandian G., Wong C.Y., Shaharuddin N.A., Gomez-Fuentes C., Zulkharnain A., Ahmad S.A. A review and bibliometric analysis on applications of microbial degradation of hydrocarbon contaminants in Arctic marine environment at metagenomic and enzymatic levels // Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2021. V. 18. P. 1671. https://doi.org/10.3390/ijerph18041671

Yap H.S., Zakaria N.N., Zulkharnain A., Sabri S., Gomez-Fuentes C., Ahmad S.A. Bibliometric analysis of hydrocarbon bioremediation in cold regions and a review on enhanced soil bioremediation // Biology (Basel). 2021. V. 10. P. 354. https://doi.org/10.3390/biology10050354

Zhang Y.J., Zhang X.Y., Mi Z.H., Chen C.X., Gao Z.M., Chen X.L., Yu Y., Chen B., Zhang Y.Z. Glaciecola arctica sp. nov., isolated from Arctic marine sediment // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 2338–2341. https://doi.org/10.1099/ijs.0.027326-0

Microbial Diversity of Hydrocarbon-Contaminated Soils of the Franz Josef Land Archipelago

E. M. Semenova[1, *], T. L. Babich[1], D. Sh. Sokolova[1], A. S. Dobriansky[2], A. V. Korzun[3], and D. R. Kryukov[4]

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

[2]*Institute of Geography, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119017 Russia*

[3]*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

[4]*Russian Arctic National Park, Arkhangelsk, 163051 Russia*

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

Received June 20, 2021; revised July 18, 2021; accepted July 18, 2021

Abstract—In this work, we investigated the phylogenetic diversity and potential functional activity of microorganisms in the samples of hydrocarbon-contaminated Arctic soils. High-throughput sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene revealed predominance of bacterial sequences of the phyla *Proteobacteria* and *Actinobacteria* in the libraries from contaminated soils. Relative abundance of bacterial sequences of the phyla *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, and *Gemmatimonadetes* was lower in the libraries of contaminated soil samples compared to the samples not contaminated with hydrocarbons. The 16S rRNA gene sequences of potential oil destructors of the genera *Alkanindiges*, *Aquabacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, and *Sphingomonas* were revealed. The number of cultivated hydrocarbon-oxidizing bacteria (HOB) in soil samples, determined at 5 and 15°C, varied from 10^4 to 10^6 cells/g of soil. Thirteen pure HOB cultures were isolated, belonging to the genera *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Janthinobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, and *Sphingomonas*, which were capable of growing with hydrocarbons and decrease the surface tension of the medium. The information obtained expands the existing understanding of the composition and physiological characteristics of microbial communities in Arctic soils.

Keywords: arctic soils, bacterial communities, hydrocarbon degradation, biosurfactants, diesel fuel

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 692–705

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

НОВЫЕ БИОКОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, И ИХ ПОТЕНЦИАЛ ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТЕПРОДУКТОВ

© 2021 г.
Ю. А. Николаев[a], *, И. А. Борзенков[a], Е. В. Дёмкина[a], Н. Г. Лойко[a], Т. А. Канапацкий[a], И. В. Перминова[b], А. Н. Хрептугова[b], Н. В. Григорьева[a], И. В. Близнец[d], Н. А. Манучарова[c], В. В. Сорокин[a], М. А. Коваленко[c], Г. И. Эль-Регистан[a]

[a] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия*

[b] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119191 Россия*

[c] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, 119191 Россия*

[d] *ООО "Компания "БНТ" (Технопарк МГУ), Москва, Россия*

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

Поступила в редакцию 07.07.2021 г.
После доработки 18.07.2021 г.
Принята к публикации 21.07.2021 г.

Повышение стабильности биопрепаратов углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), используемых для биоремедиации объектов окружающей среды, загрязненных нефтепродуктами, является актуальной задачей. В настоящем исследовании разработаны новые биокомпозитные материалы для иммобилизации УОМ на поверхности микрокапсул (МК) из: полимочевины чистой или модифицированной хитозаном или желатином; из полимолочной или полигликолевой кислот; а также включения в гели из силанольных производных гуминовых кислот. В качестве УОМ использовали грамотрицательные бактерии *Acinetobacter seifertii* WS1, *Pseudomonas extremaustralis* WS-1, *P. aeruginosa* OIS 4.8.1, грамположительные бактерии *Rhodococcus qingshengii* 367-6, *Dietzia maris* 367-2, а также дрожжи *Yarrowia lipolytica* 367-2. Выращивание УОМ в жидких средах совместно с МК на основе полимочевины с хитозаном (но не чистой полимочевины или с желатином) повышало численность жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) в 2–5 раз по сравнению с контрольными вариантами (без МК), как в свежевыращенных культурах, так и культурах, длительно (до 7 мес.) хранящихся при комнатной температуре и доступе воздуха. Культивирование УОМ совместно с МК, полученными из полимолочной кислоты, приводило к активному их обрастанию. В вариантах с МК из полигликолевой кислоты обрастание было менее заметным, что фиксировалось микроскопически. При краткосрочном хранении (1 мес.) при комнатной температуре варианта с МК из полимолочной кислоты выживало на 3 порядка больше клеток *R. qingshengii*, чем в контроле (без МК). Наиболее эффективным было включение УОБ в гели из силанольных производных гуматов: в таких препаратах после 7–12 мес. хранения титр КОЕ был выше, чем в контрольном варианте до 100 раз, скорость дыхания также выше, чем в контрольном варианте. Биопрепараты на основе новых биокомпозитных материалов с иммобилизованными УОМ обладали высокой функциональной активностью в жидких средах и почвенных микрокосмах, загрязненных нефтью. Через 4 мес. хранения при комнатной температуре скорость окисления нефти такими биопрепаратами была в 2–4 раза выше, чем в контрольных вариантах. Важными для практического применения свойствами новых биокомпозитных материалов являются: пролонгирование жизнеспособности клеток УОМ при длительном (до 12 мес.) хранении; гомогенность культур в период их применения; наличие дополнительных субстратов роста, также используемых для соокисления углеводородов.

Ключевые слова: углеводородокисляющие микроорганизмы, биокомпозитные материалы, микрокапсулы, силанольно-гуминовый гель, длительное хранение, деструкция нефти

DOI: 10.31857/S0026365621060112

Восстановление экосистем, загрязненных нефтью и (или) нефтепродуктами, является актуальной задачей (Sihag et al., 2014). Как правило, проведение ремедиационных мероприятий сопровождается использованием биопрепаратов на основе углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) (Das, Chandran, 2011). Одним из серьезных недостатков использования биопрепаратов являет-

ся гибель значительной части популяции микроорганизмов при получении их товарных форм на этапах сгущения и сушки, а также при хранении и транспортировке. Особенно остро стоит проблема сохранения жизнеспособности микроорганизмов в жидких формах биопрепаратов, которые привлекательны для применения в природоохранных биотехнологиях. Преимущество жидкой формы состоит в том, что она проще и дешевле в производстве и не требует предварительной активации при использовании.

При любом из известных способов стабилизации биопрепаратов (понимаемой как продление сроков поддержания высокого/технологически приемлемого титра жизнеспособных клеток), в его состав входят дополнительные компоненты разной функциональной направленности. На этом основании стабилизированные биопрепараты являются биокомпозитными материалами (БКМ), определяемыми как материалы, состоящие из двух или более различных компонентов, один из которых природного происхождения, при комбинировании которых у нового материала усиливаются свойства исходных материалов (Rudin, Choi, 2013). Этот термин в настоящее время используется для определения двух или более различных понятий. В инженерных науках и материаловедении "БКМ" – это материал, включающий натуральные компоненты (смолы и волокна) (Pilla, 2011; Rudin, Choi, 2013). В биомедицине и смежных областях под биокомпозитами понимают биосовместимые материалы, например, для имплантов в стоматологии (Iqba, Keshavarz, 2017; Tayebi, Moharamzadeh, 2018). Однако, строго говоря, дефиниции биокомпозитов более соответствуют материалы, включающие в свой состав живые системы или их компоненты, в результате чего усиливаются их свойства (Rudin, Choi, 2013). Такими материалам являются биосенсоры (Lupu et al., 2015), "живые функциональные материалы" (Living Functional Materials, LFM) (Chen et al., 2015; Liu, Xu, 2020), к которым относят биопленки и живые организмы, иммобилизованные в гидрогелях.

Эффективным подходом к стабилизации клеток микроорганизмов является их иммобилизация одним из трех известных типов: связывание/адгезия на твердом носителе, включение в пространственную структуру носителя (геля) и включение в объем, ограниченный полупроницаемой мембраной (Mitropoulouet et al., 2013). В медицине, фармакологии и для стабилизации пробиотиков применяются такие конструкции, как микрокапсулы (МК) (Benita, 2005; Opara, 2017) – полые тонкостенные сферы диаметром до 1000 мкм, внутри которых заключен биологический или химический материал (Opara, 2017). Применение МК в природоохранных биотехнологиях не распространено, хотя представляет интерес испытать их в качестве твердых синтетических носителей прикрепленного биоценоза, поскольку МК практически не влияют на реологию жидкости, и их удобно транспортировать и применять. Можно ожидать, что адсорбция на поверхности МК будет повышать защищенность микроорганизмов, переходящих в биопленочный фенотип. Технологически привлекательными свойствами МК являются высокая площадь поверхности для прикрепления микроорганизмов, возможность модифицировать состав материала, в том числе – делать его биодеградируемым. Применение биодеградируемых материалов одновременно имеет два положительных момента: они безопасны для окружающей среды и являются дополнительным субстратом для микрофлоры.

Одним из популярных биодеградируемых материалов являются полиоксикислоты (полимолочная, полигликолевая) (Sakurai et al., 2013), которые в естественных условиях быстро разрушаются (Qi et al., 2017). Другой перспективный биодеградируемый материал – полимочевина (в чистом виде весьма инертная), модифицированная разрушаемыми биополимерами углеводной или белковой природы (Martens, Domsch, 1981; Sears et al., 2016; Tang et al., 2016).

Другим распространенным подходом к иммобилизации живых биокатализаторов является их помещение в гели из различных веществ (Dzionek et al., 2016), наиболее распространенными из которых являются ПВС (поливиниловый спирт), альгинат кальция и ряд других. С учетом обнаруженных нами свойств гуматов выступать эффективными стабилизаторами культур УОМ при длительном хранении (Николаев и соавт., 2019, 2020), в рамках настоящей работы было интересно испытать новый тип биосовместимого геля на основе органосиланов, модифицированных гуматами (Volikov et al., 2016a, 2016b). Эти гели разработаны как безопасные барьеры для адсорбции тяжелых металлов и других поллютантов. Для включения микроорганизмов они не использовались. Такие гели обладают дополнительными полезными и уникальными свойствами – легко растворимы в воде, содержат гуматы, которые являются почвенными мелиорантами и применяются для биоремедиации нефтезагрязненных почв (Дагуров и соавт., 2005; Park et al., 2011; Kuráň et al., 2014).

Целью работы было разработать и испытать новые биокомпозитные материалы на основе биодеградируемых синтетических сорбентов – носителей прикрепленного биоценоза УОМ, и геля на основе силанольных производных гуминовых веществ. В работе были исследованы свойства новых биокомпозитов – выживаемость включенных в них УОМ разных видов при длительном хранении в провокационных условиях, т.е. условиях, провоцирующих быструю гибель клеток (комнатная

температура 18–24°C, доступ воздуха), эффективность деструкции нефти.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе были использованы бактерии из коллекции культур лаборатории нефтяной микробиологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, способные к окислению углеводородов: грамотрицательные *Acinetobacter seifertii* WS1, *Pseudomonas extremaustralis* WS-1, *P. aeruginosa* OIS 4.8.1, грамположительные *Rhodococcus qingshengii* 367-6 (бывший *R. erytropolis*), *Dietzia maris* 367-2, а также дрожжи *Yarrowia lipolytica* 367-2.

Условия культивирования. Культуры выращивали на среде LB (Miller) ("Sigma-Aldrich") в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды при 28–30°C на орбитальной качалке (100 об./мин) в течение 24–40 ч до стационарной фазы роста.

Микрокапсулы из полимочевины синтезированы по технологии, описанной ранее (Lia et al., 2015) с модификациями (Заявка на изобретение РФ № 2020136378). Синтез основан на межфазной реакции преполимера полимочевины, полиизоцианата (Wannate PM-200, "Вирареактив", Россия), растворенного в смеси дихлорметана/дихлорфторэтана (2 : 1) и полиаминов триэтилентетрамина/этилендиамина (3 : 1). Процесс получения микрокапсулированного препарата включает этапы: 1) подготовка раствора преполимера полимочевины – полиизоцианата; 2) подготовка водного раствора эмульгатора (TWIN 80–поливиниловый спирт–лаурилсульфат натрия 1 : 1 : 0.2); 3) приготовление эмульсии МК; 4) отверждение полимера; 5) удаление галогенуглерода.

Для получения биоразлагаемых МК на стадии 4 в смесь вводили химически совместимые с технологией межфазной полимеризации природные биоразлагаемые полимеры – белок желатин и полисахарид хитозан. Эти соединения содержат свободные аминогруппы, позволяющие вводить их в состав полимера. Использовали хитозан (низкомолекулярный хитозан с молекулярной массой в диапазоне 1–30 кДа, степень дезацетилирования 75–95%) – 25% от массы отвердителя (ЗАО "Биопрогресс", Россия) и желатин (свиной желатин кислотной выделки, прочность студня 180 bloom ("Weishardt Int.", Франция)), в количестве 20% от массы отвердителя (полиаминов).

Полученные МК имели диаметр 40–200 мкм, в среднем 80–100 мкм. Средняя площадь поверхности оболочек микрокапсул составляла 0.054 $м^2$/г. Определение осуществляли с применением электронного сканирующего микроскопа.

Микрокапсулы из полимолочной кислоты (ПМК) или полигликолевой кислоты (ПГК) получали по модифицированной методике (Daiguji et al., 2009) в четыре стадии. 1 – приготовление 5% раствора одного из полимеров в дихлорметане и эмульгатора (Твин-80 и поливиниловый спирт, 1 : 1) в воде; 2 – механическое эмульгирование растворов ПМК или ПГК в водном растворе эмульгаторов в течение 10 мин с перемешиванием при 3000 об./мин, основная реакция – в течение 4 ч при 35°C до получения размера микрокапель 0.05–0.5 мм; 3 – создание повышенного давления воздуха над микроэмульсией (более 300 кПа). Воздух при этом растворяется в каплях и растворе. Последующее уменьшение давления в сосуде до атмосферного давления, приводит к появлению микропузырьков в каплях, и в растворе. 4 – после перехода хлористого метилена в водный раствор поливинилового спирта происходит сжатие капель и формирование полых микрокапсул из ПМК или ПГК.

Полученный препарат МК представляет собой 10–15%-ю водную суспензию капсул диаметром 25–100 мкм, в среднем 80 мкм.

Гель из силанольных производных гуминовых веществ (СПГВ) получали из гумата калия и натрия Powhumus ("Humintech", Германия) и органосилана 3-аминопропилтриэтоксисилан (АПТЭС) ("АГМ-9", ООО "Пента 91", Россия) по описанной ранее методике с модификациями (Volikov et al., 2016b). К раствору гуматов (15%) добавляли 5% (об./об.) АПТЭС при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке, после чего титровали раствором ледяной уксусной кислоты до pH 6–7. Полученную смесь оставляли при комнатной температуре. В течение 2–12 ч происходило загустевание (желирование) реакционной смеси. В итоге формировалась силсесквиоксановая трехмерная структура, матрица, к которой присоединялись полианионы гумата посредством ионных связей. Полученный гель был однородным, обладал умеренными прочностными свойствами – не вытекал из пробирок при их переворачивании, сохранял свои свойства в течение нескольких месяцев, при добавлении воды и интенсивном перемешивании растворялся.

Иммобилизация микроорганизмов. Для иммобилизации микроорганизмов использовали два подхода: 1) микрокапсулы вносили вместе с инокулятом микроорганизмов в количестве 1.5–3 г/л и инкубировали вместе с растущими бактериями, как описано выше, до стационарной фазы роста, после чего оставляли стоять при комнатной температуре на несколько месяцев в стационарном режиме. 2) Для иммобилизации в толще геля суспензию клеток смешивали с композицией гуматов и АПТЭС после ее нейтрализации в отношении 0.4–0.5 : 1, разливали по пробиркам типа Эппендорф (1.5 мл) или Фалькон (15 мл) и оставляли до формирования геля, после чего хранили в течение нескольких месяцев при комнатной темпера-

туре (18–24°C) и доступе воздуха, т.е. в условиях, неоптимальных для хранения культур ("провокационных" для отмирания, моделирующих одни из реальные условиях хранения культур, часто встречающиеся в практике).

Оценка жизнеспособности микроорганизмов. О жизнеспособности микроорганизмов судили по двум критериям: 1) по титру жизнеспособных клеток (КОЕ/мл), определяемому микрометодом – путем высева десятичных разведений культур на плотную среду LB, а также 2) по дыхательной активности культуры, определяемой по скорости накопления CO_2 в герметически закрытом флаконе. В этом случае скорость генерации CO_2 прямо пропорциональна количеству выживших клеток. Для определения эмиссии CO_2 инокулят – культуру стационарной фазы роста, или культуры, хранившиеся в течение определенного времени, вносили во флакон объемом 500 мл с 40 мл стерильной среды Раймонда (г/л): $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.01; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.02; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.01; Na_2HPO_4 – 1.5; KH_2PO_4 – 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2; NH_4NO_3 – 1.0; NaCl – 5.0; pH 6.8–7.2. Объем инокулята – 3% от объема среды. После стабилизации уровня CO_2 в газовой фазе (через 4 ч инкубации) во флакон вносили раствор 0.5 мл 10% раствора глюкозы. Концентрацию CO_2 в газовой фазе определяли в течение нескольких суток на газовом хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000 (ЗАО СКБ "Хроматэк", Россия).

О способности бактерий разлагать углеводороды нефти также судили по накоплению CO_2 в двух системах: в жидкой среде и в почвенных микрокосмах.

В закрытые флаконы объемом 120 мл, содержащие 10 мл жидкой среды Раймонда добавляли источник углерода – нефть Черемуховского месторождения (Республика Татарстан) плотностью 0.9 г/см^3 в количестве 2 об. % и инокулят микроорганизмов в объеме 200 мкл (600 мкл для культур в СПГВ-геле, т.к. при его приготовлении культура разбавлялась в 3 раза). Флаконы инкубировали при температуре 30°C на качалке (100 об./мин) в течение 10 сут. Объем среды и количество вносимого субстрата рассчитаны таким образом, чтобы в замкнутом пространстве не создавалось условий лимитирования для окисления нефтепродукта. Периодически из флаконов с помощью шприца отбирали пробы воздуха (0.4 мл), в которых определяли концентрацию CO_2 на газовом хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000 (ЗАО СКБ "Хроматэк", Россия). Для расчета эмиссии CO_2, образовавшегося при деструкции нефтепродуктов, из суммарного объема CO_2 вычитали концентрацию углекислого газа, образовавшегося в вариантах без внесения нефти, только за счет субстратов, вносимых с инокулятом (материал микрокапсул, геля, автолизаты клеток, остатки среды).

Почвенные микрокосмы создавали во флаконах объемом 15 мл с завинчивающейся крышкой. Во флаконы вносили 5 г почвы, чернозема типичного, верхнего, темно-гумусового горизонта (AU1), отобранного летом 2019 г. в Воронежской области, (заказник "Каменная степь", Россия). В почву добавляли 10% (по весу) нефти. Почву увлажняли, добавляя 1 мл стерильной дистиллированной воды. Испытуемые биопрепараты на основе *R. qingshengii* 367-6 добавляли в количестве 100 мкл: свежевыращенная культура на среде LB как положительный контроль, такая же культура, хранившаяся в течение 4 мес. (предположительно – отрицательный контроль), такая же культура, стабилизированная добавлением МК из ПМХ, ПМК, или стабилизированная включением в СГГ. В последнем случае добавляли 300 мкл биопрепарата, т.к. при приготовлении этого БКМ культура была разбавлена в 3 раза. Флаконы оставляли при комнатной температуре на 30 сут под ватной пробкой, периодически увлажняя почву дистиллированной водой и встряхивая. Через 30 сут инкубации флаконы продували воздухом, герметично закрывали крышкой и определяли накопление CO_2 в течение 24 ч. Для расчета эмиссии CO_2, образовавшегося при деструкции нефтепродуктов, из суммарного объема CO_2 вычитали газ, образовавшийся на почве без внесения нефтепродукта. Концентрацию CO_2 определяли на газовом хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000 (ЗАО СКБ "Хроматэк", Россия). Время инкубации 30 сут было выбрано на основании предварительно проведенных исследований, показавших, что в микрокосмах наиболее активное окисление нефти проходит на 14–30 сут инкубации, а количество клеток УОБ максимально на 20–30 сут инкубации (данные не приводятся).

Об уровне адгезии микроорганизмов на поверхности МК судили при микроскопировании образцов с применением сканирующего электронного микроскопа. Образцы центрифугировали 5 мин при 7000 *g*, образовавшийся осадок дважды промывали 0.05 М фосфатным буфером (pH 7.0), поэтапно обезвоживали в растворах этилового спирта с возрастающей концентрацией (от 30 до 100%). Затем препараты дважды отмывали в 100% ацетоне и высушивали в критической точке. Полученные препараты просматривали в сканирующем электронном микроскопе TM-3000 ("Hitachi", Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ. Биопленки *A. sefertii* исследовали на растровом электронном микроскопе JSM-IT200 ("JEOL", Япония).

Статистическая обработка результатов. Все исследования выполнены в двух–трех биологических повторностях, по два параллельных эксперимента в каждом. При расчете титра КОЕ определяли сред-

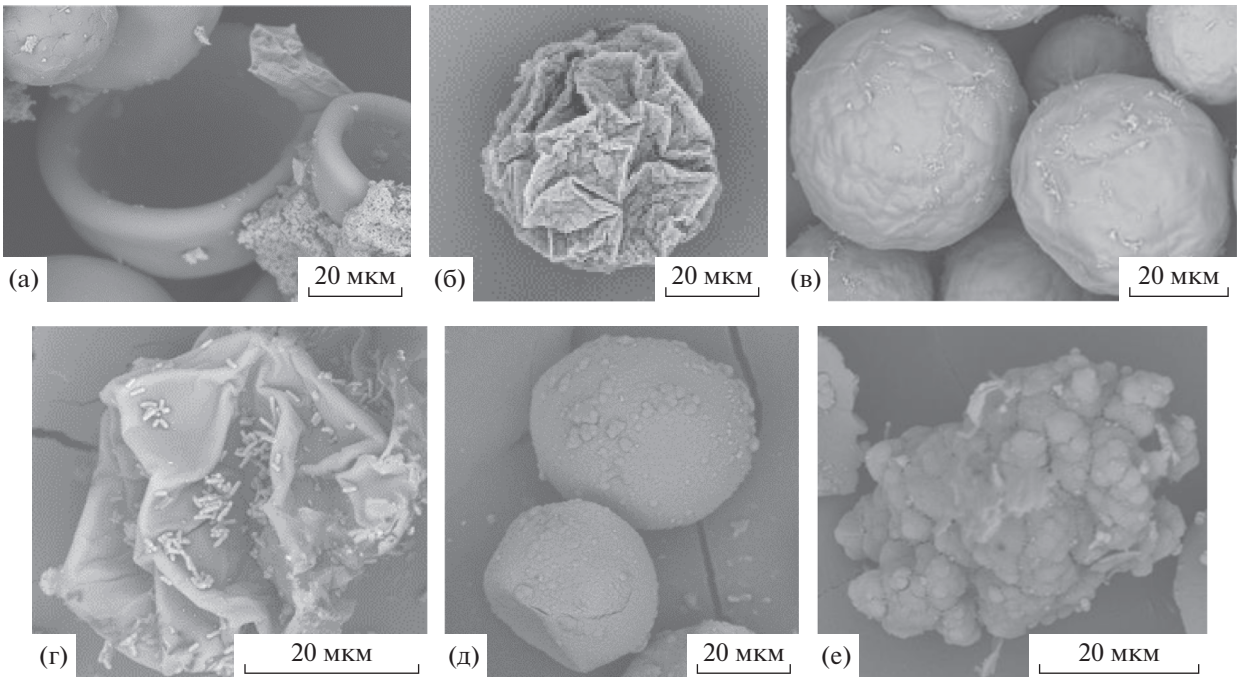


Рис. 1. Микрофотографии микрокапсул из немодифицированной полимочевины (а, б), полимочевины, модифицированной желатином (в), полимочевины, модифицированной хитозаном (г), полимолочной кислоты (д), полигликолевой кислоты (е).

нее арифметическое и экспериментальную ошибку (функция “среднее отклонение экспериментальных значений от среднего”) из 5–7 параллельных проб с использованием программы Microsoft Office Excell 2007. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали экспериментальную ошибку, обычно не превышающую 30% для экспериментов по определению КОЕ и 1.5% для экспериментов по определению концентрации CO_2. На рисунках представлены данные типичных экспериментов, в таблицах – средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках задачи по стабилизации жидких препаратов УОМ мы исходили из того, что стабилизированные биопрепараты должны обладать совокупностью свойств, благоприятных для их применения при биоремедиации от нефтезагрязнений: высоким титром живых клеток, хорошими реологическими свойствами, нетребовательностью к условиям хранения, обусловливать высокую дисперсность биокатализатора (клеток) при внесении в природный объект. Эти качества учитывали при выборе способов формирования стабилизированных биопрепаратов УОМ.

Геометрические свойства микрокапсул. Микрокапсулы из немодифицированной и модифицированной полимочевины имели сферическую форму диаметром 40–100 мкм. В зависимости от условий получения МК из немодифицированной полимочевины представлены двумя морфотипами – полусферами с гладкой поверхностью (рис. 1а), сморщенными сферами, с соотношением “глубина/поперечник углублений” ≥1 (рис. 1б). Если полимочевина была модифицирована желатином, МК имели округлую форму с волнистой поверхностью, отношение “глубина/диаметр” углублений было меньше 0.5 (рис. 1в). МК из полимочевины, модифицированной хитозаном, представлены сморщенными сферами, отношение “глубина/поперечник углублений” ≥1 (рис. 1г).

МК из полимолочной кислоты (ПМК) представлены слегка сморщенными тонкостенными сферами, сформированными из микросфер полимера, имеют размер 25–100 мкм (рис. 1д). Инвагинации стенок МК выражены слабо. Поверхность МК сформирована мелкими шариками ПМК. Эти МК являются умеренно гидрофобными, т.к. легко и полностью диспергируются в масле, и медленно – в воде, при этом эмульсия стабильна в течение длительного времени. МК из полигликолевой кислоты (ПГК) представлены сморщенными сферами, поверхность бугристая, сформирована из мелких слипшихся микросфер полимера, много капсул с трещинами (рис. 1е).

Иммобилизация клеток на/в новые носители. Выращивание культур УОМ с микрокапсулами всех типов выявило различную степень адгезии

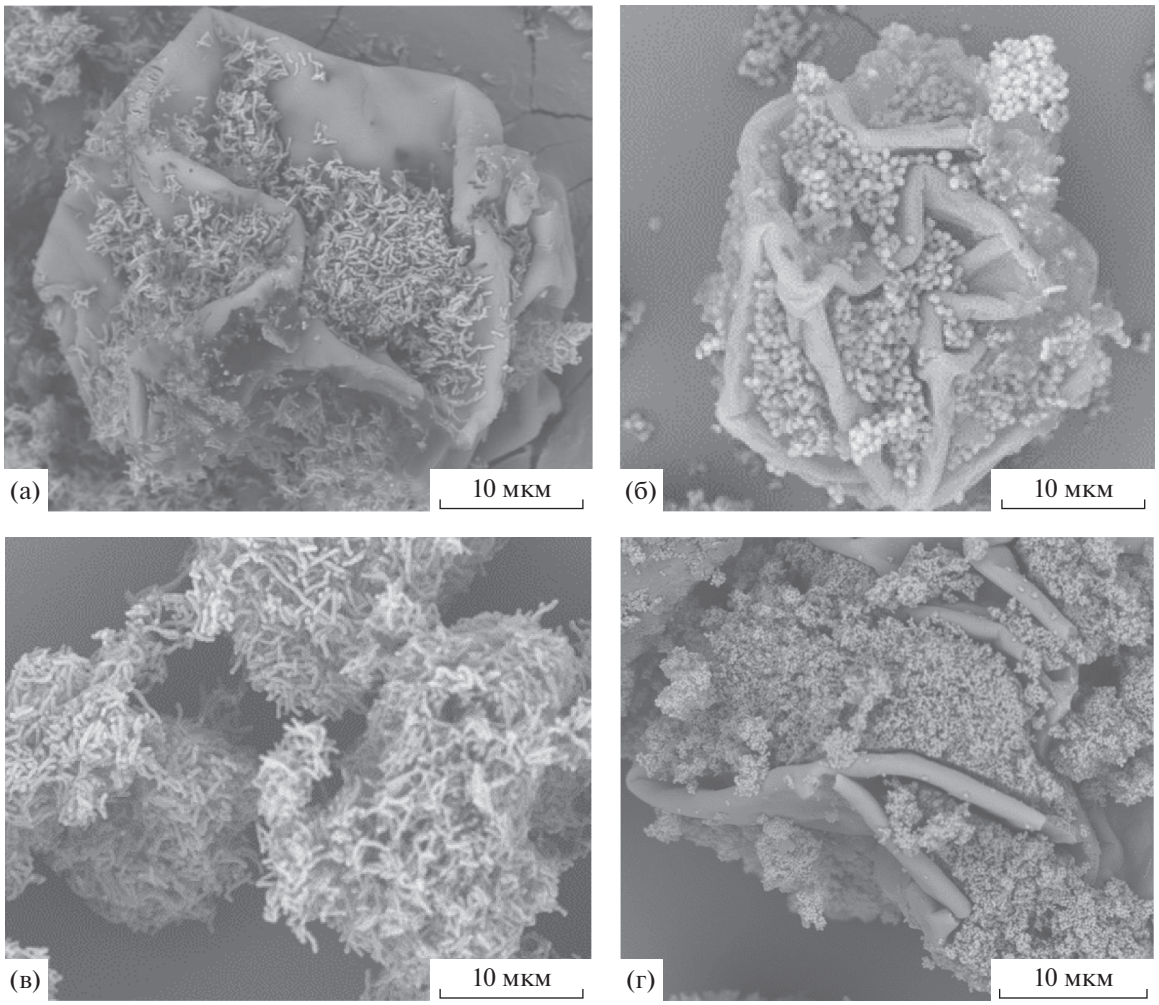


Рис. 2. Микрофотографии микрокапсул из полимочевины, модифицированной хитозаном, инкубированных в течение 48 ч (а, б) с культурами бактерий *R. qingshengii* (а, в) и *A. seifertii* (б, г), и хранившихся в течение 3 мес. (в, г).

клеток на поверхности МК. УОМ в минимальной степени сорбировались на МК из немодифицированной и модифицированной желатином полимочевины, а также на МК из ПГК (данные не приведены). Адгезия всех испытанных УОМ была максимально выражена на МК из полимочевины, модифицированной хитозаном (МК ПМХ) (рис. 2) и на МК из ПМК (рис. 3).

На рис. 2 представлены микрофотографии МК ПМХ после 48 ч культивирования с культурами *R. qingshengii* (а) и *A. seifertii* (б). Для остальных УОМ адгезия аналогично обильная. Основная часть прикрепленных клеток располагалась в складках МК ПМХ, что свидетельствует о невысокой прочности прикрепления. Невысокая прочность прикрепления клеток также подтверждается тем, что при интенсивном встряхивании (Вортекс, 1 мин) клетки смываются с поверхности, что позволяет определять титр КОЕ методом десятичных разведений. На приведенных фото видно, что большая часть прикрепленных клеток объединена в агрегаты, соответствующие стадии начала формирования биопленкок. Морфологически клетки соответствуют клеткам стационарной фазы роста.

Добавление МК ПМХ к растущим культурам не изменяло скорости дыхания популяции в целом, о чем свидетельствует отсутствие влияния МК на накопление CO_2 по сравнению с культурами без МК (данные не приведены). При этом в присутствии МК урожай клеток был в 2–5 раз больше (по КОЕ), чем в контроле, что объясняется переходом клеток в биопленочное состояние, при котором клетки находятся в состоянии с пониженной скоростью роста и не подвергаются автолизу. Это позволяет на исходно одинаковом количестве субстрата нарасти большему количеству клеток.

Через 3 мес. хранения культур УОМ, выросших с МК ПМХ, микроскопическая картина существенно не изменилась. Все МК были покры-

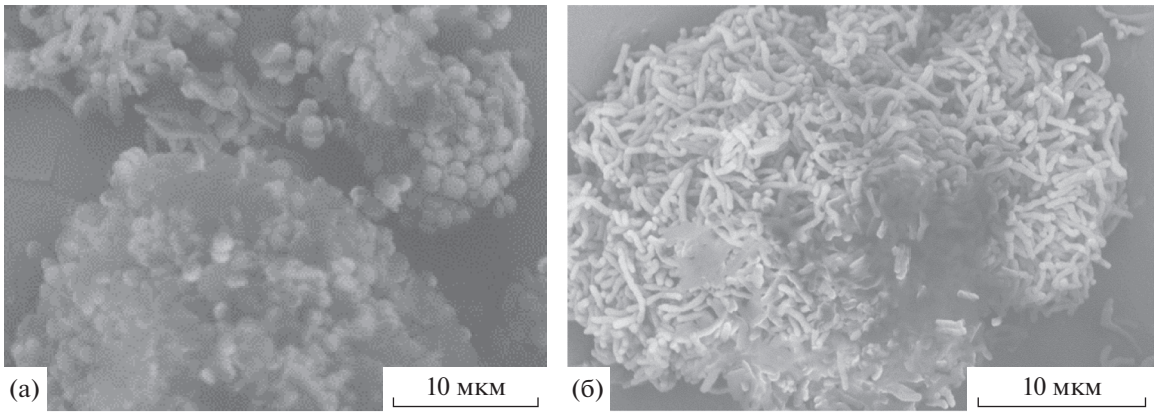


Рис. 3. Электронные микрофотографии МК из ПМК после инкубации в течение 2 сут (а) и 2 недель (б) с культурой *R. qingshengii*.

ты клетками УОМ, и даже в большей степени, чем двухсуточные культуры. При этом клетки стали более короткими, что соответствует старым культурам, отдельные клетки в их скоплениях просматриваются хуже, что указывает на развитие матрикса, что особенно выражено для *A. seifertii* (рис. 2г).

Выведение части клеток из состояния планктонного роста и их переход в состояние биопленочного роста обусловило нарастание большего количества клеток – в 2–5 раз, чем в отсутствие МК (табл. 1). Переход в состояние биопленки приводит к замедлению скорости роста, и на одном и том же количестве исходного субстрата может нарасти большее количество биомассы (Dorofeev, Panikov, 1998; Lipson, 2015). Способствовать накоплению большего количества микроорганизмов также могли еще два фактора – сорбция метаболитов, ингибирующих рост культур в стационарной фазе, а также использование хитозана как дополнительного источника углерода (Beier, Bertilsson, 2013; Sawaguchi et al., 2015). Аналогичный эффект наращивания большей биомассы микроорганизмов в присутствии сорбентов описан в работе Ларионова и соавт. (2011).

Адгезия *R. erytropolis* на МК из ПМК также весьма обильна (рис. 3). Клетки 2-сут культуры имеют укороченную палочковидную или коккоидную форму, что характерно для стационарной культуры. Вне МК присутствуют агрегаты клеток родококка. Через 2 недели целых МК практически не наблюдается, фрагменты МК полностью покрыты толстым слоем клеток микроорганизмов. Морфология клеток (длинные палочки) соответствует растущим клеткам. Такая картина объясняется активным гидролизом материала МК, ПМК, гидролазами микроорганизмов, разрушением МК и пролиферацией клеток культуры. Типичную картину биопленочного роста можно наблюдать для грамотрицательных бактерий *A. seifertii* и *P. aeruginosa* (рис. 4а и 4б соответственно). Клетки погружены в обильный матрикс, едва различимы, при этом видно, что они имеют укороченную форму, соответствующую медленно растущей или стационарной культуре.

Таким образом, можно заключить, что МК ПМК являются дополнительным источником углерода и энергии для микроорганизмов, и, таким образом, могут быть использованы для их стабилизации при хранении.

Для иммобилизации клеток УОБ в гель из СПГВ выращенные до стационарной фазы культуры смешивали со свежеприготовленным гелем и оставляли до застывания. Включение клеток в гель приводило к снижению их титра КОЕ в 2–8 раз (рис. 8) по причине токсичности одного из компонентов геля, АПТЭС, пока он не полимеризовался. Однако микроскопически все клетки выглядели как клетки культур стационарной фазы роста, лизированных клеток обнаружено не было (рис. 5). После 4 мес. пребывания в геле картина существенно менялась: наряду с вегетативными клетками появлялись покоящиеся клетки, выявляемые по наличию утолщенных клеточных стенок и/или наличию кристаллизованного компактизованного нуклеоида (рис. 5). Вокруг некоторых вегетативных клеток можно видеть полимерный матрикс (рис. 5г) или микровезикулы (рис. 5в), что характерно для биопленочного фенотипа.

Жизнеспособность УОМ при длительном хранении. Иммобилизация клеток УОМ на поверхности МК из ПМХ существенно сказалась на количестве и жизнеспособности клеток при хранении при комнатной температуре в стационарных условиях (табл. 1). Культуры, выращенные в присутствии МК из ПМХ, содержали в 2–4.5 раза больше клеток, чем в контроле (табл. 1). Возрастание титра КОЕ произошло из-за того, что переход в состояние биопленки приводит к замедле-

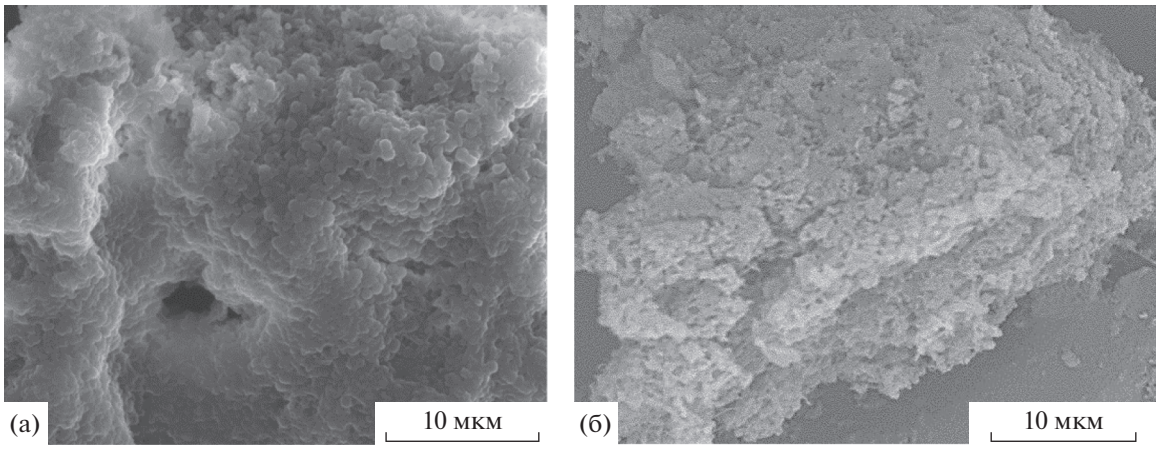


Рис. 4. Электронная микрофотография МК из ПМК после инкубации в течение 9 мес. с культурой *A. seifertii* (а) и в течение 4 мес. с культурой *P. aeruginosa* (б).

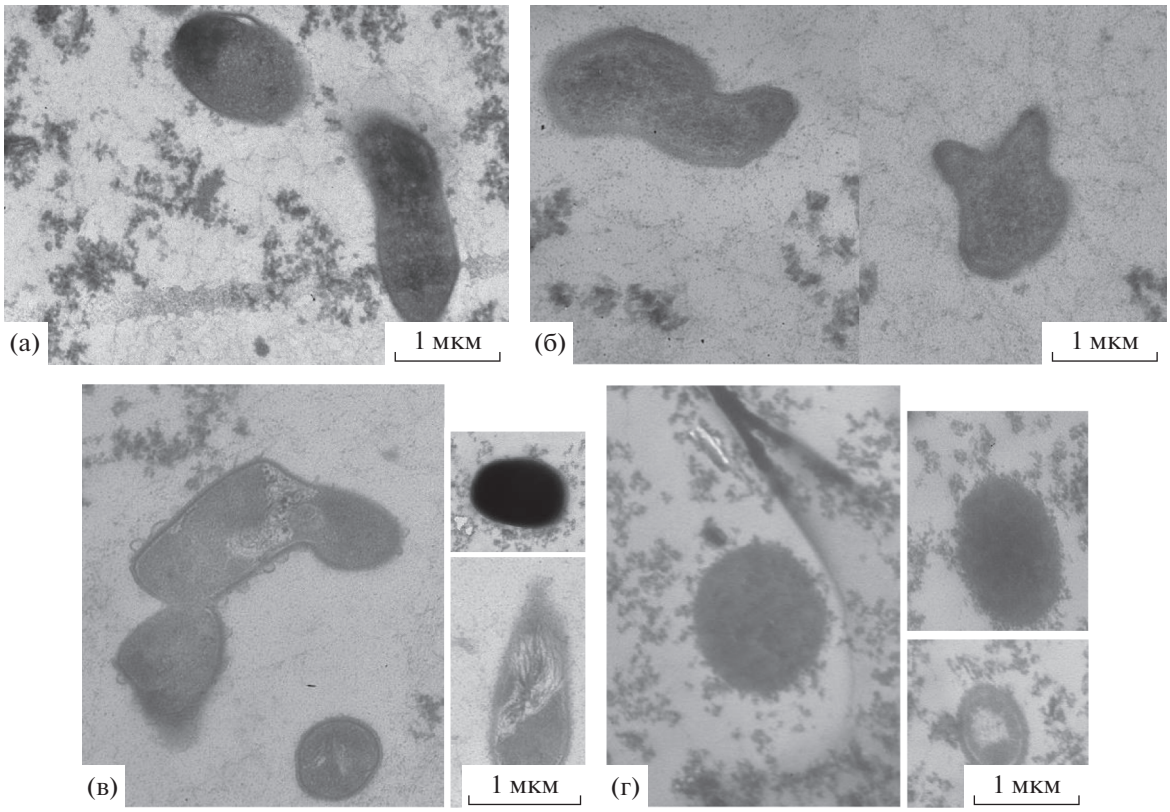


Рис. 5. Электронно-микроскопические фотографии клеток *R. qingshengii* (а, в) и *A. seifertii* (б, г) сразу после включения в гель из СПГВ (а, б) и после хранения в течение 4 мес. (в, г). На рис. (в) и (г) слева – вегетативные клетки, справа – разные типы покоящихся форм: с уплотненной цитоплазмой и утолщенной клеточной стенкой (верх) и кристаллизованным компактизованным нуклеоидом (низ).

нию скорости роста, что сделало возможным нарастание большего количества биомассы на одном и том же количестве субстрата. Во всех вариантах экспериментов, включая контрольные, с течением времени хранения культур происходило снижение численности микроорганизмов на один (*R. qingshengii*) – три порядка (остальные культуры) за 200 сут. Однако численность микроорганизмов конце указанного срока хранения в вариантах с МК из ПМХ была выше, чем в контроле, в несколько раз. Очевидно, что иммобилизация на МК повышала количество клеток УОМ

относительно контрольного варианта при неблагоприятных условиях хранения.

Определять число жизнеспособных клеток на поверхности МК ПМК методом десятикратных разведений сложно, т.к. клетки образуют агрегаты из десятков и сотен клеток, часто включенных в густой матрикс. В варианте с *R. qingshengii*, который хорошо диспергируется, после хранения в течение 30 сут титр КОЕ культуры, выращенной в присутствии МК, был на 3 порядка выше относительно контроля (рис. 6). Для *P. aeruginosa* эффект МК ПМК методом десятикратных разведений не выявляется из-за формирования обильного матрикса (рис. 3).

Поэтому количество метаболически активных клеток было оценено косвенно – по скорости дыхания культур, хранившихся в течение одинакового времени с или без добавления МК из ПМК. В этом случае скорость генерации CO_2 прямо пропорциональна количеству выживших клеток.

На рис. 7 представлены данные по скорости дыхания культур *R. qingshengii* и *P. aeruginosa* в ответ на добавление глюкозы. Тест на физиологическую активность культур после 30 сут хранения подтвердил высокую эффективность применения МК из ПМК, более выраженную для родококка. Для *R. qingshengii* дыхательная активность культуры, хранившейся 30 сут в присутствии МК ПМК, всего лишь в 2 раза ниже, чем свежевыращенной культуры, и в 8 раз выше, чем контрольной культуры. Для *P. aeruginosa* наличие МК ПМК привело к 5-кратному превышению дыхательной активности 30-суточной культуры по сравнению с контрольной без МК.

Сопоставление результатов определения титра жизнеспособных клеток, их дыхательной активности и микрофотографий культур *R. qingshengii* и *P. aeruginosa*, позволяет заключить, что делать выводы о влиянии того или иного фактора на сохранение жизнеспособности культур необходимо с учетом всей совокупности данных. Так, в случае биопленочного развития культур метод десятикратных разведений дает заниженные результаты (*P. aeruginosa*), и для оценки количества метаболически активных клеток необходимо оценивать потенциальную дыхательную активность. При этом дыхательная активность дает заниженную оценку количества жизнеспособных клеток, как в случае *R. qingshengii*. Этот феномен имеет место вследствие гетерогенности длительно хранящихся культур. В то время как часть клеток имеет неглубокую степень покоя, и они сразу начинают дышать, другие клетки оживают только через несколько часов нахождения на богатой среде, и метод традиционного определения КОЕ дает большее количество жизнеспособных клеток.

Включение четырех видов УОМ (*R. qingshengii*, *A. seifertii*, *P. aeruginosa*, *P. extremaustralis*) и одного дрожжевого организма (*Y. lipolytica*) в гель на основе СПГВ приводило к существенному повышению титра КОЕ при длительном хранении культур относительно контроля (рис. 8). При этом было выявлено, что компоненты геля (очевидно, свободный АПТЭС до полимеризации) могут быть токсичными для микроорганизмов. Для *R. qingshengii* и *Y. lypolytica* сразу после формирования геля титр КОЕ был ниже контрольного в 5 раз, для *P. aeruginosa* – в 2 раза, для *A. seifertii* – на 10%. Однако выжившие клетки не отмирали в течение нескольких месяцев, в отличие от контрольных вариантов. Наблюдали рост культур УОМ и увеличение численности КОЕ до 4-х раз в течение первых двух месяцев. После двух месяцев хранения *Y. lypolytica* наблюдали увеличение численности популяции – более, чем на 1 порядок за 4 мес. Во всех случаях микроорганизмы, бактерии и дрожжи, сохранялись лучше в геле, чем в контрольном варианте. Через 2–12 мес. хранения в геле количество клеток было выше, чем в контроле, на 1–2 порядка. Такое необычное для культур отсутствие отмирания будет исследовано отдельно, однако можно предположить, что росту и длительному выживанию культур способствовало наличие в среде ис-

Таблица 1. Титр жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) культур УОМ, выращенных в присутствии МК из ПМХ на среде LB через разные промежутки времени (сут) относительно нестабилизированного контроля в процентах

	Время хранения (сут)			
	0	60	90	200
P. aeruginosa	209	338	238	232
R. qingshengii	185	436	579	182
A. seifertii	476	212	293	6250
D. maris	165	264	304	178

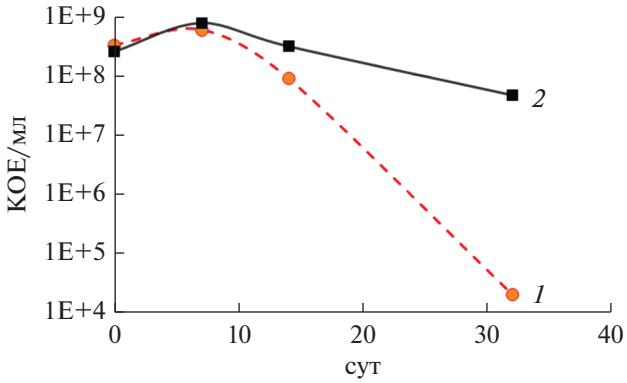


Рис. 6. Динамика КОЕ *R. qingshengii* в присутствии МК ПМК. *1* – нестабилизированный контроль. *2* – в присутствии МК ПМК.

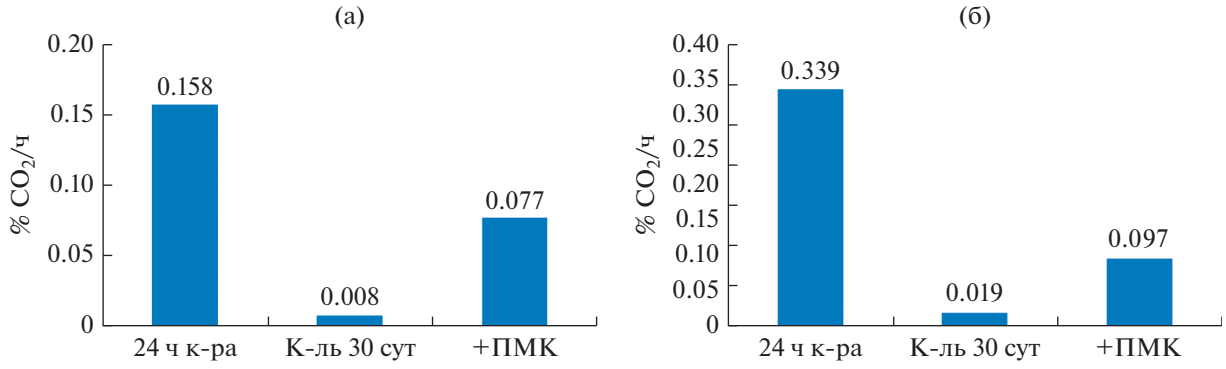


Рис. 7. Дыхательная активность *R. qingshengii* (а) и *P. aeruginosa* (б), выращенных в присутствии МК ПМК и через 30 сут хранения.

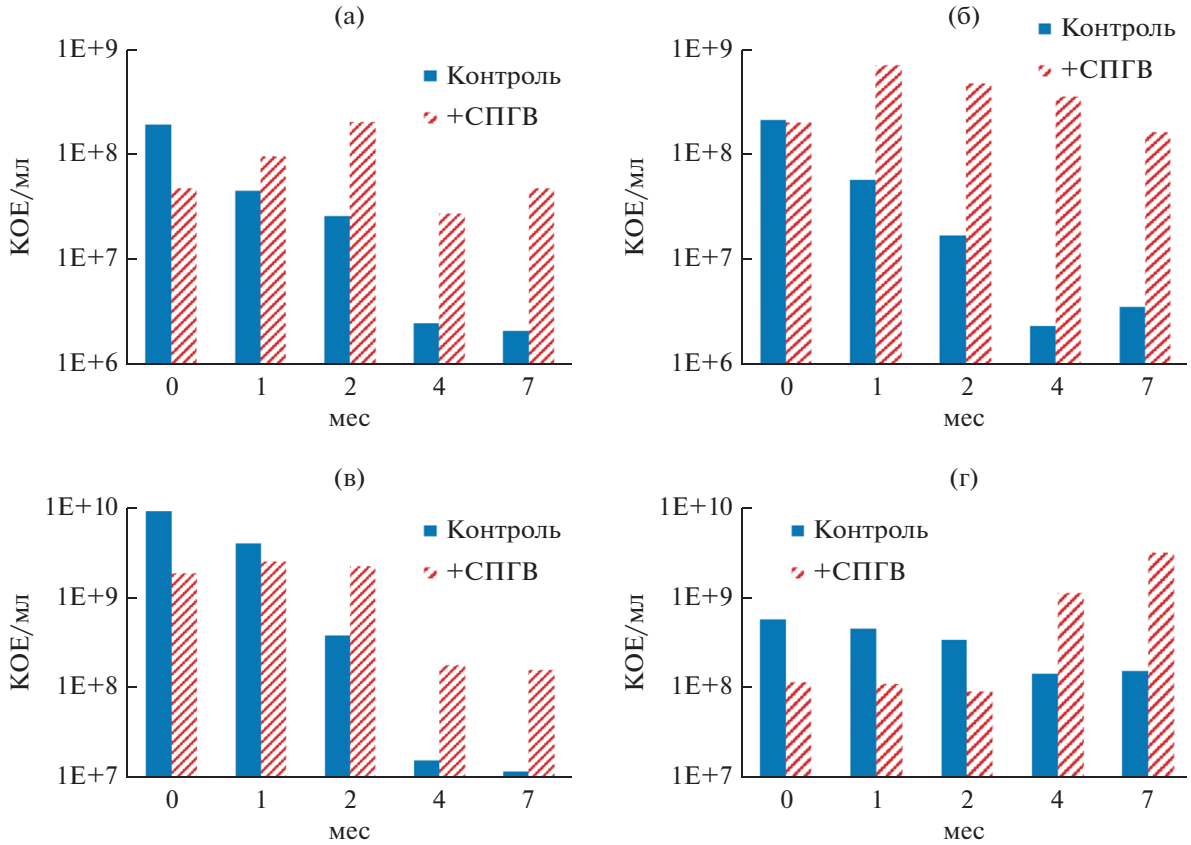


Рис. 8. Влияние иммобилизации клеток УОМ и дрожжей в гель из СПГВ на их выживание при хранении: (а) – *R. qingshengii;* (б) – *A. seifertii*; (в) – *P. aeruginosa*; (г) – *Y. lypolytica*.

точников питания – ацетата и этанола (который образуется в результате полимеризации АПТС с гуматами).

Деструкция нефти новыми биокомпозитными материалами в жидкой среде и почве. На последнем этапе работы было необходимо оценить, насколько пригодны разработанные подходы к стабилизации культур УОМ (поддержанию титра жизнеспособных клеток при длительном хранении), для использования в прикладном аспекте – в технологиях биоремедиации природных объектов (вод и почв) от нефтепродуктов.

На рис. 9 представлены динамики накопления CO_2 культурой *R. qingshengii* при росте на жидкой среде с нефтью в качестве единственного источника углерода.

Все культуры *R. qingshengii* начинали окислять углеводороды нефти с задержкой на 3 сут, что связано с необходимостью подготовки их метаболического аппарата (индукции ферментов окисления углеводородов), поскольку они были выращены на среде LB. В присутствии СПГВГ скорость эмиссии CO_2 (пропорциональная скорости деструкции нефтепродуктов) начиналась с максимальной скоростью 0.134% CO_2/ч (рис. 9). Скорость деструкции нефтепродуктов 24-часовыми и 4-месячными культурами была в 3 раза ниже (0.04% CO_2/ч). Интересно отметить, что в случае 4-месячной культуры наблюдали увеличение скорости деструкции нефтепродукта относительно молодой культуры, что обусловлено большей фенотипической гетерогенностью популяции, вырастающей из покоящихся клеток, и появлению клонов, способных к деструкции углеводородов более успешно, чем доминировавший в исходной популяции вариант, как это было продемонстрировано ранее (Solyanikova et al., 2011; Ivshina et al., 2015; Соляникова и соавт., 2017; Егозарьян и соавт., 2017). Неожиданно низкой оказалась эффективность окисления нефти культурой в присутствии МК из полимочевины и хитозана, поскольку выше было продемонстрировано более высокое содержание жизнеспособных клеток в таких препаратах относительно контроля (табл. 1). Очевидно, для эффективной деструкции нерастворимого субстрата важна степень дисперсности биокатализатора, микроорганизмов. В данном эксперименте специальной десорбции клеток с поверхности МК не проводили, в итоге окисление нефти происходило в гетерофазной (трехфазной) системе “нефть–жидкость–микрокапсулы”, и затрудненный контакт нефти и клеток обусловил низкую скорость процесса. При использовании препарата с СПГВ, напротив, создавались условия, благоприятные для окисления нефти: вследствие растворения геля все клетки находились в суспендированном состоянии, их титр был высок, доступ к каплям нефти был максимален. Кроме того, гуматы, входящие в состав СПГВ обладают свойствами поверхностно-активных веществ (Дагуров и соавт., 2005; Park et al., 2011; Kuráň et al., 2014). В их присутствии нефть легче образовывала эмульсию, что также способствовало повышению скорости деструкции углеводородов. Подтверждением является активность еще одного варианта сравнения – культура *R. qingshengii*, выращенная в тех же условиях (среда LB) и хранившаяся в присутствии гумата Powhumus, что приводит к повышению титра КОЕ культур относительно контроля в ходе длительного хранения, как это описано ранее (Николаев и соавт., 2019) (кривая *5* на рис. 9). Скорость деструкции нефти этим препаратом сопоставима с таковой у молодой культуры.

Финальной проверкой эффективности биопрепаратов, стабилизированных с применением

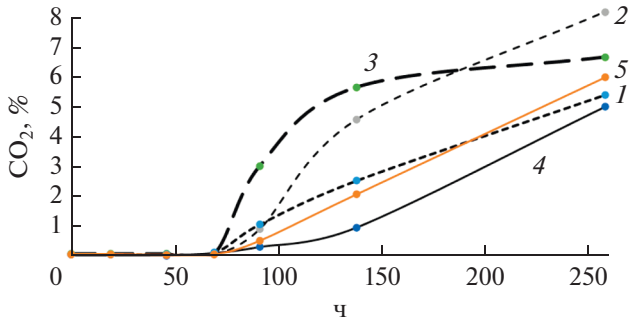


Рис. 9. Динамика накопления CO_2 культурами *R. qingshengii*, хранившимися в течении 4 мес., на среде с нефтью. Цифрами обозначены: *1* – культура возрастом 24 ч; *2* – культура без добавок, хранившаяся 4 мес.; *3* – культура, хранившаяся 4 мес. в присутствии СПГВ; *4* – культура, хранившаяся 4 мес. в присутствии МК ПМХ; *5* – культура, хранившаяся 4 мес. в присутствии 1.5% гумата Powhumus.

новых подходов, была проверка ускорять деструкцию нефти на нестерильной почве, что наиболее близко к реальным условиям биоремедиации. На рис. 10 представлена скорость эмиссии CO_2 из микрокосмов чернозема, содержащего 10% нефти, образующегося за счет окисления нефти. Величины эмиссии CO_2 для каждого варианта получены путем вычитания скорости эмиссии CO_2 почвой без нефти из величины эмиссии этого газа в варианте, где почва загрязнена нефтью, т.е. где окисляется как органическое вещество почвы, так и нефть. Наибольшую активность, как и на жидкой среде, обнаружила культура, стабилизированная с применением СПГВ – скорость эмиссии CO_2 была в 3.5 раза выше, чем в контрольной культуре того же возраста, в 8 раз выше, чем 24-ч культурой. Скорость деструкции нефти контрольной культурой 4-месячного возраста была выше, чем свежевыращенной культурой почти в 2 раза. Добавление гумата (1.5 г/л) обусловило большую сохранность клеток (Николаев и соавт., 2019) и, поэтому, – повышение скорости окисления нефтепродуктов. Как и при росте на жидкой среде, агрегация клеток в хранившихся биопрепаратах, даже при условии их большей выживаемости, не обеспечивала более высоких скоростей деструкции нефти относительно контрольного варианта, хранившегося то же время. При этом препарат, в котором клетки находились в составе более плотной биопленки, сформированной на МК из полимолочной кислоты, обнаружил минимальную активность по деструкции нефти.

На основании полученных результатов можно заключить, что созданы новые биокомпозитные материалы, микрокапсулы из полимочевины с хитозаном, микрокапсулы из полимолочной кислоты, силанольно-гуминовый гель, которые повышают выживаемость клеток, иммобилизованных

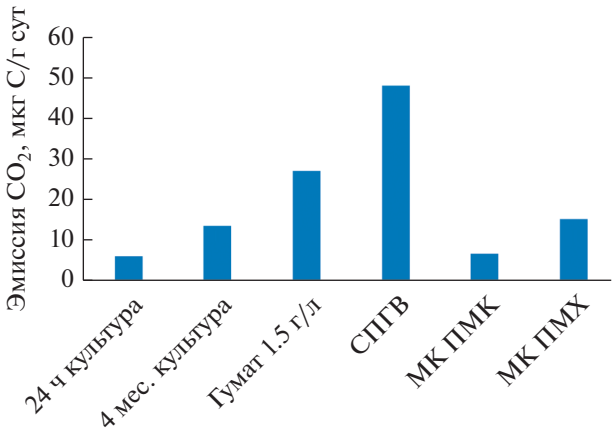


Рис. 10. Суточная эмиссия CO_2 культурой *R. qingshengii*, хранившейся в течении 4 мес. в разных условиях, в почвенных микрокосмах с нефтью после 30 сут инкубации.

с их применением в 2–1000 раз относительно контроля. Однако функциональные свойства новых биокомпозитов определяются не только содержанием жизнеспособных клеток, но также способностью клеток к диспергированию в условиях применения, расширенным диссоциативным фенотипическим спектром популяции, вырастающей из биопрепарата, а также наличием дополнительных функций – способностью служить источником углерода и энергии для микроорганизмов, обладать поверхностно-активными и сорбционными свойствами. Наилучшей комбинацией таких свойств обладают биокомпозиты на основе силанольных производных гуминовых веществ и УОМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-05009/18 и, частично, госзадания Минобрнауки РФ для ФИЦ Биотехнологии РАН и гранта РНФ № 21-14-00076.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть электронно-микроскопических исследований выполнена на оборудовании, приобретенном в рамках Программы развития Московского государственного университета до 2020 года.

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

Дагуров А.В. Стом Д.И., Вятчина О.Ф., Балаян А.Э., Кушнарев Д.Ф. О механизме антидотного действия гуматов по отношению к нефтепродуктам. // Acta Biomedica Scientifica. 2005. Т. 6. № 44. С. 143–145.

Егозарьян Н.С., Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Емельянова Е.В., Поливцева В.Н., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И., Головлёва Л.А. Покоящиеся клетки актинобактерий как основа стабильных препаратов для биоремедиации // IX Международный конгресс “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. Москва, 2017. С. 434–436.

Заявка на изобретение. Россия. 2020. № 2020136378. Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Близнец И.В., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Иванова А.Е., Канапацкий Т.А., Эль-Регистан Г.И. Способ получения биопрепаратов живых микроорганизмов с продленным сроком сохранения высокого титра жизнеспособных клеток.

Ларионов И.В., Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Потокин И.Л., Сушко Т.П., Хрущева Т.А., Болдырев А.Г. Адсорбция пробиотических бактерий на целлюлозных сорбентах // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т. 11. С. 792–798.

Николаев Ю.А., Демкина Е.В., Перминова И.В., Лойко Н.Г., Борзенков И.А., Иванова А.Е., Константинов А.И., Эль-Регистан Г.И. Роль гуминовых веществ в пролонгировании жизнеспособности клеток углеводородокисляющих бактерий // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 725–729.
https://doi.org/10.1134/S0026365619060120

Nikolaev Y.A., Demkina E.V., Loiko N.G., Borzenkov I.A., Ivanona A.E., El’-Registan G.I., Perminova I.V., Konstantinov A.I. Role of humic compounds in viability prolongation of the cells of hydrocarbon-oxidizing bacteria // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 764–768.

Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Атрощик Е.А., Константинов А.И., Перминова И.В., Эль-Регистан Г.И. Функциональная активность гуминовых веществ в пролонгировании выживания популяции углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter junii* // Микробиология. 2020. Т. 89. № 1. С. 74–87.

Nikolaev Y.A., Loiko N.G., Demkina E.V., El’-Registan G.I., Konstantinov A.I., Perminova I.V., Atroshchik E.A. Functional activity of humic substances in survival prolongation of populations of hydrocarbon-oxidizing bacteria *Acinetobacter junii* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 74–85.

Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Егозарьян Н.С., Поливцева В.Н., Мулюкин А.Л., Егорова Д.О., Эль-Регистан Г.И., Головлёва Л.А. Особенности структурно-функциональных перестроек клеток актинобактерий BN52 при переходе от вегетативного роста в состояние покоя и при прорастании покоящихся форм // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 463–475.

Solyanikova I.P., Suzina N.E., Egozarjan N.S., Polivtseva V.N., Golovleva L.A., Mulyukin A.L., El-Registan G.I., Egorova D.O. Structural and functional rearrangements in the cells of actinobacteria *Microbacterium foliorum* BN52 during transition from vegetative growth to a dormant state and during germination of dormant forms // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 476–486.

Benita S. Microencapsulation. Methods and Industrial Application. 2nd ed. CRC Press, 2005.

Beier S., Bertilsson S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies // Fron. Microbiol. 2013. V. 4. Art. 149.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149

Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering / Eds. Tayebi L., Moharamzadeh K. Woodhead Publ., 2018. P. 542.

Chen A.Y., Zhong C., Lu T.K. Engineering living functional materials // ACS Synth. Biol. 2015. V. 4. P. 8–11.
https://doi.org/10.1021/sb500113b

Daiguji H., Takada S., Jay J., Cornejo M., Takemura F. Fabrication of hollow poly(lactic acid) microcapsules from microbubble templates // J. Phys. Chem. 2009. V. 113. P. 15002–15009.
https://doi.org/10.1021/jp9053956

Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants // Biotechnol. Res. Int. 2011. V. 2011. Art. 941810.
https://doi.org/10.4061/2011/941810

Dorofeev A.G., Panikov N.S. Growth effectivity of microorganisms of different ecological strategies at steady-state conditions // Microbiology. 1988. V. 57. Iss. 4. P. 963–973.

Dzionek A., Wojcieszyńska D., Guzik U. Natural carriers in bioremediation // Electr. J. Biotechnol. 2016. V. 23. P. 28–36.

Iqba H.M.N., Keshavarz T. The challenge of biocompatibility evaluation of biocomposites // Biomed. Composit. (2nd ed.). Woodhead Publishing Series in Biomaterials. 2017. P. 303–334.

Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. P. 307–314.

Qi X., Ren Y., Wang X. New advances in the biodegradation of poly(lactic) acid // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2017. V. 117. P. 215–223.
https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.010

Kuran P., Trögl J., Nováková J., Pilařová V., Dáňová P., Pavlorková J., Kozler J., Novák F., Popelka J. Biodegradation of spilled diesel fuel in agricultural soil. Effect of humates, zeolite, and bioaugmentation // Sci. World J. 2014. V. 2014. Art. 642427.
https://doi.org/10.1155/2014/642427

Lipson D.A. The complex relationship between microbial growth rate and yield and its implications for ecosystem processes // Frontiers in Microbiology. 2015. V. 6. P. 615. DOI=10.3389/fmicb.2015.00615

Liu S., Xu W. Engineered living materials-based sensing and actuation // Front. Sens. 2020. 1:586300.
https://doi.org/10.3389/fsens.2020.586300

Lupu S., Balaure P.C., Lete C., Mihailciuc C. Biocomposite nanomaterials for electrochemical biosensors // Handbook of Nanoelectrochemistry / Eds. Aliofkhazraei M., Makhlouf A. Springer, Cham. 2015.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-15207-3_39-1

Martens R., Domsch K.H. Microbial degradation of polyurethane foams and isocyanate based polyureas in different media // Water Air Soil Pollut. 1981. V. 15. P. 503–509.
https://doi.org/10.1007/BF00279430

Mitropoulouet G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production // J. Nutrit. Metabolism. 2013. V. 2013. Art. 716861.
https://doi.org/10.1155/2013/716861

Opara E.C. Cell Microencapsulation. Methods and Protocol. Springer Science + Business Media. New York, 2017.

Park S., Kim K.S., Kim J.-T., Kang D., Sung K. Effects of humic acid on phytodegradation of petroleum hydrocarbons in soil simultaneously contaminated with heavy metals // J. Environ. Sci. 2011. V. 23. P. 2034–2041.

Pilla S. Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications. John Wiley and Sons, 2011. P. 620.

Rudin A., Choi Ph. Biopolymers. The Elements of Polymer Science & Engineering. 3rd ed. Academic Press, 2013. Ch. 13. P. 521–535.

Sakurai D., Cornejo J.J.M., Daiguji H., Takemura F. Hollow polylactic acid microcapsules fabricated by gas/oil/water and bubble template methods // J. Mater. Chem. A. 2013. V. 46. P. 14562–14568.

Sihag S., Pathak H., Jaroli D. Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons // Int. J. Pure App. Biosci. 2014. V. 2. P. 185–202.

Sears N.A., Pena-Galea G., Cereceres S.N., Cosgriff-Hernandez E. Hybrid polyurea elastomers with enzymatic degradation and tunable mechanical properties // J. Tissue Eng. 2016. V. 7. Art. 2041731416679363.
https://doi.org/10.1177/2041731416679363

Lia Sh.-Sh., Hana H., Zhua X.-L., Jianga X.-B., Konga X.Zh. Preparation and formation mechanism of porous polyurea by reaction of toluene diisocyanate with water and its application as adsorbent for anionic dye removal chinese // J. Polym. Sci. 2015. V. 33. P. 1196–1210.

Sawaguchi A., Ono S., Oomura M., Inami K., Kumeta Y., Honda K., Sameshima-Saito R., Sakamoto K., Ando A., Saito A. Chitosan degradation and associated changes in bacterial community structures in two contrasting soils // Soil Sci. Plant Nutrit. 2015. V. 61. P. 471–480.
https://doi.org/10.1080/00380768.2014.1003965

Solyanikova I.P., Suzina N.E., Golovleva L.A., Mulyukin A.L., El-Registan G.I. Improved xenobiotic-degrading activity of *Rhodococcus opacus* strain 1cp after dormancy // J. Environ. Sci. Health. Part B: Pesticides. Food Contaminants and Agricultural Wastes. 2011. V. 46. P. 638–647.

Tang D., Chen Z., Correa-Netto F., Macosko C.W., Hillmyer M.A., Zhang G. Poly(urea ester): A family of biodegradable polymers with high melting temperatures // J. Polym. Sci. Part A: Polymer Chemistry. 2016. V. 54. P. 3795–3799.
https://doi.org/10.1002/pola.28355

Volikov A.B., Ponomarenko S.A., Konstantinov A.I., Hatfield K., Perminova I.V. Silanized humic substances act as hydrophobic modifiers of soil separates inducing formation of water-stable aggregates in soils // Catena. 2016a. V. 137. P. 229–236.

Volikov A.B., Ponomarenko S.A., Gutsche A., Nirschl H., Hatfield K., Perminova. I.V. Targeted design of water-based humic substances-silsesquioxane soft materials for nature-inspired remedial // RSC Advances. 2016b. V. 6. P. 48222–48230.

New Biocomposite Materials Based on Hydrocarbon-Oxidizing Microorganisms and Their Potential for Oil Products Degradation

Yu. A. Nikovaev[1, *], I. A. Borzenkov[1], E. V. Demkina[1], N. G. Loiko[1], T. A. Kanapatskii[1], I. V. Perminova[2], A. N. Khreptugova[2], N. V. Grigor'eva[1], I. V. Bliznets[4], N. A. Manucharova[3], V. V. Sorokin[1], M. A. Kovalenko[3], and G. I. El'-Registan[1]

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

[2]*Chemical Faculty, Moscow State University, Moscow, 119191 Russia*

[3]*Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119191 Russia*

[4]*BNT Company (MSU Science and technology Park), Moscow Russia*

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

Received July 7, 2021; revised July 18, 2021; accepted July 21, 2021

Abstract—Increasing the stability of biopreparations with hydrocarbon-oxidizing bacteria (HOB), which are used for bioremediation of oil-contaminated environmental objects, is presently an important task. In the present work, new biocomposite materials were developed for HOB immobilization on the surface of microcapsules (MC) from: pure and chitosan- or gelatin-modified polyurea; polylactic and polyglycolic acids; and cell incorporation into the gels of humic acids silanol derivatives. The tested organisms used were gram-negative HOB *Acinetobacter seifertii* WS1, *Pseudomonas extremaustralis* WS-1, *P. aeruginosa* OIS 4.8.1, gram-positive bacteria *Rhodococcus qingshengii* 367-6, and *Dietzia maris* 367-2, as well as yeasts *Yarrowia lipolytica* 367-2. HOB cultivation in liquid media with chitosan-polyurea-based MCs (but not MCs of pure or gelatin-modified polyurea) resulted in viable cell numbers (CFU/mL) 2–5 times higher than in the control (without MCs) both in freshly grown cultures and in those stored at room temperature under access to air for a long time (up to 7 months). HOB cultivation together with polylactic acid MCs resulted in active surface growth. Surface growth was less pronounced in the variants with polyglycolic MC, as was confirmed microscopically. Survival of the *R. qingshengii* grown in the presence of polylactide MCs after storage for 1 month was three orders of magnitude higher than in the control (without MCs). HOB immobilization in the gels of humate silanol derivatives was the most efficient approach, which resulted in CFU titers up to 100 times higher than in the control variant after storage for 7–12 months; respiration rates were also higher than in the control. The biopreparations with HOB immobilized in new biocomposite materials had high oil-oxidizing activity both in liquid media and oil-contaminated soil microcosms. After 4-month storage at room temperature, the rate of oil oxidation by these biopreparations was 2 to 4 times higher than in the control. The practically important features of new biocomposite materials are: prolonged HOB cell viability in the course of long-term storage (up to 12 months); homogeneity of the cultures at the time of application; and presence of additional growth substrates, which may be used for hydrocarbon co-oxidation.

Keywords: hydrocarbon-oxidizing microorganisms, biocomposite materials, microcapsules, silanol-humine gel, long-term storage, oil degradation

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 706–717

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МИКРООРГАНИЗМЫ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ, ДЕГРАДИРУЮЩИЕ НЕФТЬ И ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИЕ АРОМАТИЧЕСКИЕ УГЛЕВОДОРОДЫ[1]

© 2021 г. Н. А. Манучарова[a], *, М. А. Большакова[a], Т. Л. Бабич[b], Т. П. Турова[b], Е. М. Семенова[b], А. С. Янович[a], А. Б. Полтараус[c], А. Л. Степанов[a], Т. Н. Назина[b]

[a] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия*

[b] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия*

[c] *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия*

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

Поступила в редакцию 08.07.2021 г.
После доработки 21.07.2021 г.
Принята к публикации 25.07.2021 г.

В настоящей работе определено филогенетическое и функциональное разнообразие микроорганизмов образцов дерново-подзолистой почвы, загрязненной и незагрязненной углеводородами, и урбостратозема. Методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК показано, что в исследованных образцах почв преобладали бактерии филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Acidobacteria*. Наибольшей потенциальной функциональной активностью в преобразовании соединений азота, деградации хлоралканов, хлоралкенов и бензоата обладали бактерии родов *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* и *Pseudolabrys* в образцах дерново-подзолистой почвы и бактерии родов *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas* и *Streptomyces* – в образцах урбостратозема. Из нефтезагрязненных почв были выделены штаммы *Stenotrophomonas maltophilia*, деградирующие нефть, нефтепродукты и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) (фенантрен, антрацен и пирен). Микроорганизмы дерново-подзолистой почвы в условиях микрокосма эффективно деградировали разные компоненты нафтено-метановой и метано-нафтеновой нефти. Количество ароматических компонентов нафтено-метановой нефти, деградированных микробным сообществом почвы, и сообществом, обогащенным штаммом *S. maltophilia* П420в, было практически одинаковым, однако в варианте с биоаугментацией процесс деградации этих компонентов протекал на 14 сут быстрее. Обогащение почвы целевыми деструкторами ПАУ и ароматических соединений может быть целесообразным для почв северных регионов с низкой продолжительностью летнего периода, загрязненных нефтью с высоким содержанием ароматических и асфальто-смолистых соединений.

Ключевые слова: нефтезагрязненная почва, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, прокариоты,функциональноеразнообразие,микрокосмы,биоаугментация,полициклическиеароматические углеводороды (ПАУ), *Stenotrophomonas*

DOI: 10.31857/S0026365621060094

Поступление органического углерода нефти в почвы приводит к увеличению содержания алканов, битуминозных веществ, ароматических соединений и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и сопровождается тяжелыми экологическими последствиями (Atlas, 1981). Изменяются физико-механические, агрохимические и продукционные свойства почвы, гибнут растения, почвы становятся непригодными для хозяйственного использования. Некоторые нефти обладают бластомогенным и канцерогенным действием. Обычно наиболее загрязненными оказываются верхние слои почвенного профиля, что приводит к снижению водо- и воздухопроницаемости почвы.

Дерново-подзолистые и подзолистые почвы составляют основной фон почвенного покрова России и занимают 15 и 26% площади соответственно. Нефть и нефтепродукты являются основными загрязняющими веществами для почв этого типа. Биоразлагаемость компонентов нефти обычно снижается в ряду: *н*-алканы > алканы с разветвленной цепью > разветвленные алкены > > низкомолекулярные ароматические соединения с *н*-алкильной цепью > моноароматические соединения > циклические алканы > полицикли-

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365621060094 для авторизованных пользователей.

ческие ароматические углеводороды (ПАУ) > асфальтены (van Hamme et al., 2003). Для биоремедиации загрязненных нефтепродуктами почв широко используются биотехнологии биостимуляции и биоаугментации (Tyagi et al., 2011). Биостимуляция включает внесение источников азота, фосфора, калия, акцепторов электронов и воды для стимуляции активности автохтонного микробного сообщества, тогда как биоаугментация предполагает внесение экзогенных микроорганизмов для увеличения активности целевой группы. Часто оба метода используются одновременно. Показано, что деградация нефти происходит под воздействием почвенных микробных сообществ вследствие "самоочищающей способности" почв (Sutton et al., 2013). Наименее подвержены биодеструкции асфальто-смолистые компоненты нефти (Wang et al., 2016), которые могут накапливаться в поверхностных горизонтах почвы и ухудшать ее свойства. В этой связи необходим поиск микроорганизмов, эффективно деградирующих нефть и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Для более полной очистки экосистем от нефтяных загрязнений необходимо использовать микроорганизмы, способные осуществлять биодеградацию разных компонентов нефти. В обзоре (Tyagi et al., 2011) рассмотрены преимущества и ограничения метода биоаугментации на примере ряда лабораторных и полевых испытаний.

В лабораторном эксперименте консорциум бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Brevibacillus* и *Staphylococcus*, полученных из высокозагрязненных почв, деградировал до 60% нефтяного загрязнения почвы (Samarghandi et al., 2018). В полевом эксперименте по очистке загрязненных нефтью почв (Poi et al., 2017) был успешно использован консорциум из 22 видов, принадлежащих, главным образом, к родам *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Внесение биопрепарата, включающего 4 штамма бактерий родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* и дрожжи *Candida* sp., в почву, загрязненную 60 $м^3$ нефти, приводило к 78.8% снижению содержания нефти (Сидоров и соавт., 1997). Использование в технологии биоаугментации бактериальных и грибных культур, приспособленных к условиям почвы и нефтяного загрязнения, имеет несомненные преимущества перед внесением микроорганизмов из других местообитаний (Eriksson et al., 1999).

Целью настоящей работы было определение филогенетического и функционального разнообразия микроорганизмов образцов дерново-подзолистой почвы, загрязненной и не загрязненной углеводородами, выделение чистых культур, деградирующих полициклические ароматические углеводороды и нефтепродукты, и оценка влияния бактерий рода *Stenotrophomonas* на биодеградацию нефти микрокосмами почв.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами микробиологических исследований были образцы гумусового горизонта (А) дерново-подзолистой постагрогенной оподзоленной глинисто-иллювиированной почвы (по классификации Шишова и соавт., 2004) или, соответственно, Umbric Luvisol (Классификация IUSS Working group..., 2014), отобранные с участка, расположенного в пределах городской черты и части пригородных территорий г. Электроугли (Московская обл.). Образцы почв S1 и S2 отбирали по мере удаления от "Электроуглинского завода технического углерода, ЗАО" на расстоянии 0.3 км (завод) (55.728016, 38.217825) и 12 км (фон) (55.724371, 38.387340) соответственно. Территория исследования находилась в течение длительного времени под техногенным воздействием, вызванным функционированием завода по производству технического углерода из графита, сажи и каменноугольной смолы. Загрязняющие вещества поступали из этого источника через атмосферу на большую часть территории. В пределах промышленной зоны и вблизи нее присутствует также большое количество твердого материала, представленного различными отходами производства, в том числе углеводородсодержащими веществами (Геннадиев и соавт., 2015). Для сравнения исследовали образцы урбостратозема песчаного (S3), отобранного в г. Москве (Манучарова и соавт., 2017), дерново-среднеподзолистой почвы (S4), отобранной на почвенном стационаре в Чашниково (Солнечногорский район, Московской обл.), а также загрязненные нефтью (S5, S6, S420 и S417) образцы почв, отобранные на территории залежи 302 Ромашкинского нефтяного месторождения (г. Лениногорск, Татарстан).

Состав сред и условия культивирования. Для выделения микроорганизмов, деградирующих ПАУ и нефтепродукты, готовили почвенную суспензию в стерильной воде (1 : 10), которую использовали для засева сред с разными органическими субстратами. Специальных методов десорбции микроорганизмов с почвенных частиц не применяли. Минеральная среда включала (г/л): K_2HPO_4 – 1.5; KH_2PO_4 – 0.75; $(NH_4)_2SO_4$ – 0.05; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.01; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ – 0.0005; $FeSO_4 \cdot 7H_20$ – 0.0055. Субстраты вносили в среду в следующих концентрациях: предельные углеводороды (тетрадекан ($C_{14}H_{30}$), гексадекан ($C_{16}H_{34}$)), нефть, нефтяные масла – 2 об. %, сахара, пептон – 2–5 г/л, спирты – 5 мл/л. Полициклические ароматические углеводороды (пирен, фенантрен, аценафтен, флуорен), а также бифенил растворяли в ацетоне и вносили в жидкую среду в концентрации 50 мг/л, в течение суток среду оставляли при комнатной температуре для испарения ацетона и затем засевали почвенной суспензией или полученными чистыми культурами бактерий. По-

севы инкубировали в стационарных условиях при температуре 20–23°C в течение 14 сут. Чистые культуры аэробных бактерий, использующих ПАУ, были выделены из накопительных культур методом последовательных пересевов с жидких сред на соответствующие плотные среды, содержащие 15 г агар-агара/л. Процедуру выделения из единичных колоний повторяли трижды. Чистоту культур контролировали микроскопическим методом и посредством анализа гена 16S рРНК колоний, полученных на плотной среде. Физиологические свойства штаммов, содержание Г + Ц в ДНК и ДНК–ДНК сходство определяли, как описано ранее (Nazina et al., 2001).

Биодеградация нефти и ПАУ почвенными микрокосмами. Навески почвы (S4) в воздушно-сухом состоянии массой по 20 г помещали в чашки Петри. Нефть растворяли в гексане в пропорции 1 : 25 (вес/вес, %), после чего раскапывали в каждую чашку из расчета 200 мг нефти на 20 г почвы, охватывая всю поверхность почвы. Источники NPK не вносили. Смесь пирена и фенантрена в соотношении 1 : 2 (вес/вес, %) также растворяли в гексане и вносили из расчета 5 мг пирена и 10 мг фенантрена на 1 чашку. Чашки Петри с почвой и внесенными углеводородами выдерживали 2 сут в термостате при 30°C для испарения гексана. Затем почвенный микрокосм инициировали увлажнением до 60% от предельной полевой влагоемкости (Воронин, 1986). В течение опыта влажность почвы поддерживали постоянной, для чего контролировали вес каждой чашки и доливали стерильную водопроводную воду по необходимости. Чашки Петри с почвой инкубировали при температуре 30°C. В работе использовали нафтено-метановую нефть, отобранную на Ромашкинском месторождении (пласт $Д_0$), и метано-нафтеновую нефть Хыльчуюского месторождения (пласт Р2). Характеристика нефти приведена в таблице S1 (Геология и разработка..., 1996).

Биоаугментация почвы углеводородокисляющими бактериями. Штамм *Stenotrophomonas maltophilia* П420в, выделенный из загрязненной нефтью почвы Ромашкинского месторождения, наращивали на плотной среде с пептоном, затем делали смыв клеток и вносили в почву из расчета 1×10^7 кл./г почвы.

Аналитические методы. Прирост биомассы чистых культур при росте на жидких средах оценивали по величине оптической плотности (OD_{590}). Для определения концентрации ПАУ в почве и в жидкой среде, ПАУ экстрагировали хлороформом, пробу высушивали, растворяли в 5 мл гексана и оценивали спектрофотометрически изменение концентрации. Изменение ароматической фракции в составе нефти также определяли спектрофотометрически при длине волны 254 нм (Dark, 1982). Состав предельных углеводородов нефти определяли на хроматографе “Кристалл 5000.1” (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и 15-м капиллярной колонкой Zebron ZB-FFAP. Газом-носителем служил гелий. Температура колонки в ходе анализа возрастала от 100 до 320°C со скоростью нагрева 5°C/мин. Количественную расшифровку хроматограмм производили по методу внутренней нормализации, рассчитывая содержание каждого алкана в относительных весовых процентах. Индекс K_i, который является показателем биодеградации нефти, рассчитывали по формуле:

$$K_i = (i\text{-}C_{19} + i\text{-}C_{20})/(н\text{-}C_{17} + н\text{-}C_{18}).$$

Он отражает отношение суммы наиболее показательных изопренанов – пристана и фитана, к сумме нормальных насыщенных *н*-алканов – гептадекана и октадекана. По мере биодеградации нефти индекс K_i увеличивается. Остаточное содержание нефти в почве определяли весовым методом после экстракции углеводородов из навески почвы горячим гексадеканом в аппарате Сокслета (Современные методы..., 1984). Все варианты опыта проводили в трех повторностях для каждого времени инкубации.

Методы идентификации чистых культур и определения состава микробного сообщества почв. Чистые культуры бактерий были идентифицированы методом анализа гена 16S рРНК с праймерами 8–27f/1492r (Lane, 1991). Филогенетический анализ последовательностей гена 16S рРНК выделенных штаммов проводили с использованием программы BLAST сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Филогенетическое разнообразие прокариот (бактерий и архей) в исследованных пробах почв определяли методом высокопроизводительного секвенирования ампликонов V3–V4 участка гена 16S рРНК и последующей биоинформатической обработки полученных данных.

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование генов 16S рРНК прокариот. ДНК выделяли из образцов почв S1, S2 и S3 с использованием набора для выделения Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные препараты ДНК были использованы для амплификации V3–V4 участка гена 16S рРНК прокариот методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с помощью вырожденных праймеров, комплементарных последовательностям, как бактерий, так и архей: PRK341F (CCTACGGGRBGCASCAG) и PRK806R (GGACTACYVGGGTATCTAAT). Полученные ПЦР-фрагменты очищали на колонках QIAquick согласно протоколу производителя. Каждый ПЦР-фрагмент растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера, полученного материала было достаточно для дальнейшего анализа. Нуклеотидные последова-

тельности вариабельных фрагментов генов 16S рРНК из образцов метагеномной ДНК определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования на полигеномном секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США).

Биоинформатический анализ. Полученные фрагменты гена 16S рРНК были обрезаны с использованием программ trimmomatic-0.36 по алгоритму SLIDINGWINDOW:4:15 (Bolger et al., 2014). Прямые и обратные прочтения объединяли программой SeqPrep (https://github.com/jstjohn/SeqPrep). Для обнаружения химер и демультиплексирования использовали фильтры QIIME (Caporaso et al., 2010). Полученные последовательности распределяли по операционным таксономическим единицам (OTE) с уровнем сходства более 97%. Полученные OTE идентифицировали с использованием баз данных QIIME, онлайн-ресурса SILVA (Quast et al., 2014; https://www.arb-silva.de/ ngs/) и Knomics Biota. Статистические подсчеты осуществляли с помощью Microsoft Excel. Онлайн-ресурс ClustVis (Metsalu, Vilo, 2015; https:// biit.cs.ut.ee/clustvis/) был использован для создания тепловых карт (heatmaps) членов сообщества на родовом уровне. OTE, идентифицированные с использованием онлайн-ресурса SILVA, использовали для предсказания функциональных характеристик бактериальных сообществ с использованием пакета программ iVikodak (Nagpal et al., 2019). Модуль Global Mapper этой программы на основании базы данных KEGG использовали для получения функциональных профилей, а Local Mapper – для прогнозирования индивидуальных профилей ферментов метаболизма азота, бензоата и полициклических ароматических углеводородов, представленных у бактерий исследуемых микробных сообществ. Тепловые карты функциональных профилей и ферментов, предсказанных для сообществ, были построены с использованием интернет-ресурса ClustVis (http://biit.cs.ut.ee/clustvis/, июнь 2021 г.).

Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК прокариотных сообществ образцов почвы депонированы в NCBI, BioProject PRJNA744753.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разнообразие и потенциальная функциональная активность микробных сообществ образцов почв. В библиотеках гена 16S рРНК прокариот из образцов дерново-подзолистой почвы, отобранной в районе расположения завода технического углерода (библиотека S1) и на расстоянии 12 км от него (библиотека S2), были выявлены последовательности представителей домена *Bacteria*; археи не были обнаружены. Оба сообщества имели большое сходство на уровне высших таксонов (рис. 1). В составе почвенных сообществ преобладали бактерии филумов *Proteobacteria* (53.1 и 42.0% от количества последовательностей в библиотеках S1 и S2 соответственно), *Acidobacteria* (19.0 и 25.8%), *Actinobacteria* (12.2 и 17.2%), *Gemmatimonadetes* (6.8 и 3.2%), *Bacteroidetes* (3.1 и 1.8%) и *Firmicutes* (1.5 и 2.1%). Последовательности бактерий филумов *Nitrospirae* (2.1%) и *Verrucomicrobia* (1.2%) были выявлены только в библиотеке S1, а *Chloroflexi* (5.8%) – в библиотеке S2. В образце урбостратозема S3 доля *Proteobacteria* была также высока и достигала 79.1%; второй по представленности группой были *Actinobacteria* (10.1%). В библиотеке S3 были выявлены последовательности архей (0.2%) филума *Nanoarchaeota*, принадлежащие некультивируемым *Candidatus* Woesearchaeota.

На родовом уровне в образцах S1 и S2 преобладали альфапротеобактерии рода *Sphingomonas* (34.7 и 43.7%) и некультивируемые *Acidobacteria* (13.3 и 13.9%) (рис. 2). Представители рода *Sphingomonas* распространены в различных местообитаниях, таких как почва, пресноводные и морские водоемы, воздух, песок пустыни, осадочные породы, растения и загрязненные тяжелыми металлами рудничные воды. Бактерии рода *Sphingomonas* обладают множественными функциями, включающими деградацию широкого ряда загрязнений окружающей среды (нефтепродуктов, ПАУ, хлорсодержащих углеводородов, тяжелых металлов, металлоорганических соединений и других) и образование полезных фитогормонов, таких как сфинган и геллановая камедь (Asaf et al., 2020). Отмечаются большие перспективы в использовании представителей рода *Sphingomonas* в экологических биотехнологиях.

В образце урбостратозема S3 преобладали протеобактерии родов *Brevundimonas* (39.1%) и *Stenotrophomonas* (25.0%) и актинобактерии рода *Streptomyces* (6.9%), известные способностью деградировать сложные органические компоненты гумусового комплекса, нефтепродукты, хлорсодержащие ароматические соединения и ПАУ (Mukherjee, Roy, 2016; Hocinat et al., 2020; Ray et al., 2021).

Результаты определения филогенетического разнообразия прокариот в образцах почв были проанализированы с помощью программного обеспечения iVikodak для оценки потенциальной функциональной активности микробных сообществ почв (Nagpal et al., 2019). С помощью модуля “Global Mapper” программы iVicodak было предсказано, что бактерии, входящие в сообщества, осуществляли основные пути метаболизма углеводов и энергетического метаболизма (рис. 3). Сообщество незагрязненной нефтью дерново-подзолистой почвы S2 обладало большей, по сравнению с сообществом загрязненной почвы S1, потенциальной способностью к осуществлению этих путей, а также путей метаболизма азота и серы, деградации ксенобиотиков, бензоата и связанных с ним путей деградации полицикличе-

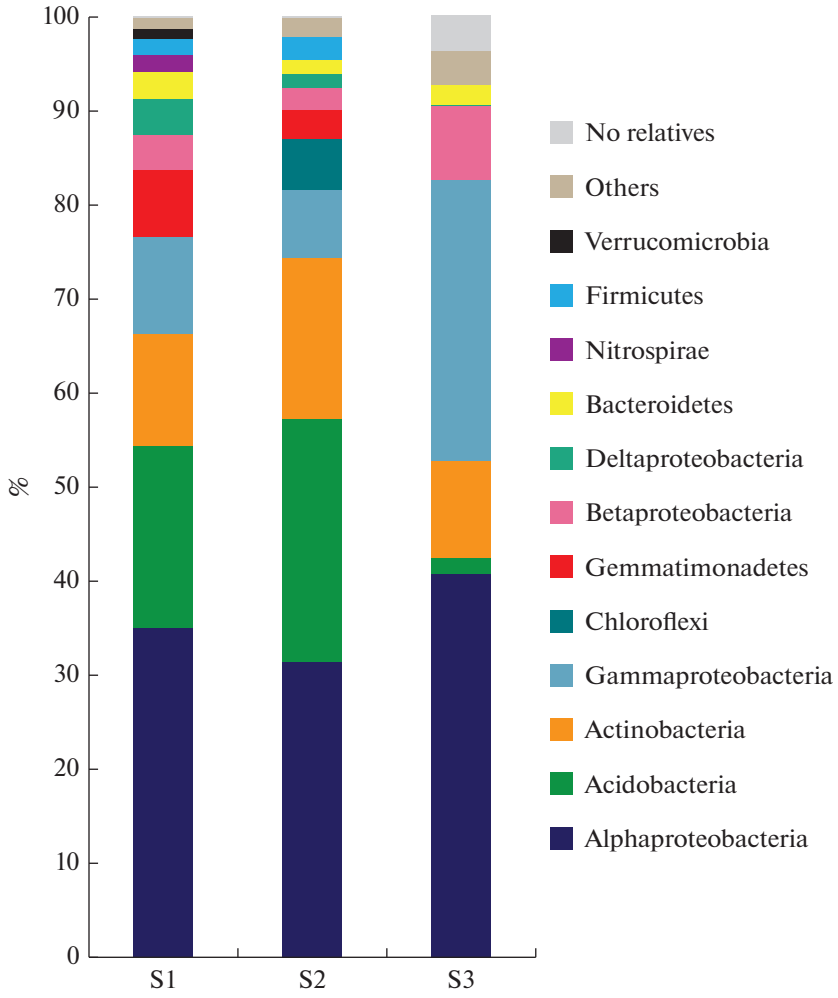


Рис. 1. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria*, представленных на уровне филумов/классов в библиотеках из образцов незагрязненной и загрязненной углеводородами почвы. Перечислены таксоны, составляющие >1% в каждой библиотеке.

ских ароматических углеводородов, аминобензоата, катехола и хлорсодержащих органических соединений.

Бензоат является центраболитом деградации многих ароматических углеводородов. В сообществах S1 и S2 присутствовали бактерии, обладающие двумя ключевыми ферментами пути аэробной деградации бензоата (“Benzoate degradation I”), бензоат-1,2-диоксигеназой (EC: 1.14.12.10) и дигидрооксициклогексадиен дегидрогеназой (EC: 1.3.1.25), которые катаболизируют бензоат до катехола (рис. S1а, S1б, доп. материалы). У бактериальных сообществ предсказано наличие всех ферментов катаболизма катехола, как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА. Кроме того, у бактерий обеих сообществ присутствовал фермент бензоат-КоА-лигаза (EC: 6.2.1.25), катализирующий превращение бензоата до бензоил-КоА – интермедиата биодеградации многих ароматических соединений. Однако ферменты пути анаэробной деградации бензоата через бензоил-КоА отсутствовали у исследуемых сообществ. В сообществах S1 и S2 за деградацию бензоата отвечали *Alphaproteobacteria* родов *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* и *Pseudolabrys* (рис. S2а, S2б, доп. материалы). Присутствующие в этих образцах почв бактерии осуществляли лишь единичные реакции превращений ПАУ (рис. S3а, S3б и S4а, S4б, доп. материалы).

У бактерий, входящих в S1 и S2 сообщества, было предсказано наличие ферментов комплекса “Метаболизм азота” участвующих в диссимиляционном восстановлении нитратов до молекулярного азота (собственно денитрификация) и нитратредукции с образованием аммония, а также в ассимиляционном восстановлении нитрата до аммония (рис. S5а, S5б, доп. материалы). Потенциальная представленность фермента нитратредуктазы (EC: 1.7.5.1), катализирущего восстановление нитрата до нитрита в процессах денитрификации и диссимиляционной нитратредукции, была сравни-

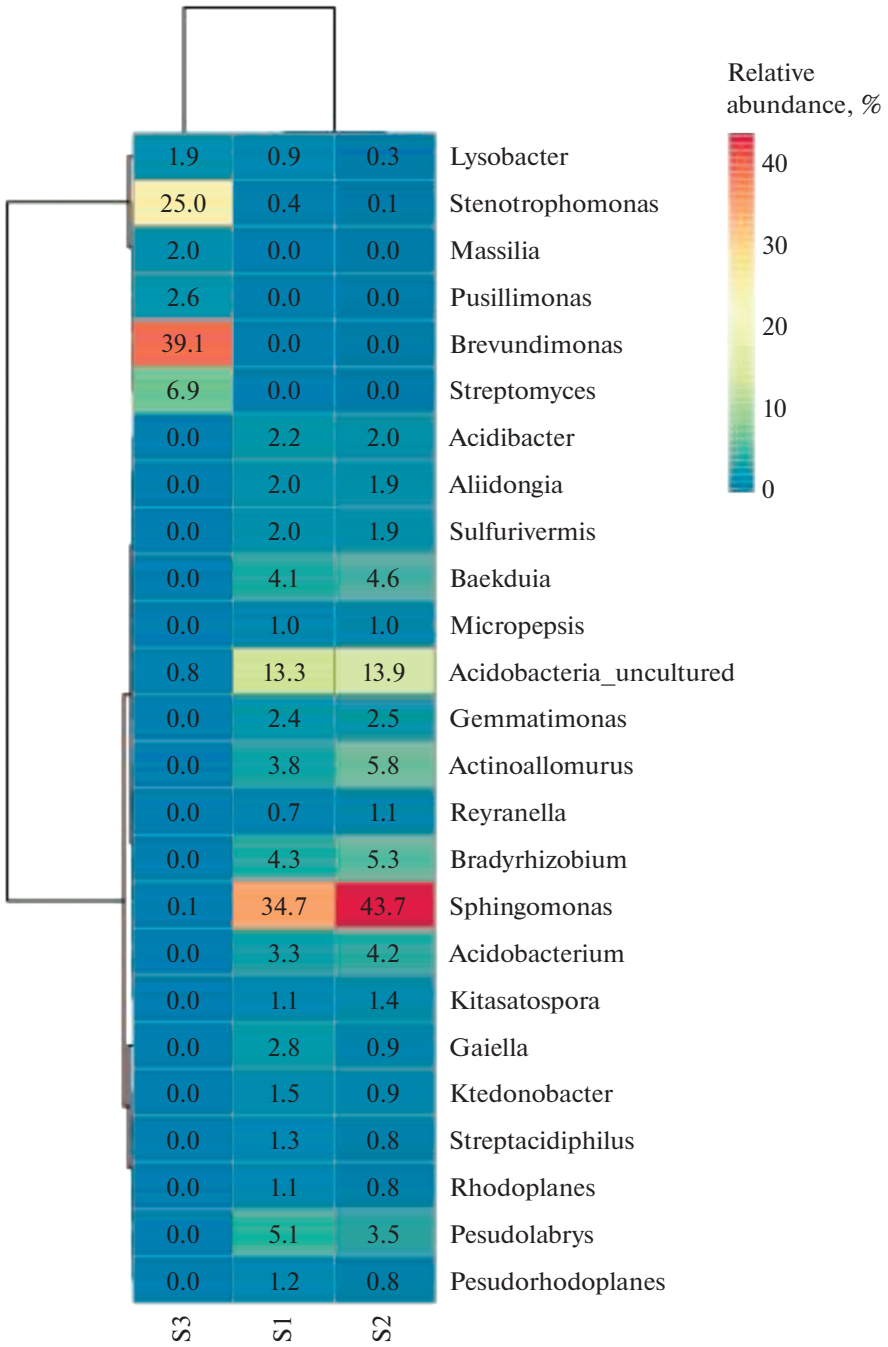


Рис. 2. Тепловая карта (heatmap) распределения 25 доминантных родов в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК бактериальных сообществ из образцов почв. Двойная иерархическая дендрограмма показывает распределение бактерий в этих библиотеках. Переход цвета от синего до красного обозначает относительные величины содержания отдельных родов (от менее представленного к более представленному роду в библиотеке). Цифры на диаграмме обозначают % от общего количества последовательностей в библиотеке из каждой пробы.

тельно высокой, как и представленность остальных ферментов этих путей, катализирующих восстановление нитрита до молекулярного азота и аммония соответственно. В меньшей степени у микроорганизмов этих сообществ был представлен фермент ферредоксин-нитратредуктаза (EC: 1.7.7.2), катализирующий восстановление нитрата до нитрита в процессе ассимиляционной нитратредукции, и фермент ферредоксин-нитритредуктаза (EC: 1.7.7.1), завершающий этот процесс восстановлением нитрита до аммония. Все ферменты пути метаболизма азота были наиболее представлены у микроорганизмов S2 сообщества незагрязненной дерново-подзолистой почвы. Наибольший вклад

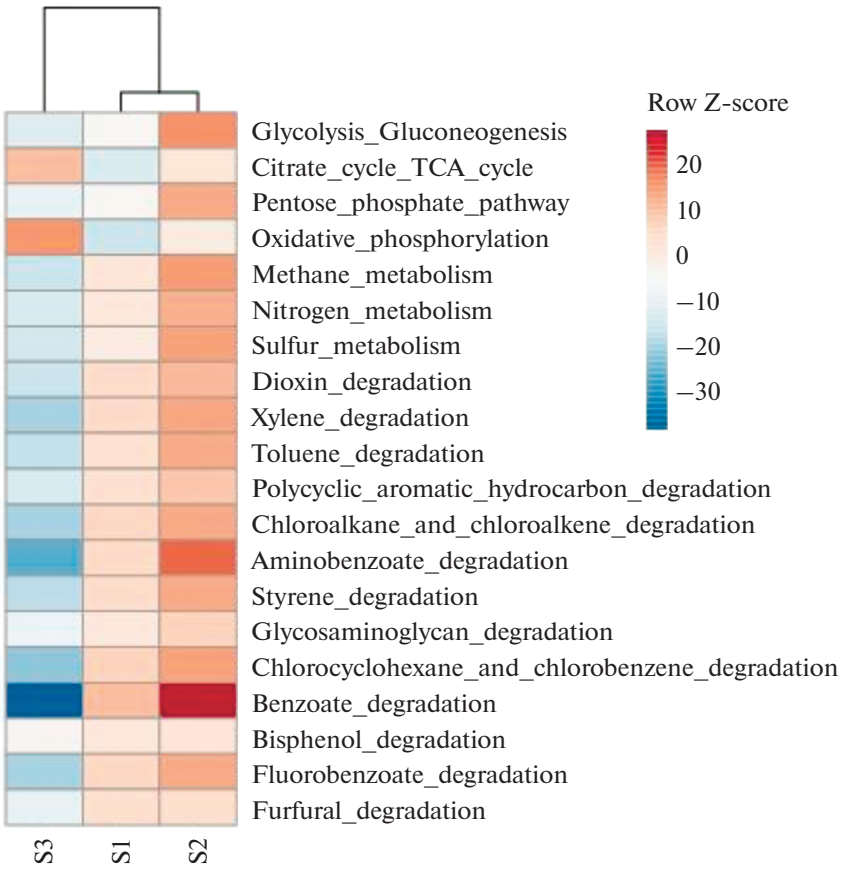


Рис. 3. Тепловая карта, показывающая сравнение функциональных профилей бактериальных сообществ образцов почв (в относительных процентах) в программе iVikodak.

в преобразование азота в сообществах S1 и S2 вносили *Alphaproteobacteria* родов *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* и *Pseudolabrys*, среди которых известны виды, способные к денитрификации (рис. S6а, S6б, доп. материалы).

В соответствии с представленностью в библиотеке рибосомных генов микроорганизмов урбостратозема (S3), бактерии родов *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas* и *Streptomyces* характеризовались наибольшей потенциальной активностью в преобразовании соединений азота, деградации хлоралканов, хлоралкенов и бензоата (рис. S7–S10, доп. материалы). Однако помимо этих родов потенциально активными в деградации полициклических ароматических углеводородов были также бактерии рода *Pusillimonas* (рис. S11, S12), представленность которых в S3 библиотеке генов 16S рРНК не превышала 3%. Неоднократно отмечалось участие бактерий родов *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* и *Pusillimonas* в деградации загрязненных нефтью почв, нефтяных шламов, хлорсодержащих соединений и ПАУ (Arulazhagan et al., 2017; Egorova et al., 2021; Al-Mur et al., 2021; Lara-Moreno et al., 2021).

Использование нефтепродуктов и ароматических углеводородов микроорганизмами почвы. Исследована способность микробных сообществ образцов почв использовать сырую нефть, нефтяные масла, насыщенные прямоцепочечные углеводороды (C_{12}–C_{16}), ароматические соединения (нафталин, бифенил) и ПАУ (фенантрен, флуорен и пирен). Рост микроорганизмов был обнаружен в посевах всех исследованных почвенных образцов на жидкие среды с нефтью. Наиболее богатый рост наблюдали в средах с насыщенными углеводородами и нефтяными маслами, особенно с минеральным маслом (табл. S2). На средах с использованием фенантрена и пирена наблюдался наилучший рост микроорганизмов: изменялся цвет среды и образовывалась биопленка на поверхности жидкости. Поскольку существовала вероятность роста микроорганизмов за счет веществ, присутствующих в почве, полученные накопительные культуры трижды последовательно пересевали на среды с соответствующими субстратами. Микроорганизмы, присутствующие в исследованных образцах почв, были способны расти на ароматических субстратах и ПАУ в 4-х последовательных пересевах (табл. S3). Накопительные культуры,

полученные из нефтезагрязненной почвы на территории Ромашкинского нефтяного месторождения, демонстрировали лучший рост за счет ПАУ.

Выделение чистых культур углеводородокисляющих бактерий. Накопительные культуры, полученные в средах с бифенилом и ПАУ (фенантреном и пиреном), были использованы для выделения чистых культур. Методом последовательных пересевов с плотных сред на жидкие среды было выделено 25 чистых культур. Полученные штаммы поддерживали на средах с бифенилом, фенантреном и пиреном, соответственно тому, на каком субстрате они были выделены. Наиболее полно потребляли бифенил – штаммы Б420б и Б417а (рис. S13а), фенантрен – штамм Ф420б (рис. S13б), пирен – штаммы П420в и П417г (рис. S13в). Ряд штаммов, наиболее эффективно деградирующих углеводороды, был идентифицирован методом анализа последовательности гена 16S рРНК. Гены штаммов Б420г, ФП1в и П420в имели, соответственно, 100, 97 и 96% сходства с геном *Stenotrophomonas maltophilia*, а ген штамма Б417а был идентичен гену *Micrococcus oxydans* (100% сходства). Содержание Г + Ц в ДНК штаммов *Stenotrophomonas* spp. Б420г, ФП1в и П420в составляло 66.2, 62.1 и 66.6 мол. % соответственно, и было близко величине Г + Ц в ДНК типового штамма вида *S. maltophilia* (66.6 мол. %). Величина ДНК–ДНК гибридизации штамма Б420г со штаммами П420в и ФП1в составляла 99 и 21%, что позволяет отнести штаммы Б420г и П420в к виду *Stenotrophomonas maltophilia*, а штамм Б420г, вероятно, принадлежит к новому виду этого рода. Штаммы *S. maltophilia* ФП1в и П420в использовали насыщенные прямоцепочечные *н*-алканы (C_{12}–C_{16}), ароматические углеводороды (нафталин, фенантрен, бифенил, флуорен, пирен), различные нефтяные масла (моторное, турбинное, трансформаторное, компрессорное и минеральное) и нефть. Фенотипические признаки штамма *S. maltophilia* П420в соответствовали таковым бактерий рода *Stenotrophomonas*. Штамм П420в рос в интервале pH от 5.5 до 7.8 с оптимумом pH 6.5–7.0, в интервале температуры от 10 до 35°C с оптимумом около 20°C (табл. S4). Поскольку бактерии рода *Stenotrophomonas* входят в состав микробных сообществ загрязненных нефтью почв (например, образца S3), и выделенные штаммы *Stenotrophomonas maltophilia* используют широкий спектр прямоцепочечных *н*-алканов и ПАУ, штамм *S. maltophilia* П420в был выбран для дальнейшей работы с микрокосмами почв. Мы полагали, что культура, растущая на пирене, состоящем из слитых четырех бензольных колец, будет использовать и менее сложные ПАУ. Представители этого рода известны своей способностью к росту на широком ряде субстратов, в том числе ароматической природы (Mukherjee, Roy, 2016).

Биодеградация ПАУ и нефти микрокосмами дерново-подзолистой почвы. В модельных экспериментах в условиях искусственного загрязнения почвы S4 смесью ПАУ или нефтью исследована способность почвы к самоочищению и влияние внесения углеводородокисляющей бактерии *S. maltophilia* П420в (биоаугментации) на биодеградацию этих субстратов. Автохтонная микрофлора дерново-подзолистой почвы использовала внесенную в почву смесь ПАУ (рис. S14). Однако в течение первых 14-сут эксперимента рост микроорганизмов был подавлен, и наблюдалась лаг-фаза в деструкции ПАУ. Затем почвенное сообщество, вероятно, адаптировалось к токсичным веществам, и в течение третьей недели был использован весь фенантрен и часть пирена. Обогащение почвенного сообщества штаммом-деструктором ПАУ, *S. maltophilia* П420в, приводило к небольшому увеличению скорости разложения поллютантов, но к концу эксперимента (42 сут) в обоих вариантах пирен и фенантрен были использованы полностью, причем фенантрен был использован быстрее, чем пирен. Внесение штамма-деструктора ПАУ лишь сокращало время разложения загрязнителей микробным сообществом почвы.

В лабораторном эксперименте в условиях микрокосма почву искусственно загрязняли метано-нафтеновой и нафтено-метановой нефтью и исследовали способность почвенной микробиоты к самоочищению и влияние интродуцированного штамма *S. maltophilia* П420в на деградацию нефти. Была оценена биодеградация разных компонентов нефти (насыщенных углеводородов, изоалканов и ароматических соединений).

Для оценки абиотических потерь за счет испарения компонентов нефти были поставлены контроли со стерильной почвой. Метано-нафтеновая нефть содержала больше легких насыщенных углеводородов, чем нафтено-метановая нефть (табл. S1). За 42 сут инкубации потери за счет испарения легких компонентов нафтено-метановой и метано-нафтеновой нефти составили 20 и 77% соответственно. Помимо испарения абиотические потери нефти были обусловлены также сорбционными процессами, при которых высокомолекулярные компоненты нефти необратимо сорбировались почвой и не извлекались далее растворителями.

Всего с учетом абиотических факторов и биогенных процессов за 42 сут эксперимента в варианте с почвенным сообществом было деградировано 42%, а в варианте с биоаугментацией штаммом П420в деградировано 43% от общего количества внесенной нафтено-метановой нефти (рис. 4а). В начале эксперимента, когда использовались преимущественно алифатические углеводороды, было деградировано больше нефти, чем в последующий период, когда использовались ароматические компоненты нефти.

Скорость разложения метано-нафтеновой нефти была выше в присутствии штамма П420в (рис. 4б). Через 14 сут инкубации в варианте с автохтонным микробным сообществом биодеградация еще не началась, а в варианте с интродукцией – было деградировано около 10% нефти. Через 35 сут количество деградированной нефти в почве в обоих вариантах практически сравнялось и составило 15%. Таким образом, внесение культуры ускорило на 14 сут процесс разрушения метано-нафтеновой нефти, но не повлияло на величину ее остаточного содержания в почве. В результате абиотических процессов было удалено больше легкой метано-нафтеновой нефти (77%), чем в ходе биогенных процессов (15%).

Изменение компонентного состава нефти микрокосмами почв. Под воздействием почвенного микробного сообщества происходило изменение группового состава нефти и содержания индивидуальных углеводородных соединений. Изменился состав алифатической части обеих нефтей: содержание *н*-алканов существенно уменьшилось; содержание изоалканов – изменилось в меньшей степени за счет потребления соединений с небольшим числом атомов углерода. Анализ алифатической составляющей нафтено-метановой нефти (рис. S15) показал, что в варианте со штаммом *S. maltophilia* П420в и в варианте без интродукции содержание *н*-алканов уменьшалось практически одинаково в течение 21 сут эксперимента и впоследствии не изменялось; за это время микроорганизмы использовали доступные им предельные углеводороды. Коэффициент K_i, отражающий соотношение между *изо*- и *н*-алканами, в нафтено-метановой нефти изменился с 0.78 (в исходной нефти) до 1.20 и 1.33 к концу эксперимента в вариантах без интродукции и с интродукцией штамма соответственно. На 21 сут биодеградация насыщенных УВ практически прекратилось, и в период 35–42 сут эксперимента большее значение приобрело разрушение ароматических компонентов нефти, когда их содержание снизилось на 53% (рис. S16а). Всего за 42 сут эксперимента микроорганизмы почвы деградировали 72.9% ароматических УВ. Почвенное сообщество, обогащенное штаммом *S. maltophilia* П420в, деградировало 74.9% ароматических компонентов нафтено-метановой нефти.

Динамика потребления предельных углеводородов метано-нафтеновой нефти была иной (данные не представлены). Микробное сообщество почвы потребляло значительную часть *н*-алканов, оставшихся в нефти после испарения, и интродукция штамма П420в в почву практически не отразилась на скорости биодеградации этих соединений. Соотношение между *изо*- и *н*-алканами в метано-нафтеновой нефти (коэффициент K_i) изменилось с 0.63 (в исходной нефти) до 0.79 и 0.80 к концу эксперимента (варианты без интродукции и с интродукцией соответственно). В метано-нафтеновой нефти микроорганизмы потребляли в основном *н*-алканы.

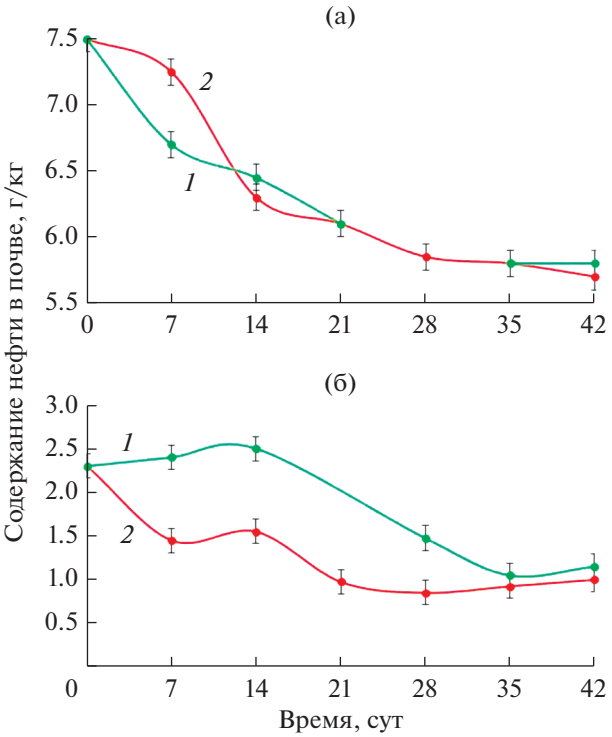


Рис. 4. Деградация нафтено-метановой (а) и метано-нафтеновой (б) нефти микрокосмами дерново-подзолистой почвы (*1*), а также при биоаугментации почвы штаммом *S. maltophilia* П420в (*2*) с учетом абиотического снижения нефти в контрольной почве.

Внесение штамма *S. maltophilia* П420в ускоряло потребление ароматической фракции в обоих исследованных типах нефти (рис. S16а, S16б). Интродукция штамма-деструктора ПАУ в почву, загрязненную нафтено-метановой нефтью, не сказалось на остаточном содержании ароматической фракции в деградированной нефти, но ускорила процесс ее разрушения по сравнению с ее деградацией почвенным сообществом. В случае с метано-нафтеновой нефтью в присутствии интродуцированного штамма было деградировано 62.1% ароматических углеводородов, что на 10.6% больше по сравнению с количеством ароматических углеводородов, деградированных автохтонным сообществом почвы (50.6%).

Две фазы процесса биоремедиации почв от нефти, когда большая часть деградации происходила на первом этапе (50% снижение за 35–45 дней), а во вторую фазу деградировало около 10% нефти, отмечали и другие исследователи (Kaplan, Kitts, 2004; Liu et al., 2011; Sutton et al., 2013; Samarghandi et al., 2018). На ранней стадии биоремедиации разрушались преимущественно нормальные ал-

каны и низкомолекулярные ароматические соединения (Venosa et al., 1997).

Нами показана большая роль испарения при очистке почв, особенно от легкой метано-нафтеновой нефти; 77% этой нефти было удалено из почвы вследствие абиотических процессов. Для нафтено-метановой нефти, содержащей меньшее количество легких парафинов, роль этого абиотического фактора при ее удалении из почвы была существенно меньше.

Проведенные исследования позволяют оценить метаболический потенциал почвенного микробного сообщества в деградации углеводородов, потребление разных компонентов нефти в динамике, количественно оценить вклад абиотических и биогенных процессов в деградацию нефти. Однако в лабораторных экспериментах не учитывается ряд природных факторов, влияющих на преобразование нефти, таких как реальная температура и ее флуктуация в течение суточного цикла, влажность и структура почвы, наличие растительности и другие.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что самоочищающая способность дерново-подзолистой почвы от нефтяных загрязнений высока; скорость биодеградации ряда ароматических компонентов нефти может быть повышена в присутствии таких бактерий как *Stenotrophomonas maltophilia* – деструкторов специфических углеводородов. В литературе неоднократно упоминается использование *Stenotrophomonas maltophilia* в составе микробных консорциумов для биоаугментации почв загрязненных нефтью (Xu et al., 2018). Способность выделенных штаммов бактерий разлагать алканы и ПАУ может иметь практическое значение при биоремедиации сред загрязненных нефтью с высоким содержанием ПАУ. В северных районах России, где теплый период года непродолжителен, процессы биодеградации не успевают развернуться в полной мере. В этом случае целесообразно обогащение почвенного микробного сообщества консорциумами бактерий, деградирующих целевые классы нефтяных углеводородов. Перед использованием бактериальных препаратов для биоремедиации почв необходимо предварительные исследования воздействия биопрепарата на определенный тип нефтяного загрязнения для конкретных почвенно-климатических условий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Состав микробного сообщества почв был определен при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00076). Микробиологические исследования были выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-29-05197) и Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Воронин А.Д. Физика почв. М.: МГУ, 1986. С. 158–159.

Геннадиев А.Н., Пиковский Ю.И., Жидкин А.П., Ковач Р.Г., Кошовский Т.С., Смирнова М.А., Хлынина Н.И., Цибарт А.С. Факторы и модификации углеводородного состояния почв // Почвоведение. 2015. № 11. С. 1314–1329.

Gennadiev A.N., Pikovskii Y.I., Zhidkin A.P., Kovach R.G., Koshovskii T.S., Smirnova M.A., Khlynina N.I., Tsibart A.S. Factors and features of the hydrocarbon status of soils // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 1193–1206. https://doi.org/10.1134/S1064229315110071

Геология и разработка крупнейших и уникальных нефтяных и нефтегазовых месторождений России / Под ред. Гавуры В.Е., М.: ВНИИОЭНГ, 1996. Т. 1. С. 50.

Манучарова Н.А., Кутейникова Ю.В., Иванов П.В., Николаева С.К., Трофимов В.Т., Степанов П.Ю., Тяпкина Е.В., Липатов Д.Н., Степанов А.Л. Молекулярный анализ гидролитической прокариотной компоненты почв, загрязненных нефтепродуктами и восстановленных внесением хитина // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 373–382. https://doi.org/10.7868/S0026365617030119

Manucharova N.A., Kuteinikova Yu.V., Ivanov P.V., Nikolaeva S.K., Trofimov V.T., Stepanov P.Yu., Tyapkina E.V., Lipatov D.N., Stepanov A.L. Molecular analysis of the hydrolytic component of petroleum contaminated soils and of soils remediated with chitin // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 395–402. https://doi.org/10.1134/S0026261717030092

Сидоров Д.Г., Борзенков И.А., Ибатуллин Р.Р., Милехина Е.И., Храмов И.Т., Беляев С.С., Иванов М.В. Полевой эксперимент по очистке почвы от нефтяного загрязнения с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 1997. Т. 33. С. 497–502.

Современные методы исследования нефтей / Отв. ред. Богомолов А.И. Л.: Недра, 1984. 431 с.

Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.

Al-Mur B.A., Pugazhendi A., Jamal M.T. Application of integrated extremophilic (halo-alkalo-thermophilic) bacterial consortium in the degradation of petroleum hydrocarbons and treatment of petroleum refinery wastewater under extreme condition // J. Hazard Mater. 2021. V. 413. Art. 125351. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125351

Arulazhagan P., Al-Shekri K., Huda Q., Godon J.J., Basahi J.M., Jeyakumar D. Biodegradation of polycyclic aro-

matic hydrocarbons by an acidophilic *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 isolated from a mineral mining site in Saudi Arabia // Extremophiles. 2017. V. 21. P. 163–174. https://doi.org/10.1007/s00792-016-0892-0

Asaf S., Numan M., Khan A.L., Al-Harrasi A. Sphingomonas: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. V. 40. P. 138–152. https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1709793

Atlas R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective // Microbiol. Rev. 1981. V. 45. P. 180–209.

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

Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.

Dark W.A. Crude oil hydrocarbon group separation quantitation // J. Liquid Chromatogr. 1982. V. 5. P. 1645–1652.

Egorova D., Kir'yanova T., Pyankova A., Anan'ina L., Plotnikova E. Selective pressure of biphenyl/polychlorinated biphenyls on the formation of aerobic bacterial associations and their biodegradative potential // Folia Microbiol. (Praha). 2021. Epub ahead of print. PMID: 33966251. https://doi.org/10.1007/s12223-021-00873

Eriksson M., Dalhammar G., Borg-Karlson A.-K. Aerobic degradation of a hydrocarbon mixture in natural uncontaminated potting soil by indigenous microorganisms at 20°C and 6°C // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51. P. 532–535.

Hocinat A., Boudemagh A., Ali-Khodja H., Medjemadj M. Aerobic degradation of BTEX compounds by *Streptomyces* species isolated from activated sludge and agricultural soils // Arch Microbiol. 2020. V. 202. P. 2481–2492. https://doi.org/10.1007/s00203-020-01970-4

IUSS Working group WRB. World reference base for soil resources 2014: International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Report No. 106. FAO, Rome, 2014. 181 p.

Kaplan C.W., Kitts C.L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 1777–1786.

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

Lara-Moreno A., Morillo E., Merchán F., Villaverde J. A comprehensive feasibility study of effectiveness and environmental impact of PAH bioremediation using an indigenous microbial degrader consortium and a novel strain *Stenotrophomonas maltophilia* CPHE1 isolated from an industrial polluted soil // J. Environ. Manage. 2021. V. 289. Art. 112512. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112512

Liu P.-W.G., Chang T.C., Whang L.-M., Kao C.-H., Pan P.-T., Cheng S.-S. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: effects of strategies and microbial community shift // Int. Biodeterior. Biodegr. 2011. V. 65. P. 1119–1127.

Metsalu T., Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. Art. W566–W570.

Mukherjee P., Roy P. Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 967. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00967

Nagpal S., Haque M.M., Singh R., Mande S.S. iVikodak – A Platform and standard workflow for inferring, analyzing, comparing, and visualizing the functional potential of microbial communities // Front. Microbiol. 2019. V. 9. Art. 3336. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03336

Nazina T.N., Tourova T.P., Poltaraus A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus, G. thermocatenulatus, G. thermoleovorans, G. kaustophilus, G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 433–446.

Poi G., Aburto-Medina A., Mok P.C., Ball A.S., Shahsavari E. Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium // Ecol. Engin. 2017. V. 102. P. 64–71.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41 (Database issue). Art. D590–D596. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

Ray M., Kumar V., Banerjee C., Gupta P., Singh S., Singh A. Investigation of biosurfactants produced by three indigenous bacterial strains, their growth kinetics and their anthracene and fluorene tolerance // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2021. V. 208. Art 111621. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111621

Samarghandi M.R., Arabestani M.R., Zafari D., Rahmani A.R., Afkhami A., Godini K. Bioremediation of actual soil samples with high levels of crude oil using a bacterial consortium isolated from two polluted sites: investigation of the survival of the bacteria // Global NEST J. 2018. V. 20. P. 432–438.

Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Al-Soud W.A., Langenhoff A.A.M., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H.M., Smidt H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 619–630.

Tyagi M., da Fonseca M., de Carvalho C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // Biodegradation. 2011. V. 22.

P. 231–241.
https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4

Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 503–549.
https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003

Venosa A., Suidan M., King D., Wrenn B. Use of hopane as a conservative biomarker for monitoring the bioremediation effectiveness of crude oil contaminating a sandy beach // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 18. P. 131–139.

Wang L., Li F., Zhan Y., Zhu L. Shifts in microbial community structure during in situ surfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated contaminated soils // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. P. 14451–14461.
https://doi.org/10.1007/s11356-016-6630-4

Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Jiang 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. 2018. V. 9. Art. 2885.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885

Microbial Degraders of Petroleum and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Sod-Podzolic Soil

N. A. Manucharova[1, *], M. A. Bolshakova[1], T. L. Babich[2], T. P. Tourova[2], E. M. Semenova[2], A. S. Yanovich[1], A. B. Poltaraus[3], A. L. Stepanov[1], and T. N. Nazina[2]

[1]*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*
[2]*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*
[3]*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
**e-mail: manucharova@mail.ru*

Received July 8, 2021; revised July 21; accepted July 25, 2021

Abstract—The paper deals with the phylogenetic and functional microbial diversity in the samples of umbric luvisol contaminated and uncontaminated with hydrocarbons and of urban stratozem. High-throughput sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene revealed predomination of bacteria of the phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* in the studied soil samples. Bacteria of the genera *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, and *Pseudolabrys* in the samples of umbric luvisol and bacteria of the genera *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, and *Streptomyces* in urbostrstozem had the greatest potential functional activity in conversion of nitrogen compounds, degradation of chloroalkanes, chloroalkenes, and benzoate. Strains of *Stenotrophomonas maltophilia*, which degraded oil, petroleum products, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs, phenanthrene, anthracene, and pyrene) were isolated from oil-contaminated soils. Under microcosm conditions, microorganisms of umbric luvisol efficiently degraded various components of naphthenic-methane and methane-naphthenic oil. While the content of aromatic components in naphthene-methane oil degraded by the soil microbial community and by the community enriched with *S. maltophilia* strain P420b was almost the same, in the variant with bioaugmentation the degradation process of these components proceeded 14 days faster. The enrichment of soil with specific degraders of PAHs and aromatic compounds may be appropriate for the soils of northern regions with a low duration of the summer period, which are polluted with oil with a high content of aromatic and asphalt-resinous compounds.

Keywords: petroleum-contaminated soil, high-throughput sequencing, 16S rRNA gene, prokaryotes, functional diversity, microcosms, bioaugmentation, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), *Stenotrophomonas*

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 718–727

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ШТАММ AZ-130 ИЗ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ АЗЕРБАЙДЖАНА: ИЗОЛЯЦИЯ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2021 г.
А. Г. Агаева[a, b, *], С. Дж. Стритфилд[a], И. М. Гусейнова[b]

[a]*Фраунхофер США, Центр Средней Атлантики, Ньюарк, DE 19711 Соединенные Штаты Америки*

[b]*Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана, Баку, AZ1073 Азербайджан*

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

Поступила в редакцию 14.04.2021 г.
После доработки 21.07.2021 г.
Принята к публикации 30.07.2021 г.

Целью представленной работы является изоляция бактерий из нефтезагрязненных почв Азербайджана, их антибактериальный скрининг и выбор оптимальных условий для максимальной продукции веществ, обладающих антибактериальной активностью, так как исследование необычных и ранее не анализированных источников представляет значительный интерес для выделения штаммов бактерий с новыми свойствами. В результате проведенных исследований из нефтезагрязненного образца почвы, собранного в поселке Лёкбатан, были выделены 44 бактериальных штамма, которые анализировались на наличие антибактериальной активности против одного грамотрицательного и двух грамположительных условно-патогенных штаммов методом подавления роста. После первичного скрининга установлено, что 3 штамма продуцировали соединения, обладающие антибактериальной активностью, по меньшей мере, против одного индикаторного организма. При скрининге супернатанта штамм AZ-130 показал сильную антиграмположительную активность и методом секвенирования гена 16S рРНК был идентифицирован как *Bacillus vallismortis*. Поиск в APD3 показал, что на данный момент нет известных антибиотиков, продуцируемых бактерий *B. vallismortis*. Для дальнейшей очистки и характеристики антимикробного соединения, продуцируемого данным штаммом, условия выращивания (среда, температура и время культивирования), при которых синтез антимикробного соединения достигает наивысших значений, были оптимизированы. Исследовано влияние компонентов четырех сред при четырех различных температурах на продукцию биоактивной молекулы AZ-130. Супернатанты, собранные от культур AZ-130, выращенных при соответствующих условиях, очищали и анализировали на антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* методом подавления роста и микроразведения в бульоне. Продукция молекулы AZ-130 достигает наивысшего уровня при культивировании штамма в среде ТВ + 2% глюкоза в течение 2 сут при температуре 32°C.

Ключевые слова: антибактериальные агенты, антимикробная активность, антибиотики, биоактивные молекулы, вторичный метаболит, натуральные продукты, оптимизация среды, патогенные бактерии, первичный метаболит, условия культивирования

DOI: 10.31857/S0026365621060033

Антибиотики, являясь очень важными натуральными продуктами для здоровья человека, внесли значительный вклад в борьбу с инфекционными заболеваниями (Li, Vederas, 2009; Newman, Cragg, 2012). С 1928 года, когда А. Флемингом был открыт пенициллин, антибиотики стали основным средством борьбы с такими патогенными микроорганизмами, как *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и другими (Fleming, 1929; Aminov, 2010). Однако в последние годы многие патогенные бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам (метициллин-устойчивый *S. aureus* (MRSA), устойчивый к карбапенемам *A. baumannii* (CRAB), полирезистентный *P. aeruginosa* (MDR) и т.д.), что приводит к тому, что многие коммерчески доступные антибиотики постепенно теряют свою эффективность (Manchanda et al., 2010; Okwu et al., 2019). Стремительное увеличение числа устойчивых к антибиотикам патогенов (Otto, 2013; Prestinaci et al., 2015; Ventola, 2015; van Duin and Paterson, 2016; Johnning et al., 2018) и существующие трудности в процессе разработки новых антибиотиков (Kim 2013; Carrano et al., 2015) становится серьезной угрозой глобальному здоровью. Например, в последнее время увеличивается число грамотрицательных патогенных бактерий, несущих плазмиду с геном New Delhi metallo-beta-

lactamase-1 (NDM-1), который способствует возникновению устойчивости почти ко всем имеющимся на рынке бета-лактамным антибиотикам и быстро распространяется между разными видами бактерий посредством горизонтального переноса генов (Fomda et al., 2014; Khan et al., 2017; Lerminiaux, Cameron, 2019). Антибиотикотерапия инфекций, вызванных бактериями с геном NDM-1, практически невозможна (Raghunath, 2010; Munita, Arias, 2016).

В то время как число устойчивых к антибиотикам штаммов быстро растет, очень мало новых антибиотиков-кандидатов проходит через фармацевтическую разработку (Dadgostar, 2019; Rončević et al., 2019). За последние 20 лет были лицензированы только два новых класса антибактериальных препаратов – линезолид в 2000 г. и даптомицин в 2003 г. (Ali et al., 2018). Следовательно, возникает острая необходимость в поиске и разработке новых безопасных и эффективных антимикробных соединений против бактериальных инфекций. Для разработки новых антибиотиков очень важно идентифицировать новые, ранее некультивированные штаммы-продуценты, так как большинство применяемых в медицине антибиотиков были выделены непосредственно из живых организмов или представляют собой модифицированные соединения, основные структуры которых имеют природное происхождение (Jones et al., 2017; Ali et al., 2018). Одним из важнейших элементов идентификации новых бактериальных штаммов является образец, из которого изолируются бактерии. Известно, что продуцентами 70% коммерчески доступных антибиотиков являются почвенные бактерии, принадлежащие, в основном, к родам *Streptomyces* и *Bacillus* (Smith, 2000; Procópio et al., 2012; Baindara et al., 2013). Вероятной причиной невозможности идентифицировать новые антимикробные соединения может быть тот факт, что большая часть микроорганизмов, населяющих обычные исследуемые образцы почв, почти полностью изучены и идентифицированы. Считается, что новые биоактивные молекулы можно идентифицировать из необычных источников, которые никогда не анализировались. Различные виды бактерий адаптировались и выживали в необычных условиях в течение сотен миллионов лет, формируя специфическую для данных условий микробиоту. Естественно, что бактерии, населяющие такие почвы, также выработали специфические метаболиты и механизмы для защиты от микробов-конкурентов.

Открытие и разработка нового антимикробного соединения, начиная от идентификации цели до утверждения для продажи, – это очень долгий и дорогостоящий процесс (Ekins et al., 2019). Одним из основных шагов в разработке антибиотиков является оптимизация условий культивирования штамма-продуцента для максимального увеличения выхода конечного метаболита. Компоненты среды и их уровни имеют решающее значение для производства вторичных метаболитов; даже небольшие изменения в питательной среде могут повлиять не только на количество целевого метаболита, но и на общий метаболический профиль штамма-продуцента. Поэтому перед началом любого крупномасштабного производства метаболитов необходимо оптимизировать условия роста штамма-продуцента (Wang et al., 2011; Arul Jose et al., 2013; Singh et al., 2017).

Учитывая критическую важность разработки новых антибиотиков, основной целью данной работы является изоляция бактерий из ранее не анализированных образцов, их антибактериальный скрининг и выбор оптимальных условий для максимальной продукции интересующего нас соединения. Для реализации поставленной цели, мы решили изолировать бактерии из нефтезагрязненных почв Азербайджана, которые никогда не были изучены на наличие антимикробной активности. Как известно, из 8660 тыс. га общей территории Азербайджана приблизительно 21 тыс. га приходится на долю нефтезагрязненных почв (Мамедов, Халилов, 2005; Асланов, Сафарли, 2008). Загрязнение почв нефтью отрицательно влияет на окружающую среду, поскольку разливы нефти сохраняются в почве в течение длительного времени (Marinescu et al., 2017), что приводит к изменениям в качестве почвы, растительности и микробном разнообразии (Margesin et al., 2003). Учитывая, что в литературе практически нет информации об антимикробных свойствах бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана, наши шансы на обнаружение нового штамма с ценными фармацевтическими и промышленными свойствами возрастают.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изоляция бактерий. Объектом исследования служил нефтезагрязненный образец почвы (рис. 1а), собранный с глубины 5–10 см в поселке Лёкбатан Гарадагского района города Баку (AZ1063, Азербайджан). Изоляция бактериальных штаммов была осуществлена методом стандартного серийного разведения во Фраунхоферском Центре Средней Атлантики (США) (Агаева, 2020). Для этого к 1 г образца добавляли 2 мл однократного натрий-фосфатного буфера и тщательно перемешивали на вортексе. Для осаждения почвенных частиц, полученную смесь инкубировали при комнатной температуре 2 ч. По истечении времени инкубации образец подвергался серийному разведению (от 10^{-1} до 10^{-3}) в стерильном однократном натрий-фосфатном буфере. В качестве плотной питательной среды использовали триптический соевый агар (TSA). Для посева бактерий

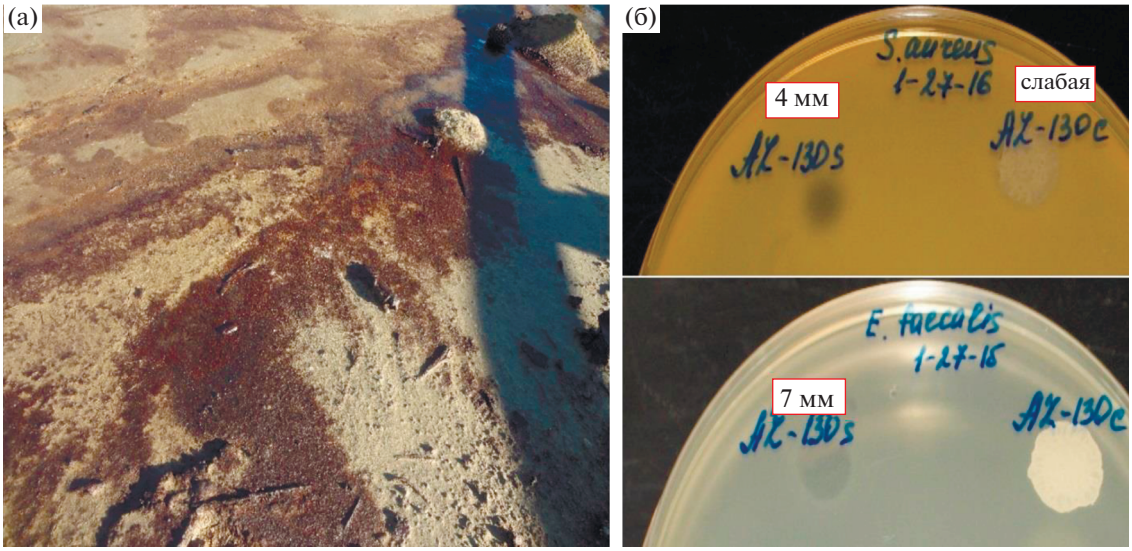


Рис. 1. Место сбора образца нефтезагрязненной почвы, пос. Лёкбатан Гарадагского района города Баку, Азербайджан (а). Результаты антибактериального скрининга (б): штамм AZ-130 показывает слабую активность в культуре (с) против *S. aureus*; активность в культуре против *E. faecalis* отсутствует. Супернатант (s) штамма AZ-130 показывает ~4 мм активность против *S. aureus* и ~7 мм активность против *E. faecalis*.

100 мкл неразбавленного и серийно разбавленных образцов почвенной суспензии наносили на чашки Петри и равномерно распределяли по поверхности питательной среды, используя стерильный шпатель Дригальского. Чашки Петри инкубировали при 32°C в течение 1–7 сут. Бактериальные колонии с разными морфологическими характеристиками, такими как форма колонии, рельеф и характер поверхности, цвет, хромогенез, размер и консистенция, формирующиеся в течение 1–7 сут, переносили на свежую питательную среду, очищали и хранили в 15% глицерине при –80°C. На данной стадии все изолированные штаммы считались неизвестными бактериями и были подвергнуты антибактериальному скринингу.

Антибактериальный скрининг культуры клеток. Первичный скрининг выделенных бактерий на наличие антибактериальной активности проводили методом подавления роста, как описано Хокет (Hockett, Baltrus, 2017) с некоторыми модификациями против трех условно-патогенных индикаторных штаммов: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* и *Escherichia fergusonii*. Штаммы *Enterococcus faecalis* (идентифицирован методом секвенирования гена 16S рРНК как *Enterococcus faecalis* NBRC 100480) и *Escherichia fergusonii* (идентифицирован методом секвенирования гена 16S рРНК как *Escherichia fergusonii* ATCC 35469) были получены во Фраунхоферском Центре Средней Атлантики, США. Для осуществления скрининга к 3 мл мягкого агара (0.8%) добавляли 10 мкл свежеприготовленной суспензии штамма-индикатора (при OD_{600} = 0.5), полученную смесь выливали на чашки Петри с TSA средой и оставляли на несколько минут при комнатной температуре для остывания. В результате получали TSA среду, засеянную штаммом-индикатором. Далее 10 мкл свежеприготовленной суспензии клеток изолированных культур добавляли на чашки Петри с TSA средой, содержащей штамм-индикатор (Balouiri et al., 2016; Hockett, Baltrus, 2017). Чашки инкубировали 20–24 ч при 37°C. Активность определяли по наличию зоны ингибирования (прозрачного кольца) вокруг того места, где была добавлена суспензия. Диапазон антибактериальной активности, или зону подавления роста (ЗПР), выражали в миллиметрах. Для определения ЗПР измеряли толщину прозрачного кольца от края тестируемой колонии до края роста индикаторного штамма. При ЗПР меньше 1 мм активность оценивали как слабую, больше 1 мм – сильную.

Антибактериальный скрининг супернатанта. Для того чтобы определить, секретируют ли активные в культуре бактерии антибактериальное соединение в культуральную жидкость, супернатанты были подвергнуты скринингу. Скрининг по-прежнему осуществляли методом подавления роста (Balouiri et al., 2016; Hockett, Baltrus, 2017). 50 мл жидкой питательной среды TSB (триптический соевый бульон) инокулировали одной колонией активного в культуре штамма и выращивали при 32°C и 180 об./мин в течение 24 ч. По истечении времени инкубации супернатант очищали от клеток сначала центрифугированием при 10000 *g* в течение 15 мин при 4°C культуры, а затем фильтрованием через 0.22 мкм PES-мембрану (мембрану из полиэфирсульфона). Клетки и суперна-

тант культуры исследуемого штамма наносили на чашки Петри с TSA средой, содержащей штамм-индикатор и инкубировали при 37°C в течение 20–24 ч. Диапазон антибактериальной активности, выраженной в миллиметрах, определяли путем измерения диаметра прозрачной зоны (зоны подавления роста индикаторного организма).

Секвенирование гена 16S рРНК и поиск в APD3 на наличие известных антибиотиков. Идентификация штаммов, супернатанты которых показали наибольшую активность, была осуществлена путем секвенирования гена 16S рРНК, для чего штаммы были отправлены в лабораторию Charles Liver (223 Lake Drive, Newark, DE, 19702). После идентификации выбранных изолятов был осуществлен литературный поиск, чтобы узнать какие известные антимикробные молекулы продуцируют изолированные нами штаммы.

Оптимизация состава среды и условий культивирования для максимального производства антибактериального соединения. Для определения оптимального состава среды, температуры и времени наивысшей продукции антибактериального соединения были проанализированы четыре различных типа питательных сред (TSB, TSB с 2% глюкозой, TB, TB с 2% глюкозой) при четырех различных температурах (18, 25, 32, 37°C). Состав триптического соевого бульона (TSB): пептон казеиновый (панкреатический гидролизат) – 17 г/л, пептон соевый (папаиновый гидролизат) – 3 г/л, гидроортофосфат калия (K_2HPO_4) – 2.5 г/л, хлорид натрия – 5 г/л, декстроза (глюкоза) – 2.5 г/л; обезвоженной питательной среды бульона Terrific (TB): триптон (панкреатический гидролизат казеина) – 12 г/л, дрожжевой экстракт – 24 г/л, гидроортофосфат калия (K_2HPO_4) – 9.4 г/л, дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4) – 2.2 г/л. Чтобы начальная плотность колоний во всех исследуемых условиях была одинаковой, 10 мл питательной среды были инокулированы одной колонией продуцента и инкубированы при 32°C и 250 об./мин в течение 2 ч (прекультура). Через 2 ч все четыре исследуемые среды (TB +/– глюкоза; TSB +/– глюкоза) инокулировали 1 мл прекультуры и культивировали при соответствующих температурах (18, 25, 32 и 37°C). Через 24, 48 ч и т.д. отбирали 1 мл образца из культуры для анализа. Супернатант очищали от клеточной культуры центрифугированием при 10000 *g* в течение 15 мин при 4°C и фильтрованием через 0.22 мкм PES-мембрану. Вначале все собранные супернатанты были протестированы на ингибирующую активность против *S. aureus* ATCC 29213 методом подавления роста, как описано выше (Hockett, Baltrus, 2017). 10 мкл отобранных образцов супернатантов наносили на чашку с TSA средой, содержащую штамм-индикатор. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение ночи и измеряли диаметр зоны подавления роста. Затем, для определения условий, в которых концентрация антибактериальных единиц самая высокая, все супернатанты с активностью были проанализированы методом микроразведения в бульоне (Coyle et al., 2005), следуя рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI). 100 мкл супернатанта добавляли в первую ячейку 96-ячеечного планшета и дважды разбавляли вдоль ряда. Затем в каждую ячейку добавляли 50 мкл *S. aureus* ATCC 29213 до конечной концентрации 5×10^4 клеток на ячейку. Для положительного контроля (100% рост индикатора) к 50 мкл среды добавляли 50 мкл индикаторного организма; отрицательным контролем (отсутствие индикатора) служила только питательная среда – 100 мкл. Планшеты закрывали крышкой и инкубировали при 37°C в течение ночи в открытом пакете (для удержания влаги внутри). После инкубации измеряли оптическую плотность при 650 нм с использованием аппарата Molecular Devices Spectra MaxPlus, а затем в каждую ячейку планшета добавляли 10 мкл реагента для определения жизнеспособности клеток PrestoBlue (“Invitrogen”, A13262) и инкубировали планшеты при комнатной температуре в течение 30 мин. Измерение флуоресценции осуществляли при длине волны возбуждения 560 нм и эмиссии 590 нм с использованием флуоресцентного считывателя микропланшетов (Fluorescent microplate reader).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для того чтобы определить, что антибактериальная активность обусловлена одним действующим компонентом супернатанта, а не несколькими, супернатант, собранный и очищенный из культуры, выращенной в 50 мл TB среды при 32°C в течение ночи, был проанализирован методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В качестве контроля использовали среда TB. Для ВЭЖХ 100 мкл анализируемого материала загружали в колонку с обращенной фазой C_{18} Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 мм, номер по каталогу 993967-902) с использованием Agilent 1100 HPLC. В качестве подвижных фаз использовали ВЭЖХ H_2O/0.1% TFA (трифторуксусная кислота) (буфер Д) и ацетонитрил/0.1% TFA (буфер Б). Элюцию осуществляли в градиенте 5–95% буфера Б. 24 фракции объемом 1 мл собирали в течении первых 24 мин. Анализ на наличие активности осуществляли методом подавления роста против *S. aureus* ATCC 29213, для чего 10 мкл каждой фракции и загруженного материала наносили на чашку с TSA средой, засеянной штаммом-индикатором.

Сравнительный анализ активности супернатантов различных культур. Для осуществления сравнительного анализа супернатантов 50 мл TB среды инокулировали одной колонией продуцента. Колбы инкубировали в течение 22–24 ч при 32°C

и 220 об./мин. По истечении времени инкубации супернатанты были очищены от клеточной культуры путем центрифугирования при 10000 *g* (30 мин при 4°C) и фильтрования через 0.22 мкм PES-мембрану. Анализ отобранных образцов против *S. aureus* ATCC 29213 и *E. faecalis* осуществляли методом подавления роста, а против самих продуцентов – как методом подавления роста, так и микроразведения в бульоне, методика проведения которых описана выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

44 бактериальных штамма были выделены из нефтезагрязненного образца почвы, собранного в поселке Лёкбатан Гарадагского района города Баку, и проверены на антибактериальную активность против трех условно-патогенных индикаторных организмов методом подавления роста. После первичного скрининга из 44 выделенных культур только 3 обладали активностью (рис. 1б). Культура штамма AZ-130 показала слабую активность против грамположительного штамма *S. aureus* и грамотрицательного *E. fergusonii*, культура штамма AZ-134 показала слабую активность против *E. faecalis*, а культура штамма AZ-195 – слабую антиграмположительную активность против *S. aureus* и *E. faecalis.* Все 3 активные в культуре изолята были проанализированы на наличие активности в бесклеточном культуральном супернатанте. Из трех протестированных штаммов только AZ-130 обладал сильной антиграмположительной активностью в супернатанте против *S. aureus* (ЗПР = 4 мм) и *E. faecalis* (ЗПР = 7 мм) (рис. 1б). Учитывая сильную активность в супернатанте, для дальнейшей характеристики был выбран штамм AZ-130. Описание колонии AZ-130: форма – круглая, профиль – выпуклый, контур края – ровный, поверхность – шероховатая, цвет – бежевый, размер – средний.

На следующем этапе для максимальной продукции антимикробного соединения штаммом AZ-130 были протестированы 16 различных условий культивирования. Собранные по истечении определенного времени супернатанты, очищенные из культур, выращенных в соответствующих условиях, были вначале проанализированы на наличие антибактериальной активности методом подавления роста (табл. 1). Как видно из табл. 1, супернатанты, собранные на 1, 2 и 3 сут из культур, выращенных при 18°C, не обладали никакой активностью. При трех других тестируемых температурах производство антимикробного соединения зависело как от компонентов среды, так и от времени и температуры инкубации. Продукция биоактивной молекулы штаммом AZ-130, выращенным в питательной среде TSB, возрастала по мере увеличения температуры и времени инкубации в течение первых двух суток (ЗПР на 1 сут: при 25°C – отсутствует, при 32°C – 8 мм, при 37°C – 11 мм; ЗПР на 2 сут: при 25°C – 6 мм/неполная, при 32°C – 11 мм и при 37°C – 12 мм) и уменьшалась на 3 или 5 сут (ЗПР при 25°C – отсутствует, при 32°C – 4 мм и при 37°C – 10 мм).

Производство антибактериального соединения AZ-130 штаммом AZ-130, выращенным в среде TB, также колеблется в зависимости от температуры роста и времени инкубации. Слабая активность в супернатанте, наблюдаемая на 1 сут при 25°C, резко возрастала до высокой активности в 11–12 мм при 32 и 37°C. Такая же тенденция к увеличению активности в супернатантах наблюдалась на 2 сут (ЗПР при 25°C – 9 мм, при 32°C – 11 мм, при 37°C – 11 мм). Активность AZ-130 в супернатанте частично уменьшалась на 3 или 5 сут (ЗПР при 25°C – слабая, при 32°C – 7 мм, при 37°C – 5 мм/неполная).

Штамм AZ-130, выращенный в питательной среде TSB + 2% глюкоза, не продуцировал достаточное количество соединения на 1 сут. Однако на 2 сут концентрация антибактериального соединения увеличивалась по мере повышения температуры (ЗПР при 25°C – отсутствует, при 32°C – слабая, при 37°C – 11 мм) и снова уменьшалась на 3 или 5 сут (ЗПР при 25°C – отсутствует, при 32°C – отсутствует и при 37°C – 7 мм).

Что касается среды TB + 2% глюкоза, то при культивировании на ней штамм AZ-130 продуцировал антимикробное соединение при 32 и 37°C. Активность AZ-130, культивированной в данной среде при 32°C, увеличивалась с 4 мм на 1 сут до 8 мм на 2 сут и незначительно снижалась до 7 мм на 5 сут. Аналогичная тенденция в активности AZ-130 наблюдалась при температуре культивировании 37°C (ЗПР на 1 сут – 10 мм, на 2 сут – 12 мм и на 5 сут – 10 мм).

Подводя итог результатов анализа методом подавления роста, можно сделать вывод, что штамм AZ-130 производит наибольшее количество антимикробного соединения при культивировании при 32 и 37°C. Мы не обнаружили какую-либо активность в супернатантах культур AZ-130, выращенных при 18°C. Некоторая активность наблюдалась в супернатантах из культур AZ-130, выращенных при 25°C, но эта активность не была настолько выраженной, как в супернатантах из культур, выращенных при 32 и 37°C.

На следующем этапе, чтобы сравнить концентрацию антибактериальных единиц в активных супернатантах из культур, выращенных при 32 и 37°C, они были проанализированы методом микроразбавления в бульоне (табл. 2).

Наибольшая продукция соединения AZ-130 штаммом AZ-130, выращенным при 32°C, в трех из четырех протестированных сред наблюдалась на 2 сут. Супернатант, собранный из TSB + 2% глюкоза активен после 8-кратного, из TSB – по-

Таблица 1. Суммарная таблица активности собранных супернатантов (СН) штамма AZ-130 против *S. aureus* ATCC 29213, проанализированных методом подавления роста

Температура	Среда	Зона подавления роста (ЗПР), мм		
		СН, 1 сут	СН, 2 сут	СН, 3 сут/5 сут
18°C	TSB	–	–	–
	TB	–	–	–
	TSB + 2% глюкоза	–	–	–
	TB + 2% глюкоза	–	–	–
25°C	TSB	–	6/неполн.	–
	TB	Сл.	9	Сл.
	TSB + 2% глюкоза	–	–	–
	TB + 2% глюкоза	–	–	–
32°C	TSB	8	11	4
	TB	12	11	7
	TSB + 2% глюкоза	–	Сл.	–
	TB + 2% глюкоза	4	8	7
37°C	TSB	11	12	10
	TB	11	11	5 /неполн.
	TSB + 2% глюкоза	–	11	7
	TB + 2% глюкоза	10	12	10

Примечание. “–” – отсутствие активности; СН – супернатант; сл. – слабая активность; неполн. – неполное ингибирование.

Таблица 2. Суммарная таблица активности собранных супернатантов штамма AZ-130 против *S. aureus* ATCC 29213, проанализированных методом микроразведения в бульоне

Температура	Среда	Супернатант активен при разбавлении		
		СН, 1 сут	СН, 2 сут	СН, 5 сут
32°C	TSB	8	16	8
	TB	16	8	8
	TSB + 2% глюкоза	Неразб.	8	4
	TB + 2% глюкоза	16	**32**	16
37°C	TSB	8	16	8
	TB	8	16	8
	TSB + 2% глюкоза	Неразб.	8	8
	TB + 2% глюкоза	16	16	16

Примечание. СН – супернатант; неразб. – неразбавленный.

сле 16-кратного и из TB + 2% глюкоза – после 32-кратного разведения. Супернатант, собранный из TB среды, показывает свою максимальную активность в 16-кратного разведения на 1 сут.

Как видно из результатов анализа супернатантов из тестируемых сред при 37°C, активность разведенного в 16 раз супернатанта, полученного из среды TB + 2% глюкоза, стабильна даже после 5 сут инкубации. Супернатанты AZ-130, собранные из сред TB и TSB при 37°C, показали максимальную 16-кратную активность на 2 сут; супернатанты, собранные из TSB + 2% глюкозы, показали максимальную 8-кратную активность на 2 и 5 сут.

Супернатанты, анализированные методом микроразведения в бульоне, также были проана-

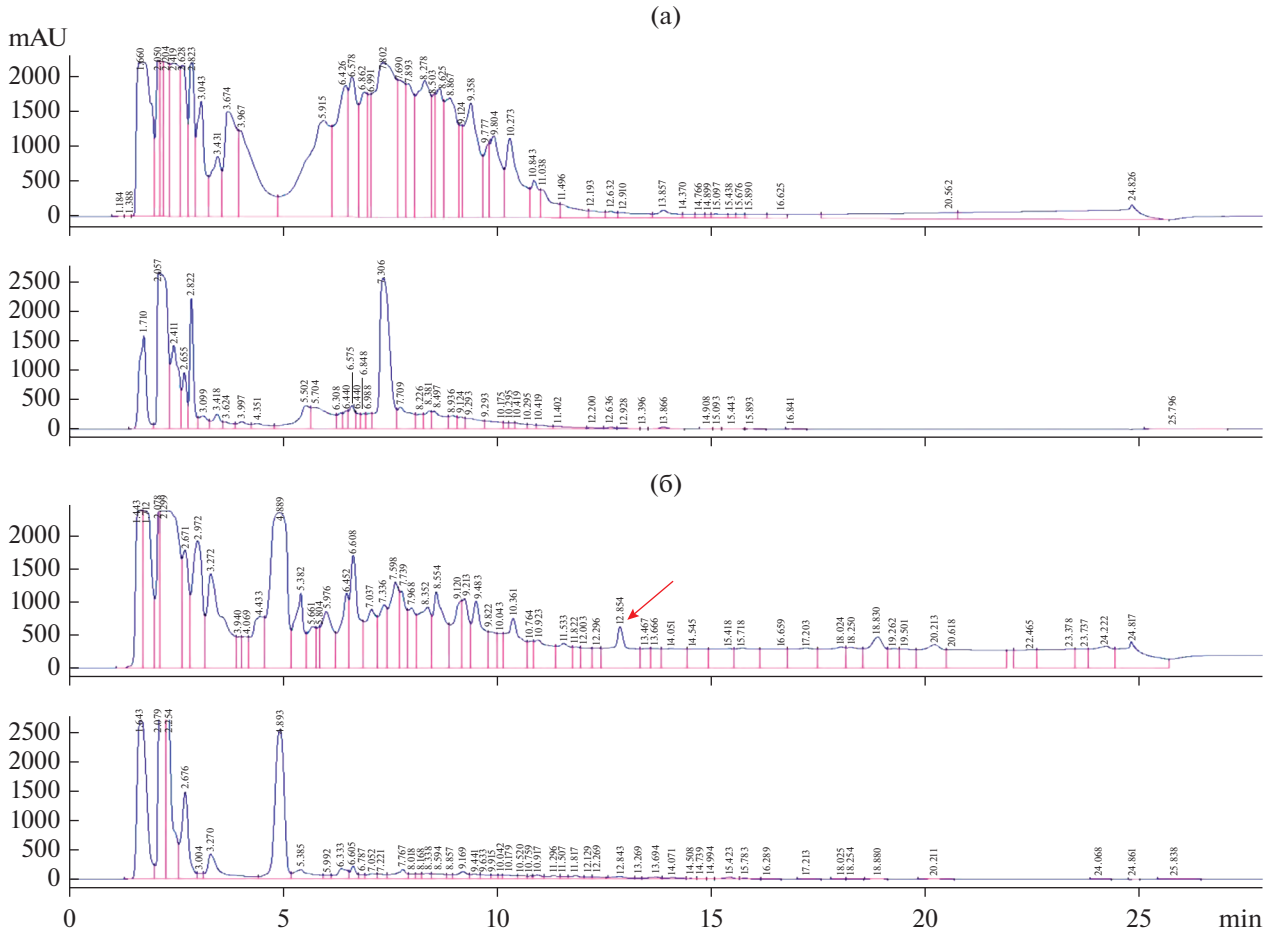


Рис. 2. C_{18} ВЭЖХ хроматограммы ТВ среды (а) и супернатанта AZ-130 (б).

лизированы на жизнеспособность клеток штамма-индикатора путем добавления ко всем ячейкам 96-ячеечного планшета реагента PrestoBlue. Визуальное подтверждение наличия живых клеток штамма-индикатора определяли по изменению цвета в ячейке. Синий цвет означал отсутствие живых клеток, то есть полное ингибирование, а розовый – наличие живых клеток условно-патогенного штамма. После добавления PrestoBlue, достоверность всех полученных выше результатов подтвердили результаты измерения флуоресценции в ячейках при возбуждении 560 нм и эмиссии 590 нм. Полученные результаты полностью подтвердили измерения оптической плотности.

Согласно полученным результатам, максимальная продукция биоактивного соединения AZ-130 наблюдалась при культивировании штамма-продуцента в питательной среде ТВ + 2% глюкоза при 32°C в течение 2 сут. Число ингибирующих единиц в супернатанте из этой среды было, как минимум, в два раза выше по сравнению со всеми другими исследуемыми условиями. Наблюдаемая активность высокая и стабильная, поскольку биомолекула AZ-130 не теряет активности даже после 5 сут инкубации.

На следующем этапе, для того чтобы определить количество антибактериальных компонентов в супернатанте штамма AZ-130, супернатант и ТВ среда были проанализированы методом C_{18} ВЭЖХ (рис. 2).

В процессе ВЭЖХ, начиная с момента инъекции материала, фракции объемом 1 мл были собраны и проанализированы на наличие активности против *S. aureus* ATCC 29213. Пик в хроматограмме со временем удерживания 12.854 мин соответствует фракции 13, продолжение этого пика также наблюдается во фракции 14. Судя по хроматограмме, концентрация соединения во фракции 14 должна быть меньше, что и подтверждают результаты анализа собранных фракций методом подавления роста. Загруженный в колонку супернатант обладал активностью равной 14 мм, фракция 13 и 14 – слабая и очень слабая соответственно. Если сравнить хроматограммы (рис. 2) супернатанта AZ-130 и контроля, а также учитывая результаты

Таблица 3. Суммарная таблица активностей супернатантов, собранных из культур AZ-130 и *B. subtilis*

Штамм	Супернатант *B. vallismortis* AZ-130		Супернатант *B. subtilis*	
	ЗПР, мм	активное разведение	ЗПР, мм	активное разведение
S. aureus ATCC 29213	7	Н/а	Сл.	Н/а
E. faecalis	10	Н/а	7	Н/а
B. vallismortis AZ-130	–	–	9	8
B. subtilis	–	–	–	–

Примечание. "–" – отсутствие активности; сл. – слабая активность; н/а – не анализировали.

антибактериального скрининга, пик со временем удерживания 12.854 мин соответствует активной биомолекуле, продуцируемой штаммом AZ-130. Отсутствие активности во всех остальных фракциях свидетельствует о том, что штамм AZ-130 продуцирует одно соединение с антибактериальной активностью (*Rt* 12.854 мин). Как видно из результатов, высокая активность, наблюдаемая в супернатанте, ослабевает в собранных фракциях, что непосредственно связано с объемами анализируемых материалов. Так, объем загруженного в колонку супернатанта был 100 мкл, а общий объем активных фракций 13 и 14 – 2 мл, что означает, что активность разбавляется приблизительно в 20 раз.

Штамм AZ-130, обладающий сильной и стабильной активностью в супернатанте, путем секвенирования гена 16S рРНК был идентифицирован как *Bacillus vallismortis*. Поиск в APD3 показал, что на данный момент нет известных антибиотиков, продуцируемых бактерией *B. vallismortis*. С другой стороны, *B. vallismortis* очень схожа с *B. subtilis,* которая является продуцентом ряда антибактериальных соединений (Sumi et al., 2015; Caulier et al., 2019). Для выявления сходств и различий в механизмах активности антибактериальных соединений штаммов AZ-130 и *B. subtilis* был осуществлен сравнительный анализ супернатантов этих культур. Штамм *B. subtilis* был получен во Фраунхоферском Центре Средней Атлантики, США и идентифицирован методом секвенирования гена 16S рРНК как *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* str. NBRC 101239. Результаты анализа супернатантов из культур AZ-130 и *B. subtilis* методом подавления роста против штаммов *S. aureus* ATCC 29213 и *E. faecalis* (табл. 3), показывают, что штаммы AZ-130 и *B. subtilis* обладают высокой антиграмположительной активностью в супернатанте. Однако, учитывая, что условия инокуляции и роста обеих штаммов являлись одинаковыми, активность супернатанта AZ-130 (против *S. aureus* ATCC 29213 – 7 мм, *E. faecalis* – 10 мм) значительно выше по сравнению с *B. subtilis* (*S. aureus* ATCC 29213 – слабая, *E. faecalis* – 7 мм).

Собранные супернатанты были также проанализированы на ингибирующую активность против самих штаммов и друг против друга (табл. 3). Как выяснилось, супернатант *B. subtilis* показал активность в 9 мм против штамма AZ-130, в то время как супернатант AZ-130 не обладал активностью против штамма *B. subtilis.* Анализ супернатантов методом микроразведения в бульоне подтвердил результаты, полученные методом подавления роста: супернатант *B. subtilis*, даже при 8-кратном разбавлении, полностью ингибирует рост штамма AZ-130, однако в супернатанте AZ-130 не отмечено никакой активности против штамма *B. subtilis*. Учитывая, что продуценты обладают устойчивостью к антимикробным соединениям, которые они продуцируют, подавление роста штамма AZ-130 супернатантом *B. subtilis* указывает на возможные различия в структуре и механизмах действия антибактериальных веществ, секретируемых штаммами AZ-130 и *B. subtilis.*

Количество выделенных бактерий, отличающихся друг от друга морфологическими характеристиками, свидетельствует о целесообразности поиска новых штаммов с полезными свойствами в загрязненных нефтью почвах Азербайджана. Судя по нашим результатам, этот тип почвы может служить источником бактерий, продуцирующих антимикробные препараты. Штамм AZ-130, идентифицированный как *Bacillus vallismortis*, продуцирует антимикробное соединение AZ-130, которое обладает сильной антиграмположительной активностью. Механизм активности антимикробного соединения, продуцируемого штаммом AZ-130, отличается от антибактериальных соединений, секретируемых штаммом *B. subtilis*. Полученные результаты подтверждают важность оптимизации даже самых незначительных параметров при культивировании микроорганизмов. Компоненты питательной среды, температура и время инкубации играют важную роль в продукции биомолекулы AZ-130 бактериальным штаммом AZ-130.

БЛАГОДАРНОСТИ

Представленная работа является частью докторской диссертации, которая будет представлена в Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана. Авторы статьи выражает благодарность

и глубокую признательность профессору С. Годьдману (“Evolva”, Калифорния, США) и Ч.М. Моррису (“Hygiena/Qualicon Diagnostics LLC”, Делавер, США) за советы и ценные замечания при работе над данной статьей.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли свой вклад в концепцию и дизайн исследования. Идея была предложена академиком Ирадой Гусейновой. Первый автор подготовил материал, собрал и проанализировал данные под руководством второго и третьего авторов и написал первый вариант рукописи. Все авторы рассмотрели первоначальные версии рукописи и одобрили окончательную рукопись. Рукопись не отправлялась в другой журнал. Это оригинальная работа авторов. Представленные результаты одобрены к публикации ответственным органом институтов, в которых выполнялась работа.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Агаева А.Г. Создание бактериальной коллекции на основе штаммов, изолированных из почв Азербайджана и их скрининг на наличие новых антибактериальных биомолекул // Журн. Наук о Жизни и Биомедицины. 2019. Т. 1(74). № 2. С. 13–19.

Асланов Г.К., Сафарли С.А. Нефтезагрязненные земли Азербайджана, их рекультивация и освоение. Баку: Наука, 2008. 191 с.

Мамедов Г.Ш., Халилов М.Ю. Экология и охрана окружающей среды. Баку: Наука, 2005. 880 с.

Ali S.M., Siddiqui R., Khan N.A. Antimicrobial discovery from natural and unusual sources // J. Pharm. Pharmacol. 2018. V. 70. P. 1287–1300.

Aminov R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future // Front. Microbiol. 2010. V. 1. Art. 134.

Arul Jose P., Sivakala K.K., Jebakumar S.R. Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06 // Int. J. Microbiol. 2013. Art. ID 526260.

Baindara P., Mandal S.M., Chawla N., Singh P.K., Pinnaka A.K., Korpole S. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample // AMB Express. 2013. V. 3. 2.

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review // J. Pharm. Anal. 2016. V. 6. P. 71–79.

Carrano L., Marinelli F. The relevance of chemical dereplication in microbial natural product screening // J. Appl. Bioanal. 2015. V. 1. P. 55–67.

Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 302.

Coyle M.B., Coord. Ed. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology, 2005.

Dadgostar P. Antimicrobial resistance: Implications and costs // Infect. Drug Resist. 2019. V. 12. P. 3903–3910.

Ekins S., Puhl A.C., Zorn K.M., Lane T.R., Russo D.P., Klein J.J., Hickey A.J., Clark A.M. Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development // Nature Mater. 2019. V. 18. P. 435–441.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza* // Br. J. Exp. Pathol. 1929. V. 10. P. 226–236.

Fomda B.A., Khan A., Zahoor D. NDM-1 (New Delhi metallo beta lactamase-1) producing Gram-negative bacilli: Emergence & clinical implications // Indian J. Med. Res. 2014. V. 140. P. 672–678.

Hockett K.L., Baltrus D.A. Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds // J. Vis. Exp. 2017. V. 119. Art. 55064.

Johnning A., Karami N., Hallbäck T.E., Müller V., Nyberg L., Buongermino P.M., Stewart C., Ambjörnsson T., Westerlund F., Adlerberth I., Kristiansson E. The resistomes of six carbapenem-resistant pathogens – a critical genotype–phenotype analysis // Microbial Genomics. 2018. V. 4. Art. e000233.

Jones M.B., Nierman W.C., Shan Y., Frank B.C., Spoering A., Ling L., Peoples A., Zullo A., Lewis K., Nelson K.E. Reducing the bottleneck in discovery of novel antibiotics // Microbial Ecol. 2017. V. 73. P. 658–667.

Khan A.U., Maryam L., Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health // BMC Microbiol. 2017. V. 17. 101.
https://doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8

Lerminiaux N.A., Cameron A.D.S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments // Can. J. Microbiol. 2019. V. 65. P. 34–44.

Lewis K. Platforms for antibiotic discovery // Nature Reviews. Drug Discovery. 2013. V. 12. P. 371–387.

Li J.W.H., Vederas J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? // Science. 2009. V. 325. P. 161–165.

Manchanda V., Sanchaita S., Singh N.P. Multidrug resistant *Acinetobacter* // J. Glob. Infect. Dis. 2010. V. 2. P. 291–304.

Margesin R., Labbe D., Schinner F., Greer C., Whyte L. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 3085–3092.

Marinescu M., Lacatusu A., Gament E., Plopeanu G., Carabulea V. Bioremediation potential of native hydrocarbons degrading bacteria in crude oil polluted soil // Bulletin USAMV. Ser. Agriculture. 2017. V. 74.
https://doi.org/10.15835/buasvmcn-agr:12654

Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance // Microbiol. Spectr. 2016. V. 4. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015

Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 // J. Nat. Prod. 2012. V. 75. P. 311–335.

Okwu M.U., Olley M., Akpoka A.O., Izevbuwa O.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review // AIMS Microbiol. 2019. V. 5. P. 117–137.

Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? // Int. J. Med. Microbiol. 2013. V. 303. P. 324–330.

Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon // Pathog. Glob. Health. 2015. V. 109. P. 309–318.

Procópio R.E., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L., Araújo J.M. Antibiotics produced by *Streptomyces* // Braz. J. Infect. Dis. 2012. V. 16. P. 466–471.

Raghunath D. New metallo β-lactamase NDM-1 // Indian J. Med. Res. 2010. V. 132. P. 478–481.

Rončević T., Puizina J., Tossi A. Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. Art. 5713.

Singh V., Haque S., Niwas R., Srivastava A., Pasupuleti M., Tripathi C.K. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review // Front. Microbiol. 2017. V. 7. Art. 2087.

Smith T. Antibiotics from soil bacteria // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 189–190.

van Duin D., Paterson D.L. Multidrug resistant bacteria in the community: Trends and lessons learned // Infect. Dis. Clin. North. Am. 2016. V. 30. P. 377–390.

Sumi C.D., Yang B.W., Yeo I.C., Hahm Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics // Can. J. Microbiol. 2015. V. 61. P. 93–103.

Ventola C.L. The antibiotic resistance crisis. Part 1: Causes and threats // Pharmacy and Therapeutics. 2015. V. 40. P. 277–283.

Wang Y., Fang X., An F., Wang G., Zhang X. Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology // Microb. Cell Fact. 2011. V. 14. Art. 98. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-98

Strain AZ-130 from Oil-Contaminated Soil of Azerbaijan: Isolation, Antibacterial Screening, and Optimization of Cultivation Conditions

A. G. Aghayeva[1, 2, *], S. J. Streatfield[1], and I. M. Huseynova[2]

[1]*Fraunhofer USA, Inc.,Newark, DE 19711 United States*

[2]*Institute of Molecular Biology and Biotechnologies, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, AZ1073 Azerbaijan*

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

Received April 14, 2021; revised July 21, 2021; accepted July 30, 2021

Abstract—The goal of the presented work was to isolate bacteria from oil-contaminated soils of Azerbaijan, screen them for their antibacterial activity, and determine the optimal conditions for production of the antibacterial compounds of interest, since unusual and previously unanalyzed sources are of significant interest for the isolation of bacterial strains with novel properties. This work resulted in isolation of 44 bacterial strains from an oil-contaminated soil sample collected in the Lokbatan settlement, which were analyzed for the presence of antibacterial activity against two gram-positive and one gram-negative opportunistic pathogenic strains using the growth inhibition assay. After initial screening, 3 strains showed an antibacterial activity against at least one test organism. Supernatant screening of strain AZ-130 revealed its strong anti-gram-positive activity. The isolate was identified as a *Bacillus vallismortis* strain (99%) by 16S rRNA gene sequencing. A search in APD3 showed that currently there are no known antibiotics produced by *B. vallismortis*. To further purify and characterize the antimicrobial compound produced by this strain, the growth conditions (medium, incubation temperature, and cultivation time) at which production of the antimicrobial compound reached the highest values were optimized. The effect of the components of four media at four different temperatures on the production of the AZ-130 bioactive molecule was investigated. The supernatants collected from AZ-130 cultures grown under appropriate conditions were purified and assayed for antibacterial activity against *S. aureus* by the growth inhibition and broth microdilution methods. Production of the AZ-130 molecule reached its highest level when the strain was cultivated in a TB + 2% glucose medium for 2 days at a temperature of 32°C

Keywords: antibacterial agents, antimicrobial activity, antibiotics, bioactive molecules, secondary metabolite, natural products, media optimization, pathogenic bacteria, primary metabolite, cultivation conditions

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 728–737

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ СКАЧКООБРАЗНОГО УВЕЛИЧЕНИЯ НАГРУЗКИ ПО АММОНИЮ НА АКТИВНОСТЬ СООБЩЕСТВА АНАММОКС-БАКТЕРИЙ В БИОРЕАКТОРЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

© 2021 г.
А. Г. Дорофеев[b, *], Ю. А. Николаев[a], В. А. Грачёв[a], А. Ю. Каллистова[a], Ю. Ю. Берестовская[a], Н. В. Пименов[a]

[a] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия*
[b] *Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия*
**e-mail: dorofeevag@mail.ru*

Поступила в редакцию 15.07.2021 г.
После доработки 26.07.2021 г.
Принята к публикации 27.07.2021 г.

Исследован переходный процесс, вызванный скачкообразным увеличением нагрузки по аммонию (в 2.5 раза) на микробное сообщество, развивающееся в биореакторе последовательно-периодического действия и осуществляющее процесс очистки воды от азота путем “нитритация–анаммокс”. Сообщество, сформированное в биореакторе с загрузкой при входной концентрации аммония 200 мг N/л, удаляло 76.5% поступающего азота и удовлетворительно описывалось математическим симулятором BioWin с использованием скорректированных коэффициентов. Скачкообразное увеличение нагрузки по азоту увеличением концентрации аммония в поступающей среде с 200 до 500 мг N/л привело к росту концентрация аммония на выходе из биореактора с 27 до 280–290 мг N/л и падению эффективности удаления азота до 40%. Выполненный на симуляторе BioWin расчет показал, что в течение месяца эффективность процесса “нитритация–анаммокс” должна повыситься и стабилизироваться на уровне, близком к исходному (76.5%). Однако экспериментальные данные не подтвердили расчетные: в течение этого срока заметного повышения эффективности процесса не наблюдалось. Вероятной причиной расхождения экспериментальных и расчетных данных могут быть изменения структурно-функциональных характеристик биопленок или агрегатов, не учитывающиеся при моделировании.

Ключевые слова: анаммокс-процесс, анаммокс-сообщество, нитритация, математическое моделирование, BioWin, очистка сточных вод

DOI: 10.31857/S0026365621060069

Анаммокс-бактерии, относящиеся к планктомицетам порядка *Ca*. “Brocadiales”, осуществляют анаэробное окисление аммония нитритом до молекулярного азота и используются для очистки сточных вод от аммония. Биотехнологии на основе процесса анаммокс считаются наиболее перспективными для удаления азота (Agraval et al., 2018; Кевбрина и соавт., 2019), сочетая два самостоятельных процесса: частичную нитрификацию (нитритацию), которая включает окисление около половины аммония до нитрита, и окисление аммония нитритом до молекулярного азота в бескислородных условиях (собственно процесс анаммокс). В настоящее время функционируют более сотни полномасштабных установок, причем около половины из них работают в реакторах последовательно-периодического действия (SBR, sequencing-batch reactor) (Ni et al., 2020), циклически осуществляющих вывод части отработанной среды и добавление свежей среды. По сравнению с непрерывно-проточными системами использование реакторов SBR-типа имеет существенные преимущества: в них накапливается значительное количество целевой биомассы, они более компактны, легче адаптируются к новым технологическим режимам. Масштабирование технологий очистки вод, разработанных в таких реакторах, осуществляется более надежно (Artan, Orhon, 2005; Tchobanoglous et al., 2014).

Доминирование процессов нитритации и анаммокс в одном биореакторе и оптимальное их сочетание требует достаточно жесткого регулирования физико-химических условий, учитывающего влияние совокупности факторов, среди которых существенную роль играет нагрузка микробного сообщества по аммонию (Каллистова и соавт., 2016;

Cho et al., 2020). В реальных условиях нагрузка может варьировать в широких пределах в связи с нестабильностью объема подающейся в биореактор среды и концентрации в ней аммония.

Один из эффективных приемов исследования, расчета и оптимизации биотехнологий очистки сточных вод – использование математического моделирования (Baeten et al., 2019; Seco et al., 2020). Как правило, при моделировании биореакторов исследуют стационарные состояния, однако в естественных и технологических экосистемах не менее важны переходные процессы, вызванные варьированием условий и характерные для реальных ситуаций. В настоящее время распространение получили несколько симуляторов, среди которых BioWin – один из наиболее широко используемых, объединяющий химические, физические и биологические модели процессов, включая процесс анаммокс (Дорофеев и соавт., 2017; Shao et al., 2021). Вместе с тем, существенным барьером, усложняющим применение математического моделирования, служит особенность существования анаммокс-бактерий – их склонность к агрегации и прикрепленному росту в виде биопленок (Wang et al., 2020; Каллистова и соавт., 2020). Агрегация и обрастание играют важную роль в биотехнологических процессах, способствуя удержанию биомассы в биореакторах, но затрудняют экспериментальное нахождение “истинных” физиологических кинетическо-стехиометрических характеристик (Lotti et al., 2014) и усложняют использование математического аппарата необходимостью дополнительного моделирования процессов массообмена меду жидкой фазой и биопленкой.

Ранее с использованием программного продукта BioWin нами было проведено математическое моделирование удаления аммонийного азота с использованием процесса нитритации–анаммокс и получены стационарные решения показателей работы биореактора при различных значениях концентрации растворенного кислорода и температуры (Дорофеев и соавт., 2017). Найденные в результате моделирования оптимальные температура и концентрация растворенного кислорода были близки к соответствующим показателям, полученным экспериментально.

Целью настоящей работы было исследование переходного процесса, вызванного скачком концентрации аммония в поступающей среде, и сравнение результатов моделирования с экспериментальными данными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть

Эксперименты проводили в лабораторном биореакторе SBR-типа с рабочим объемом 4.5 л. В качестве носителя в реактор была помещена цилиндрическая загрузка из волокнистых полиэтилена и полипропилена массой 82 г и общей площадью поверхности 11.6 дм^2 (Поливом, “ООО НПО “Этек”, Россия). В биореактор подавали синтетическую среду следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 0.942 и 2.36 (соответственно, 200 и 500 мг $N–NH_4$/л); $NaCH_3COO \cdot 3H_2O$ – 0.04; KH_2PO_4 – 0.044; $NaHCO_3$ – 2.1; pH 8.3. Готовили концентрированный раствор среды на дистиллированной воде. Концентрат разбавляли водопроводной водой в момент подачи в реактор; $NaHCO_3$ добавляли непосредственно в водопроводную воду перед разбавлением концентрата.

Продолжительность каждого цикла SBR составляла 6 ч. Цикл состоял из следующих фаз: фаза чередования аэрации и механического перемешивания – 310 мин; фаза отстаивания – 20 мин; фаза одновременной подачи 1 л свежей и слив 1 л отработанной среды – 30 мин. Реактор работал при температуре 32°C и концентрации кислорода 0.4–0.8 мг/л; pH 8.3.

Регулярно из биореактора отбирали образцы отходящей воды и биопленок для проведения химического анализа, электронной микроскопии и молекулярного анализа. Детальное описание биореактора, условий культивирования и методов анализа приведено ранее (Каллистова и соавт., 2020).

Исходным инокулятом служил консорциум анаммокс-бактерий, выращенный в лабораторном реакторе SBR-типа (Каллистова и соавт., 2020). Через 15 нед. выращивания при концентрации в подающейся среде 200 мг N/л концентрацию аммония повышали до 500 мг N/л.

Концентрацию удаленного азота рассчитывали как разность между концентрацией аммонийного азота ($N–NH_4$) в поступающей среде и суммарной концентрацией минеральных форм азота в очищенной воде ($N–NH_4$, $N–NO_2$, $N–NO_3$). Эффективность удаления азота (%) рассчитывали как долю удаленного азота от его содержания в поступающей среде.

Описание используемой в BioWin модели

Математическое моделирование проводили с применением симулятора BioWin 3.0 (версия 2007 г., “EnviroSim Associates Ltd.”, Канада) (Сайт компании “Envirosim”), в основе которого лежит модель активного ила ASDM (activated sludge process/anaerobic digestion model), по существу близкая к группе моделей активного ила ASM, разработанных международной научно-исследовательской группой IWAQ (Henze et al., 2000). Модель ASDM включает около 50 переменных состояния, объединенных в 60 уравнениях. Базовая модель описывает основные аэробные и анаэробные микробиологические процессы (потребление субстра-

Таблица 1. Значения используемых в модели кинетических параметров анаммокс-бактерий, АОБ и НОБ

Параметр	Значение	Температурный коэффициент	Значение	Температурный коэффициент	Значение	Температурный коэффициент
	анаммокс-бактерии		АОБ		НОБ	
Максимальная удельная скорость роста (1/сут)	0.1	1.1	0.9	1.072	0.7	1.06
Субстратная константа полунасыщения для NH_4 (мг N/л)	2.0	1.0	0.7	1.0	–	–
Субстратная константа полунасыщения для нитрита (мг N/л)	1.0	1.0	–	–	0.05	0.05
Аэробная удельная скорость распада биомассы (1/сут)	0.019	1.029	0.17	1.029	0.17	1.029
Удельная скорость распада биомассы в аноксидных/анаэробных условиях (1/сут)	0.0095	1.029	0.08	1.029	0.08	1.09
Константа ингибирования нитритом K_i (мг N/л)	1000	1.0	0.07	1.0	–	–
Константа нитритной чувствительности (л/(сут мг N))	0	1.0	–	–	–	–
Константа ингибирования аммиаком $K_i(NH_3)$ (ммоль/л)	–	–	–	–	0.075	1.0

тов, образование и распад биомассы, образование продуктов метаболизма), протекающие в ходе биологической очистки сточных вод активным илом, а также реакции химического осаждения, массопереноса газ–жидкость и т.п. В расчетах учитывались следующие процессы биологической трансформации азота: 1) нитрификация до нитрита аммоний-окисляющими бактериями (АОБ); 2) нитрификация до нитрата нитрит-окисляющими бактериями (НОБ); 3) денитрификация; 4) трансформация соединений азота анаммокс-бактериями; 5) потребление азота на нужды биосинтеза; 6) аммонификация отмершей биомассы.

Краткое описание модуля функционирования анаммокс-бактерий. Анаммокс-бактерии осуществляют конверсию аммиака и нитрита в газообразный азот и нитраты. Энергия этого процесса используется для синтеза органического материала фиксацией углекислоты. Источником азота для биосинтеза является аммиак. Эффективная (наблюдаемая) скорость роста анаммокс-бактерий определяется как сумма скорости роста и распада биомассы. Удельная скорость роста анаммокс-бактерий описывается уравнением Моно, в котором аммоний и нитрит – лимитирующие субстраты роста. Скорость роста изменяется с учетом условий окружающей среды: рост прекращается при пороговой концентрации кислорода и ингибируется нитритом, а также ограничивается по основным питательным веществам (фосфаты, неорганический углерод, другие катионы и анионы). Скорость распада биомассы меняется в зависимости от концентрации растворенного кислорода и концентрации нитритов. В последнем случае нитритная токсичность моделируется увеличением скорости распада путем произведения константы нитритной чувствительности и концентрации нитрита. Значения используемых в качестве базовых кинетико-стехиометрических параметров анаммокс-бактерий, а также аммоний- и нитрит-окисляющих бактерий (соответственно, АОБ и НОБ), приведены в таблицах (табл. 1, табл. 2). Значения используемых в BioWin по умолчанию физико-химических параметров не меняли, за исключением случаев, оговоренных в разделе “Результаты и обсуждение”.

В связи с тем, что в наших экспериментах развитие и накопление биомассы происходило в прикрепленной к загрузочному материалу биопленке, в расчетах задействовали модуль, описывающий рост биопленок на поверхности инертного материала. В программе BioWin для этой цели используется 1D-модель роста биопленок и диффузии растворенных веществ и твердых

Таблица 2. Значения используемых в модели стехиометрических коэффициентов анаммокс-бактерий, АОБ и НОБ

Параметр	Анаммокс-бактерии	АОБ	НОБ
Экономический коэффициент (мг химически потребляемого кислорода (ХПК)/мг N)	0.114	0.15	0.09
Образование нитрата в анаммокс-процессе (мг N/мг ХПК биомассы)	2.28	–	–
Азот в биомассе (мг N/мг ХПК биомассы)	0.07	0.07	0.07
Фосфор в биомассе (мг P/мг ХПК биомассы)	0.022	0.022	0.022
Доля бионеразлагаемых остатков после эндогенного распада биомассы	0.08	0.08	0.08
Отношение ХПК/(беззольная биомасса) (мг ХПК/мг беззольного вещества биомассы)	1.42	1.42	1.42

частиц (клеток), разработанная Wanner и Reichert и встроенная в общую модель ASDM (Wanner, Reichert, 1996). Значения используемых в BioWin по умолчанию параметров, описывающих диффузионные процессы и характеристики биопленок, не меняли, за исключением отдельно оговоренных случаев.

Алгоритм расчетов. Учитывая, что расчет по ASDM долгосрочной динамики в биореакторах типа SBR с импульсной подачей свежей среды (в технологии – поступающей сточной воды) занимает длительный период, нами был выбран следующий алгоритм расчетов, состоящий из трех основных этапов.

На первом этапе с использованием BioWin рассчитывали стационарные состояния, полагая, что среда в биореактор подается с постоянной (усредненной по циклу выращивания) скоростью. Полученные стационарные состояния служили исходными состояниями для следующих этапов моделирования.

На втором этапе в динамике рассчитывали изменения, происходящие в системе после смены концентрации аммонийного азота с 200 на 500 мг/л, полагая, как и на первом этапе, что среда в биореактор подается с постоянной (усредненной по циклу выращивания) скоростью.

На третьем этапе рассчитывали динамику основных показателей при импульсном режиме, соответствующем реальному режиму работы биореактора. Исходным состоянием культуры (“посевным материалом”, сосредоточенным в биопленке на загрузке) было стационарное состояние, найденное на первом этапе моделирования.

Схема процесса и исходные данные. Для моделирования использовали упрощенную технологическую схему процесса, включающую источник поступающей сточной воды (подача среды), биореактор с загрузкой и выход отработанной (очищенной) сточной воды (рис. 1). Для расчетов в модель были введены значения состава и соотношения компонентов в подающейся в биореактор среды (табл. 3).

При расчетах динамического поведения системы в режиме импульсной подачи среды (третий этап моделирования) в модель вводили следующее условие: в течение 0.5 ч в биореактор подается свежая среда со скоростью 2 л/ч (содержащая 200 или 500 мг N/л) и отводится равное количество среды для сохранения постоянства объема. Затем в течение 5.5 ч культура развивается в периодическом режиме. Цикл повторяется через каждые 6 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После инокуляции биореактора активным илом в течение первых дней происходило его закрепление на загрузочном материале. При этом содержание свободноплавающих взвешенных веществ снизилось и в дальнейшем не превышало 200 мг/л. В течение эксперимента наблюдалось образование и рост прикрепленной биомассы в виде биопленок, толщина которых через 2–3 мес. работы биореактора достигла нескольких милли-

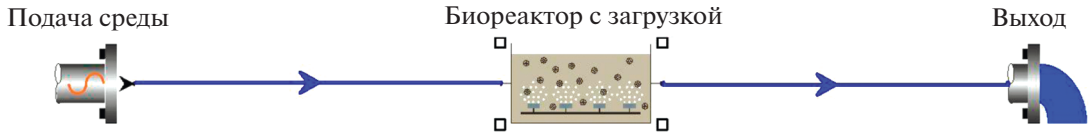


Рис. 1. Используемая в модели схема линии удаления азота из сточной воды.

Таблица 3. Основные компоненты подающейся среды, учитываемые в симуляторе BioWin

Компоненты	Значения
F_{bs} – Легко биоразлагаемое органическое вещество (ацетат) (г ХПК/г общего ХПК)	0.16
F_{ac} – Ацетат (г ХПК/г легко биоразлагаемого ХПК)	0.15
F_{xsp} – Неколлоидное медленно биоразлагаемое вещество (г ХПК/г медленно биоразлагаемого ХПК)	0.75
F_{us} – Растворимое бионеразлагаемое органическое вещество (г ХПК/г суммарного ХПК)	0.05
F_{up} – Твердое бионеразлагаемое органическое вещество (г ХПК/г суммарного ХПК)	0.13
F_{na} – Аммоний (г NH_4–N/г общего азота по Кьельдалю)	0.98
F_{nox} – Органический азот в твердой фазе (г N/г органического N)	0
F_{nus} – Растворенный бионеразлагаемый азот по Кьельдалю (г N/г общего азота)	0
F_{upN} – Отношение N : ХПК для бионеразлагаемой части ХПК (г N/г ХПК)	0
F_{PO_4} – Фосфаты (г PO_4–P/г общего фосфора)	0.5
F_{upP} – Отношение P : ХПК для бионеразлагаемой части ХПК в подающейся среде (г P/г ХПК)	0.011
FZ_{bh} – Гетеротрофные организмы, не относящиеся к фосфат-аккумулирующим организмам (ФАО) (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001
FZ_{bm} – Метанол-потребляющие аноксидные организмы (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001
FZ_{aob} – Аммоний-окисляющие микроорганизмы (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001
FZ_{nob} – Нитрит-окисляющие микроорганизмы (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001
FZ_{amob} – Анаммокс-бактерии (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001
FZ_{bp} – ФАО (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001
FZ_{bpa} – Ацетогеные пропионовокислые бактерии (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001
FZ_{bam} – Ацетотрофные метаногены (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001
FZ_{bhm} – H_2-потребляющие метаногены (г ХПК/г общего ХПК)	0.0001

метров и стабилизировалась. Образовавшиеся биопленки содержали типичные анаммокс-бактерии (рис. 2), и развивающийся в биореакторе консорциум микроорганизмов проявлял выраженную анаммокс-активность. При входной концентрации аммония 200 мг N–NH_4/л содержание аммония на выходе из биореактора (в сливе в конце цикла культивирования) постепенно снижалось, достигнув на 105 сут 26.6 мг N–NH_4/л, а концентрация нитритов и нитратов составила 6.1 и 14.4 мг N/л соответственно. Анализ состава микробного сообщества с помощью метода высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК показал, что из трех основных групп азот-конвертирующих микроорганизмов в биопленках доминировали анаммокс-бактерии, а минорную часть консорциума составляли нитрификаторы второй стадии (Каллистова и соавт., 2020). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в биореакторе сложился стабильный консорциум, эффективно осуществляющий процесс нитритации–анаммокс и удаляющий из подающейся среды 70–80% азота.

При использовании значений параметров, предустановленных в BioWin по умолчанию, стационарных состояний (первый этап моделирования), в которых осуществляется процесс анаммокс, найдено не было. В связи с этим, мы изменили значения следующих коэффициентов, относящихся к свойствам анаммокс-бактерий и физико-химическими характеристикам процессов, протекающих в биопленке:

1) Учитывая опыт выполненных нами ранее работ, мы свели к минимуму константу чувствительности к нитриту, установив ее значение 0 вместо 0.016 (л/сут/мг N) (Дорофеев и соавт., 2017).

2) В связи с тем, что в наших экспериментах наблюдалось образование биопленки значительной толщины, для имитации этого явления мы снизили используемую в BioWin по умолчанию скорость отпрепления биопленки до 8000 г/($м^3$ сут).

3) Для повышения интенсивности массообмена между биопленкой и внешней средой увеличили эффективную скорость диффузии основных азотсодержащих субстратов (табл. 4).

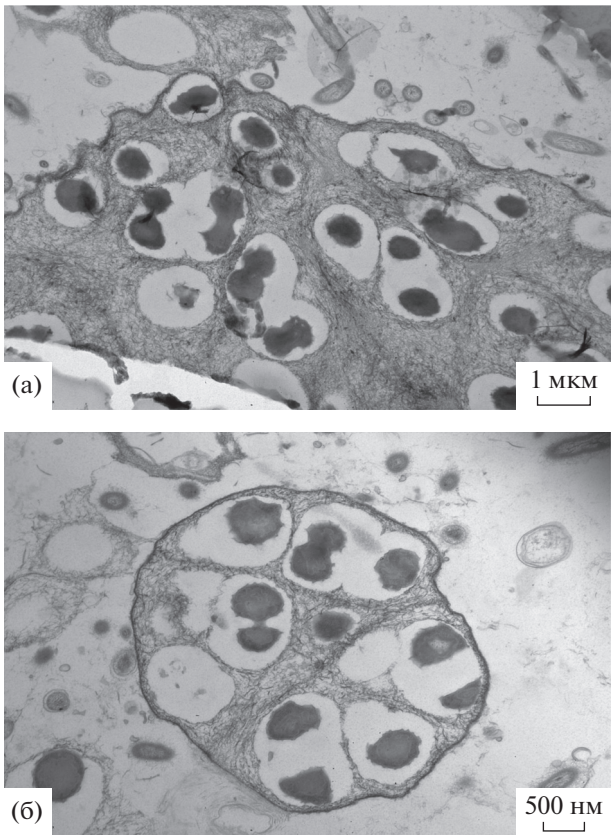


Рис. 2. Микрофотографии ультратонких срезов биопленок. Масштабная метка 2 мкм (а) и 0.5 мкм (б).

После использования в BioWin новых параметров были рассчитаны стационарные состояния, устанавливающиеся при входной концентрации аммония 200 мг $N–NH_4$/л, характеристики которых были близки к результатам, полученным экспериментально (табл. 5).

На следующем этапе нами была рассчитана динамика концентраций минеральных азотсодержащих компонентов в течение нескольких суток с учетом импульсной подачи среды, с использованием в качестве исходных данных (нулевая точка) стационарных значений, полученных на предыдущем этапе моделирования. В результате расчетов была получена пилообразная кривая,

Таблица 4. Значения коэффициентов диффузии, принятые в модели

Показатель	Эффективный коэффициент диффузии ($м^2$/с)	Температурный коэффициент
Аммоний	3.00 × 10 (–9)	1.029
Нитрит	2.98 × 10 (–8)	1.029
Нитрат	2.98 × 10 (–8)	1.029

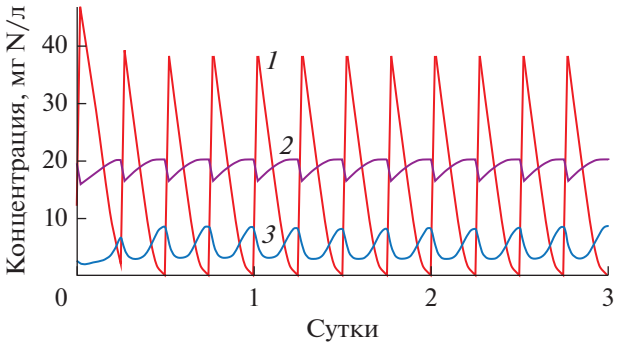


Рис. 3. Расчетная динамика изменения концентраций азотсодержащих компонентов в биореакторе при импульсной подаче среды с концентрацией аммония 200 мг $N–NH_4$ /л. *1* – $N–NH_4$; *2* – $N–NO_3$; *3* – $N–NO_2$.

состоящая из повторяющихся колебаний концентрации аммония, нитритов и нитратов (рис. 3). Воспроизводимость расчетных циклов указывает на то, что в модельной системе установилось квазистационарное состояние. Диапазон изменения расчетных концентраций аммония и нитритов в течение цикла включал в себя экспериментально найденные значения, но концентрация нитратов была в среднем на 28% выше (табл. 6).

Переходный процесс, вызванный увеличением концентрации аммония

В эксперименте после смены концентрации аммония в поступающей среде с 200 на 500 мг N/л, концентрация аммония на выходе из биореактора быстро возрастала до 280–290 мг N/л, и в дальнейшем в течение месяца существенно не менялась (рис. 4). Содержание нитритов и нитратов увеличилось до 9–13 и 11–15 мг N/л соответственно. Эффективность удаления азота из системы снизилась в среднем с 76 до 40–41% (табл. 7). Анализ состава микробного сообщества показал, что смена концентрации аммония в среде принципиально не повлияла на соотношение основных участников превращения азота (неопубликованные данные).

Расчет по модели, предполагающей непрерывный поток среды (второй этап моделирования) показал быстрое увеличение концентрации аммония и снижение эффективности удаления азота с 83 до 43% в течение первых четырех суток после смены концентраций аммония в подающейся среде (рис. 5), что на коротком отрезке времени соответствовало поведению реального сообщества биореактора. Такая же тенденция была получена и при моделировании импульсной подачи среды (третий этап моделирования): через четверо суток концентрация аммония в течение цикла изменялась от 230 до 280 мг $N–NH_4$ /л (рис. 6).

Таблица 5. Расчетные и экспериментально полученные показатели работы биореактора с загрузкой при концентрации аммония в подающейся в реактор среде 200 мг $N–NH_4$/л

	Концентрация в очищенной воде, мг N/л			Эффективность удаления азота, %
	аммоний	нитриты	нитраты	
Экспериментальные данные	26.6	6.1	14.4	76.5
Расчетные стационарные значения	11.9	7.3	10.38	76
Диапазон колебаний при импульсной подаче среды	0–38	3–8.5	16.5–20.2	71–85.5

Таблица 6. Экспериментально полученные и расчетные показатели работы биореактора через четверо суток после смены концентрации аммония с 200 до 500 мг $N–NH_4$/л

	Концентрация в очищенной воде, мг N/л			Эффективность удаления азота, %
	аммоний	нитриты	нитраты	
Экспериментальные данные	280–290	9–13	11–15	36–40
Расчетные значения при непрерывной подаче следы	255	3	22	44
Диапазон колебаний расчетных значений при импульсной подаче среды	230–280	2–3	20–23	40–50

Вместе с тем, моделирование переходного периода на более длительном отрезке времени показало, что постепенно концентрация аммония на выходе из биореактора падает с тенденцией к стабилизации, и через 30 сут расчетная величина составляла 26–27 мг N/л, а эффективность удаления азота повысилась до 80%, что сопоставимо с эффективностью удаления азота при исходной концентрации аммония в подающейся среде 200 мг/л. Расчетные стационарные концентрации аммония, нитритов и нитратов в очищенной воде при входной концентрации аммония 500 мг N/л имели, соответственно, значения 23.4, 48.65 и 45.15 мг N/л, а эффективность удаления азота составила 77%, что существенно расходилось с экспериментальными данными (табл. 7). Такие расхождения результатов эксперимента и моделирования свидетельствуют о том, что долгосрочный переходный процесс, вызванный резкой сменой нагрузки на анаммокс-сообщество по аммонию, не сводится к простому изменению физико-химических и тотальных биологических показателей (концентрации биомассы, толщины биопленки и т.п.), заложенных в используемой модели.

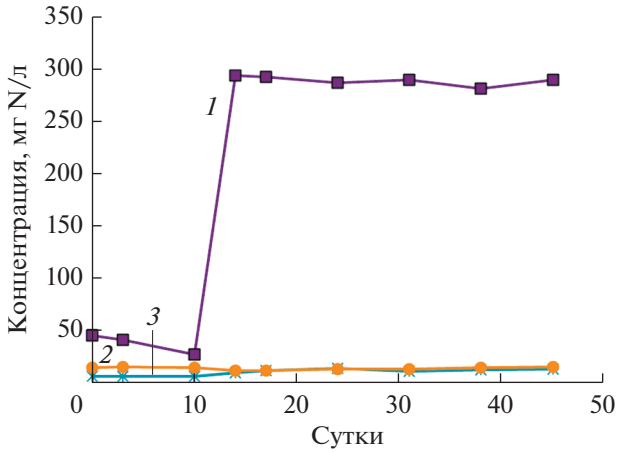


Рис. 4. Экспериментальная динамика концентраций неорганических соединений азота в очищенной воде биореактора до и после увеличения концентрации аммонийного азота с 200 до 500 мг N/л. *1* – $N–NH_4$; *2* – $N–NO_3$; *3* – $N–NO_2$. Время смены концентрации аммония соответствует 10 суткам.

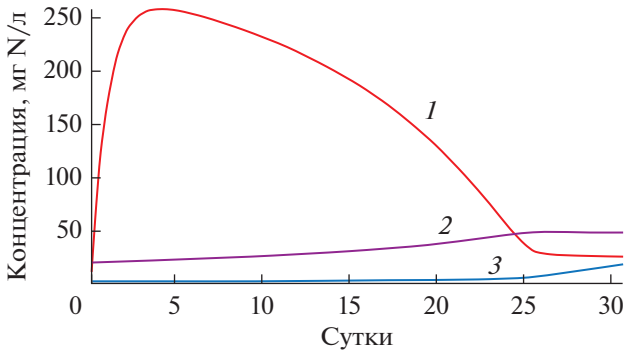


Рис. 5. Расчетная динамика соединений азота в среде в условиях непрерывной подачи среды при скачкообразной смене концентрации аммония с 200 на 500 мг $N–NH_4$/л. *1* – $N–NH_4$; *2* – $N–NO_3$; *3* – $N–NO_2$.

Таблица 7. Сравнение экспериментальных и расчетных стационарных значений эффективности удаления растворимых форм азота

	Эффективность удаления азота, %	
Концентрация аммония в подающейся среде, мг N/л	200	500
Эксперимент	76*	36.5–38.5**
Расчет	83	77

* На 105 сут. работы биореактора.
** Разброс в течение месяца после смены концентрации аммония с 200 на 500 мг N/л.

Ранее в подобных экспериментальных условиях нами уже был исследован переходный период анаммокс-сообщества, вызванный сменой нагрузки по аммонию увеличением его концентрации с 200 до 400 мг/л (Каллистова и соавт., 2020). Как и в настоящей работе, после увеличения нагрузки происходило резкое возрастание концентрации аммония в очищенной воде и падение эффективности удаления азота (с 84 до 46%), не восстанавливающееся в течение месяца. Одинаковая реакция сообщества свидетельствует о наличии специфических механизмов, характерных для переходных процессов, вызванных изменением нагрузки. К сожалению, переходным периодам процесса нитритация–анаммокс, возникающим при переходе от одного стационарного состояния к другому, уделяется недостаточно внимания, а использование симулятора BioWin ограничивается, как правило, оптимизацией работы очистных сооружений в постоянных условиях или прогнозами влияния краткосрочных изменений тех или иных факторов (Jones et al., 2007; Wett et al., 2010; Дорофеев и соавт., 2017). Определенные успехи связаны с использованием других симуляторов и моделированием анаммокс-содержащего гранулированного активного ила для оптимизации режима работы биореакторов SBR-типа (Corbala-Robles et al., 2016; Al-Hazmi et al., 2021). Однако, по нашим данным, систематических исследований переходных состояний с использованием других симуляторов также не проводилось.

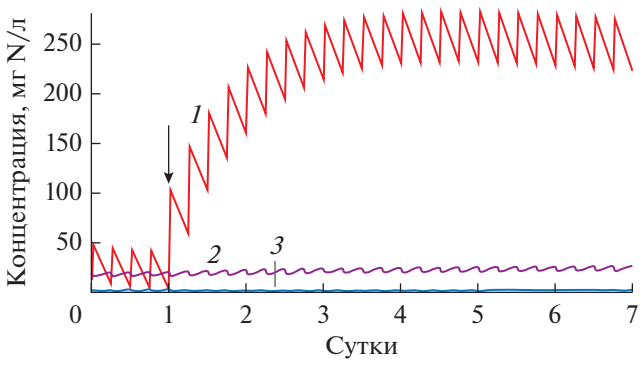


Рис. 6. Расчетная динамика соединений азота в среде в условиях импульсной подачи среды при скачкообразной смене концентрации аммония с 200 на 500 мг $N–NH_4$ /л. *1* – $N–NH_4$; *2* – $N–NO_3$; *3* – $N–NO_2$. Момент смены концентрации аммония показан стрелкой.

Вероятной причиной полученных в нашей работе расхождений эксперимента и расчета могут быть произошедшие в переходный период существенные изменения структурно-функциональных характеристик биопленок или агрегатов, не учитывающиеся при моделировании. Косвенно на наличие таких изменений указывает возникшая необходимость использовать в модели более высокие скорости диффузионных процессов, чем заложены в BioWin по умолчанию. Возможной причиной может быть двуслойность сформированной на загрузке биопленки. При выполнении наших ранних исследований (Каллистова и соавт., 2020) и в настоящей работе было отмечено, что биопленка анаммокс-сообщества состоит из двух частей: во внутренней части, расположенной между волокнами загрузочного материала, создаются условия с затрудненным доступом кислорода, тогда как во внешней, более рыхлой, облегчены диффузионно-массообменные процессы. Также известно, что микроколонии анаммокс-бактерий отличаются наличием мощной экзополисахаридной матрицы, а развитие включающих нитрифицирующие и анаммокс-бактерии биопленок характеризуется не просто нарастанием суммарной прикрепленной биомассы, но затрагивает более сложные структурно-функциональные процессы (Каллистова и соавт., 2016). В этой связи следует отметить открытие у гранул анаммокс-бактерий процесса массообмена, напоминающего легочное дыхание высших организмов (Xu et al., 2019). В соответствии с гипотезой авторов, сформированные гранулы биомассы анаммокс-бактерий способны к сокращению и расширению, наподобие легких, благодаря образованию и выбросу из гранул газовых пузырьков с молекулярным азотом. Такой механизм значительно ускоряет процессы массообмена между агрегатами и жидкой фазой в сравнении с обычной диффузией. Вероятно, развитие таких сложных структур требует большего времени, чем заложенное в моделях нарастание простейшей биопленки, что может быть причи-

ной расхождения экспериментальных и расчетных данных.

Кроме структурных изменений в биопленках, неучтенными в модели факторами могут быть изменение состава микробного сообщества и, соответственно, изменение его биохимических и кинетико-стехиометрических характеристик, изменение свойств материалов обрастания, отложение неорганических веществ. Очевидно, что для более глубокого понимания протекающих в биопленках процессов и повышения прогностической ценности моделирования необходимы дальнейшие экспериментальные исследования биопленок и развитие математического аппарата их описания.

В заключение следует отметить, что результаты наших исследований могут представлять интерес для реальных очистных сооружений, где в цикле очистки сточных вод задействован процесс Анаммокс. Например, в случае аварийных сбросов сточных вод с высоким содержанием аммония процесс восстановления рабочего режима может значительно увеличиваться, что необходимо учитывать для устранения последствий снижения эффективности функционирования анаммокс-реактора.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-08008 мк) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Агарев А.М., Каллистова А.Ю., Пименов Н.В. Моделирование процесса Анаммокс с использованием пакета прикладных программ BioWin // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 88–95.

Dorofeev A.G., Nikolaev Yu.A., Kozlov M.N., Kevbrina M.V., Agarev A.M., Kallistova A.Yu., Pimenov N.V. Modeling of Anammox process with the BioWin software suite // App. Biochem. Microbiol. (Moscow). 2017. V. 53. P. 78–84.

Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачев В.А., Кострикина Н.А., Пелевина А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В. Исследование формирования и развития анаммокс-биопленок методами световой, эпифлуоресцентной и электронной микроскопии // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 700–713.

Kallistova A.Yu., Nikolaev Yu.A., Mardanov A.V., Berestovskaya Yu.Yu., Grachev V.A., Kostrikina N.A., Pelevina A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Investigation of formation and development of anammox biofilms by light, epifluorescence, and electron microscopy // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 708–719.

Каллистова А.Ю., Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Пименов Н.В. Роль анаммоксбактерий в очистке сточных вод от соединений азота // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 126–144.

Kallistova A.Yu., Dorofeev A.G., Nikolaev Yu.A., Kozlov M.N., Kevbrina M.V., Pimenov N.V. Role of anammox bacteria in removal of nitrogen compounds from wastewater // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 140–156.

Кевбрина М.В., Дорофеев А.Г., Агарёв А.М., Козлов М.Н., Николаев Ю.А., Асеева В.Г. Анаммокс – перспективная технология удаления азота из сточных вод // Водоснабжение и санитарная техника. 2019. № 5. С. 28–35.

Сайт компании Envirosim https://envirosim.com/products

Agrawal S., Seuntjens D., Cocker P.D., Lackner S., Vlaeminck S. Success of mainstream partial nitritation/anammox demands integration of engineering, microbiome and modeling insights // Curr. Opin. Biotechnol. 2018. V. 50. P. 214–221.

Al-Hazmi H.E., Lu X., Majtacz J., Kowal P., Xie L., Makinia J. Optimization of the aeration strategies in a deammonification sequencing batch reactor for efficient nitrogen removal and mitigation of N_2O production // Environ. Sci. Technol. 2021. V. 55. P. 1218–1230.

Artan N., Orhon D. Mechanism and Design of Sequencing Batch Reactors for Nutrient Removal. Scientific and Technical Report Series, № 19. London: IWA Publishing, 2005. 116 p.

Baeten J.E., Batstone D.J., Schraa O.J., van Loosdrecht M.C.M., Volcke E.I.P. Modelling anaerobic, aerobic and partial nitritation anammox granular sludge reactors – A review // Water Res. 2019. V. 149. P. 322–341.

Cho S., Kambey C., Nguyen V.K. Performance of anammox processes for wastewater treatment: a critical review on effects of operational conditions and environmental stresses // Water. 2020. V. 12. Art. 20. https://doi.org/10.3390/w12010020

Corbala-Robles L., Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M., Perez J. Analysing the effects of the aeration pattern and residual ammonium concentration in a partial nitritation-anammox process // Environ. Technol. 2016. V. 37. P. 694–702.

Henze M., Gujer W., Mino T., Van Loosdrecht M. Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3 / Eds. IWA Task Group on Mathematical Modelling for Design and Operation of Biological Wastewater Treatment. London.: IWA Publishing, 2000. 121 p. https://doi.org/10.2166/9781780402369

Jones R.M., Dold P.L., Takacs I., Chapman K., Wett B., Murthy S., Shaughnessy M.O. Simulation for operation and control of reject water treatment processes // Proceedings of the Water Environment Federation. 2007. V. 2007. P. 4357–4372. https://doi.org/10.2175/193864707787974599

Lotti T., Kleerebezem R., Lubello C., van Loosdrecht M.C.M. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture // Water Res. 2014. V. 60. P. 1–14.

Ni S.Q., Ahmad H.A., Zhao Y., Li Q., Dong Y., Ahmad S., Cui Z., Qiao Z. Energy-efficient anaerobic ammonia removal: from laboratory to full-scale application // Microbial Bioremediation & Biodegradation / Ed. Shah M.P. Singapore: Springer, 2020. P. 505–526.

Seco A., Ruano M.V., Ruiz-Martinez A., Robles A., Barat R., Serralta J., Ferrer J. Plant-wide modelling in wastewater treatment: showcasing experiences using the Biological Nutrient Removal Model // Water Sci. Technol. 2020. V. 81. P. 1700–1714.

Shao Q., Wan F., Du W., He J. Enhancing biological nitrogen removal for a retrofit project using wastewater with a low C/N ratio – a model-based study // Environ. Sci. Pollut. Res. 2021. P. 1–13.
https://doi.org/10.1007/s11356-021-14396-2

Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. Metcalf and Eddy, McGraw Hill, New York, USA, 2014. 2044 p.

Wang W., Yan Y., Zhao Y., Shi Q., Wang Y. Characterization of stratified EPS and their role in the initial adhesion of anammox consortia // Water. Res. 2020. V. 169. Art. 115223.
https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115223

Wanner O., Reichert P. Mathematical modelling of mixed-culture biofilms // Biotechnol. Bioeng. 1996. V. 49. P. 172–184.

Wett B., Nyhuis G., Takacs I., Murthy S. Development of enhanced deammonification selector // Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference. New Orleans, Louisiana. 2010. P. 5917.
https://doi.org/10.2175/193864710798194139

Xu D., Kang D., Yu T., Ding A., Lin Q., Zhang M., Hu Q., Zheng P. A secret of high-rate mass transfer in anammox granular sludge: "Lung-like breathing" // Water Res. 2019. V. 154. P. 189–198.
https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.039

Effect of Abrupt Increase in Ammonium Load on Activity of the Anammox Bacterial Community in a Sequencing Batch Reactor

A. G. Dorofee[2, *], Yu. A. Nikolaev[1], V. A. Grachev[1], A. Yu. Kallistova[1], Yu. Yu. Berestovskaya[1], and N. V. Pimenov[1]

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

[2]*Institute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

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

Received July 15, 2021; revised July 26, 2021; accepted July 27, 2021

Abstract—The transition process caused by an abruptly increased ammonium load (2.5-fold) on the microbial community of a sequential batch reactor carrying out nitrogen removal from the water via nitritation-anammox was studied. The community developed in the bioreactor at incoming ammonium concentration of 200 mg N/L removed 76.5% of the inflowing nitrogen and was satisfactorily described by the BioWin mathematical simulator with corrected coefficients. Abrupt increase of nitrogen load from 200 to 500 mg N/L resulted in ammonium concentration at the reactor outlet increasing from 27 to 280–290 mg N/L, with nitrogen removal efficiency dropping to 40%. The calculation using the BioWin simulator showed that the efficiency of the nitritation-anammox process should increase in the course of a month and stabilize at the level close to the original one (76.5%). However, experimental data did not support this calculation: no increase in efficiency was observed during this period. Changes in the structural and functional characteristics of the biofilms and aggregates, which were not accounted for in the model, were probably responsible for discrepancies between the experimental and calculated data.

Keywords: anammox process, anammox community, nitritation, mathematical simulation, BioWin, wastewater treatment

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 738–746

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИНГИБИРОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ В ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ LH2 И LH1-RC ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *THERMOCHROMATIUM TEPIDUM*

© 2021 г.
М. А. Большаков[a], *, А. А. Ашихмин[a], З. К. Махнева[a], А. А. Москаленко[a]

[a] *Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Московская обл., Пущино, 142290 Россия*

**e-mail: lfbv22@gmail.com*

Поступила в редакцию 12.04.2021 г.
После доработки 02.06.2021 г.
Принята к публикации 07.06.2021 г.

Изучено влияние качественного и количественного содержания каротиноидов на сборку светособирающих комплексов, выделенных из термоустойчивой пурпурной серной бактерии *Thermochromatium* (*T.*) *tepidum*. Для уменьшения содержания каротиноидов в фотосинтетических мембранах и комплексах использовали ингибитор каротиноидгенеза – дифениламин (ДФА). Минимальное содержание каротиноидов составило 40% при выращивании клеток *T. tepidum* в присутствии 120 мкМ ДФА. При повышении концентрации ДФА рост культуры останавливался. Из ДФА-клеток были выделены фотосинтетические ДФА-мембраны и ДФА-комплексы LH2 и LH1-RC, содержание каротиноидов в которых составило 45 и 55% соответственно. Их спектральные характеристики в ближней ИК-области не зависели от количества каротиноидов в комплексах и были аналогичны характеристикам нативных комплексов дикого типа. Одновременно с общим уменьшением содержания каротиноидов, в ДФА-комплексах появлялись каротиноиды из более ранних этапов биосинтеза, такие как нейроспорин, ζ-каротин и их гидрокси-производные. Появление в ДФА-комплексах каротиноидов с более короткой, чем в контроле цепью сопряженных двойных связей приводило к увеличению эффективности переноса энергии с каротиноидов на бактериохлорофилл.

Ключевые слова: каротиноиды, ВЭЖХ, пигмент-белковые комплексы, пигмент-содержащие мембраны

DOI: 10.31857/S0026365621060045

Фотосинтезирующие бактерии имеют достаточно простой фотосинтетический аппарат. Его светособирающая антенна состоит из двух типов пигмент-белковых комплексов: периферийного LH2 и прицентрового LH1, которые располагаются во внутренней цитоплазматической мембране (Cogdell et al., 2006). Комплекс LH1 окружает реакционный центр (RC), образуя с ним коровый комплекс или комплекс LH1–RC. Оба светособирающих комплекса получены в чистом виде и хорошо изучены (Cogdell et al., 2006; Gabrielsen et al., 2009). В зависимости от вида бактерии комплекс LH1 в ближней ИК-области имеет основной максимум поглощения при ≥865 нм, а комплекс LH2 – два максимума (при ~800 и ~850 нм) (Cogdell et al., 2006; Gabrielsen et al., 2009). Эти комплексы построены у пурпурных бактерий по аналогичному модульному принципу и состоят из двух типов полипептидов (α и β), бактериохлорофилла (БХл) и каротиноидов (Cogdell et al., 2006). Основной структурной субъединицей светособирающих комплексов является состоящий из α- и β-полипептидов α/β-гетеродимер, с которым нековалентно связаны молекулы БХл и каротиноидов. В комплексе LH2 это три молекулы БХл (одна БХл800 и две БХл850), в комплексе LH1 – две молекулы БХл870–890 и по одной молекуле каротиноида на каждый α/β-гетеродимер (Gabrielsen et al., 2009). У несерных пурпурных бактерий комплексы LH2 состоят из 8–9 α/β-гетеродимеров (McDermott et al., 1995; Koepke et al., 1996), а комплекс LH1 – из 16 (Roszak et al., 2003). В комплексе LH2 содержится 24–27 молекул БХл и 8–9 молекул каротиноидов, а в LH1 – 32 молекулы БХл и 16 молекул каротиноидов. Согласно модели, описанной в работе (Löhner et al., 2015), у серных пурпурных бактерий комплекс LH2 может состоять из 12 пар α/β-гетеродимеров, как, например, у *Allochromatium vinosum*, и обладать более сложным пептидным составом. В клетках данной бактерии обнаружено шесть разных пар α- и β-полипептидов (Carey et al., 2014). Они в разном сочетании присутствуют в комплексе LH2. Также получены данные о том, что комплекс LH2 из пурпурной серной бактерии

Ectothiorhodospira (*Ect.*) *haloalkaliphila* похож на комплекс LH2 из *Rhodospirillum molischianum* и представляет собой октамер, состоящий из 8 пар α/β-гетеродимеров (Leiger et al., 2019). Молекулы каротиноидов, которые могут содержать различное количество сопряженных двойных связей (СДС), расположены в светособирающих комплексах между α/β-полипептидами, в так называемых "каротиноидных карманах" и взаимодействуют как с аминокислотными остатками обоих полипептидов, так и с молекулами БХл (Cogdell et al., 2006).

В настоящее время все еще не установлены механизмы сборки светособирающих комплексов *in vivo*. Известно только, что сборка светособирающих комплексов проходит в цитоплазматической мембране бактерий. Затем путем инвагинации этой мембраны комплексы переносятся внутрь клетки с образованием внутрицитоплазматических мембран – хроматофоров (Niederman, 2006). Понятно, что для осуществления этого процесса должны совмещаться биосинтезы α- и β-полипептидов, БХл и каротиноидов. Для изучения сборки комплексов *in vivo* необходимо сравнивать свойства этих объектов с каротиноидами, БХл, α- и β-полипептидами и без них. Однако получить жизнеспособные клетки и комплексы в настоящий момент удается только без каротиноидов.

Имеется много данных о том, что комплекс LH2 типа B800–850 у бескаротиноидных мутантов пурпурных несерных бактерий не собирается (Chi et al., 2015). Для пурпурных серных бактерий получение бескаротиноидных комплексов возможно с помощью ингибирования биосинтеза каротиноидов с помощью дифениламина (ДФА), что позволяет получить полный набор этих комплексов с сохранением нативных спектральных характеристик БХл в ИК-области (Moskalenko, Makhneva, 2012; Ashikhmin et al., 2014; Большаков и соавт., 2015, 2016). Однако этот метод имеет ограничения и подходит не для всех видов пурпурных серных бактерий.

В настоящее время среди фотосинтезирующих бактерий особое внимание получила пурпурная серная бактерия *Thermochromatium* (*T.*) *tepidum*. Она была выделена Мадиганом в 1984 г. из термальных источников Йеллоустонского национального парка и отличается от всех известных пурпурных бактерий тем, что ее оптимальная температура роста близка к 50°C (Madigan, 1984). Подобно другим фотосинтезирующим бактериям, она содержит БХл *a*, растет автотрофно и окисляет сульфид до элементарной серы, которая находится внутри клетки. Поскольку в настоящее время известно только две культуры (*Alc. vinosum* штамм МГУ и *Ect. haloalkaliphila*), в которых удается полностью подавить биосинтез каротиноидов и сохранить светособирающий комплекс LH2 с нативными спектральными характеристиками (Moskalenko, Makhneva, 2012; Ashikhmin et al., 2014; Большаков и соавт., 2015, 2016), то целью данной работы был поиск других бактерий, соответствующих этим условиям. Причиной выбора для исследования культуры *T. tepidum* является ее рост при температуре 50°C (Madigan, 1984), что делает возможным получение более устойчивых комплексов LH2 с минимальным содержанием каротиноидов, поскольку известно, что у *Alc. vinosum* и *Ect. haloalkaliphila* бескаротиноидные комплексы LH2 очень лабильны и легко разрушаются при воздействии температуры и детергентов (Ashikhmin et al., 2014; Большаков и соавт., 2015, 2016).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и условия культивирования. Клетки *T. tepidum* ATCC 43061 выращивали на модифицированной среде ATCC 1449 (2000 лк; 48°C) (Madigan, 1984). В качестве источника света использовали лампы накаливания мощностью 75 Вт. Клетки собирали в стационарной фазе роста (4–6 сут). Полученную биомассу использовали сразу или хранили при –20°C. Для ингибирования биосинтеза каротиноидов использовали разные концентрации ДФА: 71 и 120 мкМ. Собранные клетки разрушали с помощью ультразвука с использованием генератора УЗГ13-0.1-22 ("Ультразвуковая техника", Россия). Неповрежденные клетки и фрагменты клеточных стенок осаждали на центрифуге K24 ("Janetzki", Германия) в течение 10 мин при 10000 об./мин. Пигмент-белковые комплексы выделяли методом электрофореза в ПААГ (Москаленко, Ерохин, 1974). Образцы концентрировали центрифугированием в пробирках Amicon Ultra 50 K ("Millipore", США).

Анализ каротиноидов. Пигментный анализ мембран, пигмент-белковых комплексов и изолированных каротиноидов проводили с помощью ВЭЖХ системы Shimadzu ("Shimadzu", Япония), используя колонку с обращенной фазой Agilent Zorbax SB-C18 5 мкм 4.6 × 250 мм ("Agilent", США). Установка для ВЭЖХ в этом случае состояла из насоса LC-10ADVP с модулем FCV-10ALVP, который позволял создавать градиент растворителей на стороне низкого давления, детектора с диодной матрицей SPD-M20A и термостата CTO-20AC. Скорость подачи растворителей была 1 мл/мин (Makhneva et al., 2008; Большаков и соавт., 2015, 2016). Каротиноиды идентифицировали путем сравнения с известными образцами из различных штаммов бактерий в соответствии с их спектрами поглощения, временем выхода с колонки и молярным коэффициентом экстинкции (Connor, 1991; Gall et al., 2005).

Методы спектроскопии. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Cary 50 ("Agilent Technology", США). Спектры возбуж-

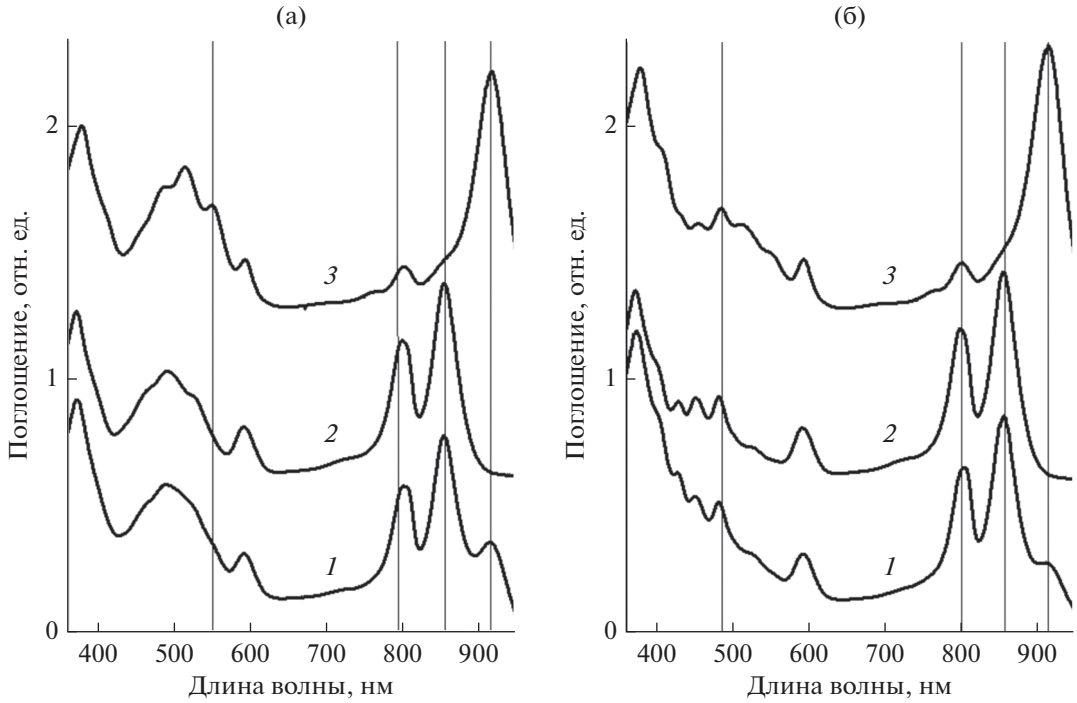


Рис. 1. Спектры поглощения мембран (*1*) и пигмент-белковых комплексов LH2 (*2*) и LH1-RC (*3*), полученных из контрольных (а) и ДФА-клеток (б) *T. tepidum*. Для лучшего восприятия спектры *2* и *3* сдвинуты вверх на 0.5 и 1.7 опт. ед. относительно спектра *1* соответственно.

дения флуоресценции (область возбуждения 300–650 нм) получали с помощью модифицированного спектрофлуориметра Cary Eclipse (“Agilent Technology”, США). Модификация заключалась в замене стандартного ФЭУ (R3896) на последнюю модель ФЭУ (R13456, “Hamamatsu”). Тем самым нам удалось увеличить рабочую область спектрофлуориметра до 950 нм вместо 830 нм у стандартного прибора. Перенос энергии возбуждения от каротиноидов на БХл определяли на длине волны 500 нм (Niedzwiedzki et al., 2011) по кривой $F_{\mathrm{fluexc}}(\lambda)/(1 - T(\lambda))$ по методике (Razjivin et al., 2021), где $F_{\mathrm{fluexc}}(\lambda)$ – корректированный спектр возбуждения флуоресценции БХл, а $(1 - T(\lambda)) = (1 - 10^{-A(\lambda)})$, где T – пропускание, $A(\lambda)$ – оптическое поглощение образца после вычитания кривой светорассеяния. Спектры кругового дихроизма регистрировали на спектрополяриметре Chirascan (“Applied Photophysics”, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В спектре поглощения фотосинтетических мембран *T. tepidum* (рис. 1а, спектр *1*) максимумы поглощения БХл локализованы при 800, 856 и 915 нм (Qy – переходы БХл). Полосы поглощения с максимумами при 800 и 856 нм принадлежат комплексу LH2 (рис. 1а, спектр *2*), а при 915 нм – комплексу LH1 (рис. 1а, спектр *3*). При низкотемпературных измерениях в спектре поглощения этого комплекса LH2 полоса B800 расщепляется на 2 отдельные полосы (как и у *Alc. vinosum*) (Carey et al., 2014). Этот эффект связан с тем, что в состав комплекса LH2 могут входить три различные пары α- и β-полипептидов, с которыми молекулы БХл800 могут иметь различные взаимодействующие лиганды в каждой α/β-субъединице.

Полоса поглощения комплекса LH1 (при 915 нм) более сдвинута в длинноволновую область (рис. 1а, спектр *3*) по сравнению с другими представителями семейства *Chromateaceae*, что, вероятно, связано с присутствием в нем ионов Ca^{2+}, которые определяют термоустойчивость этой культуры (Niwa et al., 2014).

Был изучен каротиноидный состав контрольных комплексов методом ВЭЖХ. В выделенных из *T. tepidum* комплексах LH2 преобладают родопин (43.9%, СДС = 11), дидегидрородопин (29.9%, СДС = 12) и ангидрородовибрин (11.2%, СДС = 12), а в комплексе LH1-RC – спириллоксантин (51.5%, СДС = 13) (табл. 1). Содержание каротиноидов в комплексах LH2 данной бактерии ранее было изучено разными группами исследователей. Было показано, что основными каротиноидами в комплексе LH2 являются родопин (66%), спириллоксантин (20%) и ангидрородовибрин (9%) (Yang et al., 2010). В работе Niedzwiedzki et al. (2011) значения следующие: родопин (35%), спи-

Таблица 1. Каротиноидный состав (мол. %) контрольных и ДФА-мембран и комплексов LH2 и LH1-RC, выделенных из клеток *T. tepidum*

Каротиноид	Дикий тип			ДФА		
	мембраны	комплекс LH2	комплекс LH1-RC	мембраны	комплекс LH2	комплекс LH1-RC
Деметилспириллоксантин	1.0	0.2	1.9	–	–	–
Родовибрин	1.3	0.4	2.0	–	–	–
Дидегидрородопин	24.0	29.9	5.6	1.9	3.2	1.2
Родопин	44.9	43.9	26.9	8.3	9.4	11.7
Спириллоксантин	14.6	9.6	51.5	0.9	–	12.4
OH-нейроспорин	0.6	0.6	Следы	15.3	22.7	8.4
OH-ζ-каротин	–	–	–	6.5	5.9	3.4
Ангидрородовибрин	9.5	11.2	9.8	0.6	0.6	1.7
Ликопин	3.9	4.2	1.6	–	–	–
Нейроспорин	Следы	Следы	0.1	0.4	–	4.5
ζ-Каротин	0.2	Следы	0.6	4.7	1.2	11.8
OH-сфероиден*		–	–	1.4	2.1	–
СКК*	–	–	–	60.0	55.0	45.0

Примечание. * СКК – свободные каротиноидные карманы. Прочерк – каротиноиды не обнаружены.

риллоксантин (40%), родовибрин (25%, СДС = 12) и ангидрородовибрин (25%). Наблюдаемые различия в каротиноидном составе могут отражать гибкость пути каротиноидгенеза у этой бактерии в различных условиях роста. Более того, комплексы LH2 из *T. tepidum* могут быть гетерогенны по каротиноидному составу, как показано для такого представителя семейства *Chromatiaceae*, как *Alc. minutissimum* (Makhneva et al., 2008).

Особо отметим, что в мембранах и комплексах *T. tepidum* в следовых количествах обнаруживались нейроспорин и его гидрокси-производная (табл. 1), что нехарактерно для культур пурпурных серных бактерий, у которых работает четырехстадийная фитоиндесатураза, и биосинтез каротиноидов идет по спириллоксантиновому пути (Takaichi, 2009). Присутствие этих каротиноидов можно объяснить тем, что высокая температура (50°C), при которой данная бактерия обитает в естественной среде, является причиной сбоя в работе четырехстадийной фитоиндесатуразы, в результате чего промежуточные продукты ее работы встраиваются в комплексы LH2 и LH1-RC.

Обычно для выращивания бактерий *Alc. vinosum* шт. МГУ и *Ect. haloalkaliphila* с полностью подавленным биосинтезом каротиноидов использовали 71 мкМ (12 мг/л) ДФА (Москаленко и соавт., 1991; Makhneva et al., 2008; Ashikhmin et al., 2014; Большаков и соавт., 2015). Однако в случае *T. tepidum* при использовании данной концентрации ингибитора достичь желаемого результата не удалось. В клетках присутствовало значительное (≥80%) количество каротиноидов. При повышении концентрации до 120 мкМ ДФА рост клеток замедлялся вдвое, а содержание каротиноидов в клетках снижалось до 40% по сравнению с клетками дикого типа. Получить клетки с более низким содержанием каротиноидов не удалось. Возможно, это связано с высоким температурным оптимумом для роста этой бактериальной культуры (48°C). При этой температуре ДФА мог частично деградировать, и его эффективная концентрация в среде культивирования падала.

Из полученных ДФА-клеток были выделены фотосинтетические мембраны и светособирающие комплексы (рис. 1б). Максимумы полос поглощения БХл в ДФА-мембранах и комплексах (рис. 1б) не изменились (800, 856 и 915 нм) по сравнению с контролем. Это свидетельствует о сохранении принципов сборки ДФА-комплексов LH2 и LH1-RC. В спектре поглощения последних заметно уменьшилась амплитуда полос поглощения каротиноидов (420–550 нм), и произошло смещение их максимумов. Это указывает на изменение качественного и количественного содержания каротиноидов в этих образцах (рис. 1б, спектры *2*, *3*).

В ДФА-мембранах из *T. tepidum* преобладали нейроспорин, ζ-каротин и их гидрокси-производные. В ДФА-комплексе LH2 основными каро-

тиноидами были ОН-нейроспорин и родопин, а в ДФА-комплексе LH1-RC – спириллоксантин, родопин, а также производные нейроспорина. Необычно, что в ДФА-комплексе LH1-RC содержание каротиноидов было выше (55%), чем в ДФА-комплексе LH2 (45%). В случае *Alc. vinosum* шт. МГУ и *Ect. haloalkaliphila* при ингибировании биосинтеза каротиноидов с помощью ДФА больший эффект всегда отмечался в комплексе LH1-RC (Makhneva et al., 2008; Ashikhmin et al., 2014; Большаков и соавт., 2017). Отметим, что в ДФА-мембранах *T. tepidum* количество предшественников каротиноидов – фитоина и фитофлуина к отношению окрашенных каротиноидов составляет 0.74 (М/М). В выделенных ДФА-комплексах они отсутствуют, что указывает на неспецифическое связывание фитоина и фитофлуина в мембранах.

Отметим, что в ДФА-мембранах и ДФА-комплексах LH2 был обнаружен в небольшом количестве ОН-сфероиден (табл. 1, рис. 2), который был идентифицирован по спектру поглощения и по времени удержания на колонке (Connor, 1991). Гидрокси-производное сфероидена не является обычным продуктом спириллоксантиновой ветви биосинтеза каротиноидов, а характерно для сфероиденового пути биосинтеза. Ее появление может быть связано с образованием в ДФА-клетках нейроспорина как отдельного продукта, который не вовлекается в синтез ликопина. Нейроспорин является конечным продуктом работы трехстадийной фитоиндесатуразы (фитоин → фитофлуин → → ζ-каротин → нейроспорин), найденной в клетках несерных бактерий (Takaichi, 2009). Нейроспорин является начальным звеном в биосинтезе сфероидена у *Rhodobacter sphaeroides* (Cogdell et al., 2006). Для дальнейшего превращения нейроспорина в сфероиден необходима работа гидратазы (CrtC), десатуразы (CrtD) и метилтрансферазы (CrtF) (Chi et al., 2015). Очевидно, присутствие спириллоксантина в ДФА-клетках связано с активностью этих ферментов. В результате их работы происходит образование из нейроспорина небольшого количества сфероидена, который может присоединить ОН-группу с помощью фермента гидратазы (CrtC), в результате чего образуется ОН-сфероиден. Ранее присутствие подобного каротиноида было обнаружено при ингибировании биосинтеза каротиноидов у пурпурной серной бактерии *Alc. vinosum* ATCC 17899 (Большаков и соавт., 2016).

Хорошо известно, что в комплексах LH2 пурпурных бактерий один α/β-гетеродимер нековалентно связывает только одну молекулу каротиноида. Комплексы LH2 из *T. tepidum* по своим спектральным свойствам похожи на комплексы LH2 из *Alc. vinosum*, состоящие из 12 α/β-гетеродимеров, поэтому предположим, что у *T. tepidum* комплекс LH2 также состоит из 12 α/β-гетеродимеров. Таким образом, у *T. tepidum* на один ДФА-комплекс LH2 приходится в среднем 5 молекул каротиноидов (12*0.4~5). Согласно ранее выявленной гетерогенности комплексов LH2 по каротиноидному составу (Makhneva et al., 2008) это может означать присутствие в популяции отдельных комплексов, содержащих как ≥5, так и <5 молекул каротиноидов. Теоретически мы можем говорить также о присутствии у *T. tepidum* бескаротиноидных комплексов LH2. В пользу этого предположения можно привести опыт по изучению термостабильности у ДФА-комплексов LH2 из *Rbl. acidophilus* с ~46%-ным содержанием каротиноидов. Из этих комплексов с помощью термической обработки удалось получить фракцию комплексов LH2 со средним содержанием каротиноидов 90% и фракцию разрушенных ДФА-комплексов LH2 с содержанием каротиноидов менее 1 молекулы на комплекс. Это указывает на возможное существование двух пулов комплексов. Первый – без каротиноидов и второй – с некоторым содержанием каротиноидов, по-видимому, с 1 и более молекулами каротиноидов на комплекс.

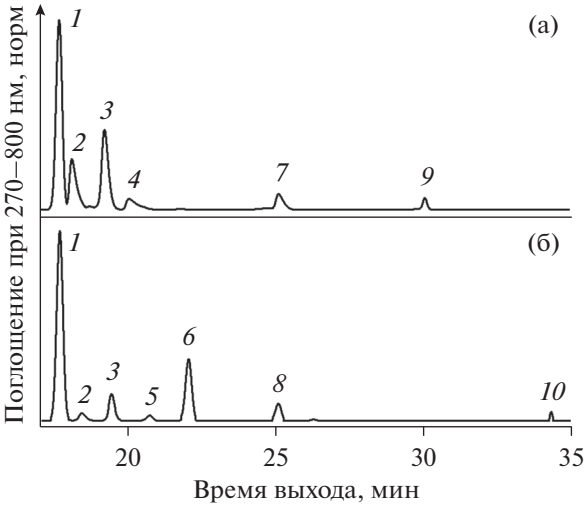


Рис. 2. Часть ВЭЖХ хроматограммы экстрактов пигментов из контрольных (а) и ДФА (б) комплексов LH2 из *T. tepidum*. Идентификация пиков: *1* – БХл; *2* – дидегидрородопин; *3* – родопин; *4* – спириллоксантин; *5* – ОН-сфероиден; *6* – ОН-нейроспорин; *7* – ангидрородовибрин; *8* – ОН-ζ-каротин; *9* – ликопин; *10* – ζ-каротин. Хроматограмма записана при 270–800 нм. Хроматограммы нормированы по содержанию БХл (пик *1*).

Одна из основных функций каротиноидов в фотосинтезе – перенос энергии возбуждения (ПЭВ) к БХл, поэтому мы оценили данный параметр во всех выделенных пигмент-белковых комплексах. ПЭВ определяли с учетом светорассеяния, как описано в разделе “Материалы и методы исследования”. Для контрольных комплексов LH2 и LH1-RC величина ПЭВ составила 40.5 и 40.9% соответственно (рис. 3). Снижение содержания

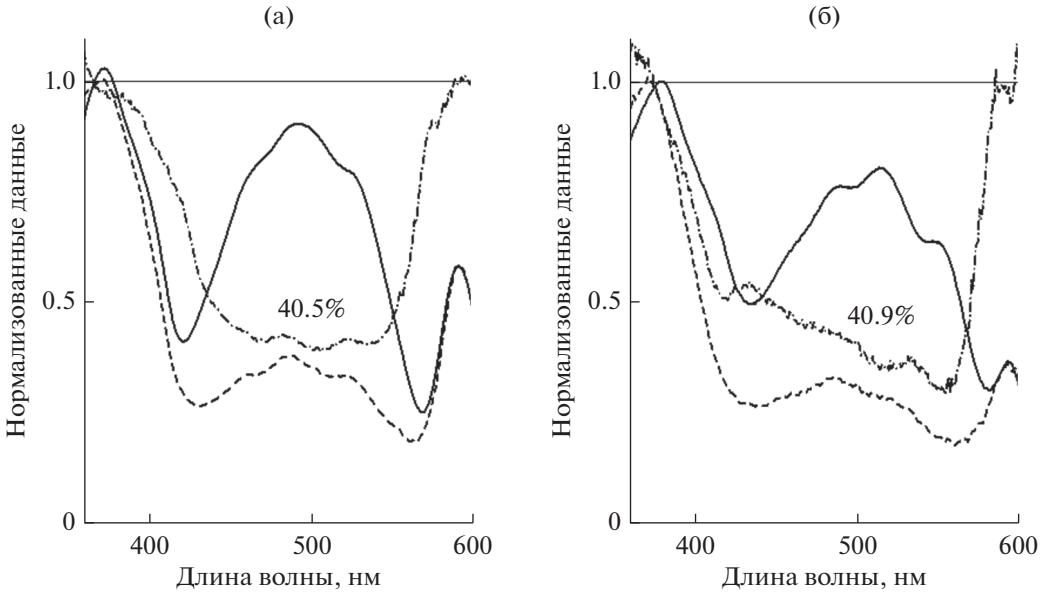


Рис. 3. Перенос энергии возбуждения (ПЭВ) от каротиноидов к БХл в контрольных комплексах LH2 (а) и LH1-RC (б) из *T. tepidum*. Сплошная линия – оптическое поглощение образца после вычитания кривой светорассеяния ($1 - T(\lambda)$), пунктирная линия – корректированный спектр возбуждения флуоресценции БХл ($F_{\text{flu exc}}(\lambda)$), а штрихпунктирная линия – ПЭВ ($F_{\text{flu exc}}(\lambda)/(1 - T(\lambda))$).

каротиноидов приводило к увеличению ПЭВ в ДФА-комплексе LH2 до 76.6%, а в ДФА-комплексе LH1-RC до 65.1%.

Отметим, что, несмотря на различия в каротиноидном составе контрольных комплексов LH2 и LH1-RC (табл. 1), ПЭВ у них был практически идентичным. Разница в каротиноидном составе между контрольными и ДФА-комплексами LH2 и LH1-RC заключается в снижении содержания длинноволновых каротиноидов: спириллоксантина (13 СДС), ангидрородовибрина (12 СДС), а также дидегидрородопина (12 СДС) и родопина (11 СДС) и появлении в больших количествах каротиноидов с более коротким хромофором: нейроспорина (7 СДС), ζ-каротина (5 СДС) и их гидрокси-производных (табл. 1). Можно сделать вывод, что увеличение содержания каротиноидов с более короткой цепью СДС (табл. 1), приводит к увеличению показателя ПЭВ в ДФА-комплексах LH2 по сравнению с контролем. Эти результаты согласуются с литературными данными и общепризнанным мнением, что каротиноиды с более короткой цепью СДС с более высокой эффективностью переносят энергию на БХл (Niedzwiedzki et al., 2020). Если рассчитывать показатель ПЭВ без учета светорассеяния, то получатся в два раза меньшие значения. При данной методике расчета ПЭВ для контрольных и ДФА-комплексов LH2 составил 25%, что совпадает с данными работы (Niedzwiedzki et al., 2011), где светорассеяние не учитывалось.

Мы предполагаем, что, хотя каротиноиды в комплексах LH2 и LH1-RC обладают общими свойствами, их эффективность в передаче энергии на БХл также зависит от специфических характеристик самих комплексов, в которых они находятся. Вероятно, что на этот процесс существенное влияние оказывает аминокислотное окружение α- и β-полипептидов, из которых и построены комплексы LH2 и LH1-RC.

Измерение сигнала кругового дихроизма (КД) в области 220–600 нм показало зависимость между содержанием каротиноидов в комплексах и интенсивностью сигнала КД этих пигментов (рис. 4). В спектрах КД контрольных комплексов LH2 из *T. tepidum* отмечены положительные полосы с максимумами при 345, 360, 385, 515, 540 и 590 нм и отрицательные – с максимумами при 300, 412 и 455 нм. В ДФА-комплексах в спектре КД отмечена тенденция к уменьшению как положительных, так и отрицательных сигналов, что коррелирует с уменьшением содержания каротиноидов. В спектре КД контрольных и ДФА-комплексов LH1-RC основные максимумы смещены в длинноволновую область на 10–20 нм по сравнению с аналогичными комплексами LH2: положительные при 345, 375, 395, 525, 560 и 590 нм и отрицательные при 325 и 475 нм. Форма КД-спектров комплексов LH2 и LH1-RC из *T. tepidum* и других изученных пурпурных серных бактерий отличаются незначительно, что указывает на схожие принципы их организации и пространственное расположе-

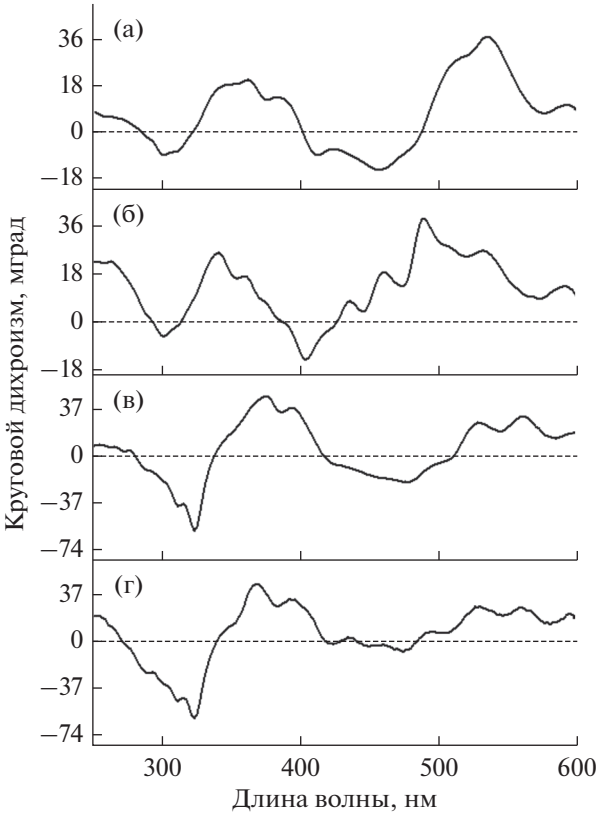


Рис. 4. Спектры КД контрольных комплексов LH2 (а), ДФА-комплексов LH2 (б), контрольных комплексов LH1-RC (в) и ДФА-комплексов LH1-RC (г) из *T. tepidum*.

ние в них каротиноидов (Moskalenko, Karapetyan, 1996).

Исходя из полученных данных, можно сделать несколько выводов:

1) показана возможность сборки ДФА-комплексов LH2 и LH1-RC из *T. tepidum* с уменьшенным содержанием каротиноидов по сравнению с комплексами дикого типа;

2) спектральные характеристики ДФА-комплексов в ближней ИК-области были аналогичны характеристикам нативных комплексов дикого типа;

3) с увеличением концентрации ДФА в среде культивирования одновременно с общим уменьшением количественного содержания каротиноидов в комплексах появляются каротиноиды из более ранних этапов биосинтеза, такие как нейроспорин, ζ-каротин и их гидрокси-производные;

4) показано, что эффективность передачи энергии от каротиноидов к БХл в контрольных и ДФА-комплексах LH2 зависела от состава каротиноидов в образцах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Роберту Э. Бланкеншипу (Washington University in St. Louis, США) за предоставление культуры *T. tepidum*, Б.С. Мельнику (Институт белка РАН) за помощь в измерении спектров КД, а также З.А. Журавлевой (ИФПБ РАН) за помощь в выращивании культуры *T. tepidum*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-1352.2021.1.4). Представленные на рис. 1–2 результаты получены в рамках государственного задания № 121040200027-1.

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

Большаков М.А., Ашихмин А.А., Махнева З.К., Москаленко А.А. Периферийный светособирающий комплекс LH2 может собираться в клетках пурпурной несерной бактерии *Rhodoblastus acidophilus* без каротиноидов // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 1420–1430.

Bolshakov M.A., Ashikhmin A.A., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A. Peripheral light harvesting LH2 complex can be assembled in cells of nonsulfur purple bacterium *Rhodoblastus acidophilus* without carotenoids // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 1169–1177.

Большаков М.А., Ашихмин А.А., Махнева З.К., Москаленко А.А. Влияние интенсивности освещения и ингибирования биосинтеза каротиноидов на сборку периферийных светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Allochromatium vinosum* ATCC 17899 // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 403–414.

Bolshakov M.A., Ashikhmin A.A., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A. Effect of illumination intensity and inhibition of carotenoid biosynthesis on assembly of peripheral light-harvesting complexes in purple sulfur bacteria *Allochromatium vinosum* ATCC 17899 // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 420–429.

Большаков М.А., Ашихмин А.А., Махнева З.К., Москаленко А.А. Встраивание спириллоксантина в пигмент-белковые комплексы LH2 и LH1-RC пурпурной серной бактерии *Allochromatium minutissimum* // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 538–550.

Bolshakov M.A., Ashikhmin A.A., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A. Spirilloxanthin incorporation into the LH2 and LH1-RC pigment-protein complexes from a purple sulfur bacterium *Allochromatium minutissimum* // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 403–414.

Москаленко А.А., Бриттон Ж., Коннор А., Йанг А., Торопыгина О.А. Содержание каротиноидов в хроматофорах и пигмент-белковых комплексах, выделенных из клеток *Chromatium minutissimum* // Биол. мембраны. 1991. V. 8. P. 249–260.

Moskalenko A.A., Britton J., Connor A., Yang A., Toropygina O.A. The content of carotenoids in chromatophores and pigment-protein complexes isolated from *Chromatium minutissimum* cells // Biol. Membranes. 1991. V. 8. P. 249–260 (in Rus.).

Москаленко А.А., Ерохин Ю.Е. Выделение пигмент-липопротеиновых комплексов из пурпурных бактерий методом препаративного электофореза в полиакриламидном геле // Микробиология. 1974. Т. 43. С. 654–657.

Moskalenko A.A., Erokhin Yu.E. Isolation of the pigment–lipoprotein complexes from purple bacteriaby preparative polyacrylamide gel electrophoresis // Microbiology (Moscow). 1974. V. 43. P. 654–657 (in Rus.).

Ashikhmin A., Makhneva Z., Moskalenko A. The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis // Photosynth. Res. 2014. V. 119. P. 291–303.

Carey A.M., Hacking K., Picken N., Honkanen S., Kelly S., Niedzwiedzki D.M., Blankenship R.E., Shimizu Y., Wang-Otomo Z.Y., Cogdell R.J. Characterization of the LH2 spectral variants produced by the photosynthetic purple sulphur bacterium *Allochromatium vinosum* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1837. P. 1849–1860.

Chi S.C., Mothersole D.J., Dilbeck P., Niedzwiedzki D.M., Zhang H., Qian P., Vasilev C., Grayson K.J., Jackson P.J., Martin E.C., Li Y., Holten D., Hunter C.N. Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway // Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. 2015. V. 1847. P. 189–201.

Cogdell R.J., Gall A., Kohler J. The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes // Q. Rev. Biophys. 2006. V. 39. P. 227–324.

Connor A.E. Carotenoids of phototrophic bacteria // Harold Cohen Library; PhD thesis. 1991. P. 130.

Gabrielsen M., Gardiner A.T., Cogdell R.J. Peripheral complexes of purple bacteria // The Purple Phototrophic Bacteria / Ed. Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T., Hunter C.N. New York: Springer, 2009. P. 135–153.

Gall A., Henry S., Takaichi S., Robert B., Cogdell R.J. Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions // Photosynth. Res. 2005. V. 86. P. 25–35.

Koepke J., Hu X., Muenke C., Schulten K., Hartmut M. The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800–850) from *Rhodospirillum molischianum* // Structure. 1996. V. 4. P. 581–597.

Leiger K., Linnanto J.M., Rätsep M., Timpmann K., Ashikhmin A.A., Moskalenko A.A., Fufina T.Y., Gabdulkhakov A.G., Freiberg A. Controlling photosynthetic excitons by selective pigment photooxidation // J. Phys. Chem. B. 2019. V. 123. P. 29–38.

Madigan M.T. A novel photosynthetic purple bacterium isolated from a Yellowstone hot spring // Science. 1984. V. 225. P. 313–315.

Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Heterogeneity of carotenoid content and composition in LH2 of the purple sulphur bacterium *Allochromatium minutissimum* grown under carotenoid-biosynthesis inhibition // Photosynth. Res. 2008. V. 98. P. 633–641.

McDermott G., Prince S., Freer A., Hawthornthwaite-Lawless A., Papiz M., Cogdell R., Isaacs N. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria // Nature. 1995. V. 374. P. 517–521.

Moskalenko A.A., Karapetyan N.V. Structural role of carotenoids in photosynthetic membranes // Z. Naturforsch. 1996. V. 51. P. 763–771.

Moskalenko A.A., Makhneva Z.K. Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochromatium minutissimum* assembled without carotenoids // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2012. V. 108. P. 1–7.

Niederman R.A. Structure, function and formation of bacterial intracytoplasmic membranes // Complex Intracellular Structures in Prokaryotes. Microbiology Monographs / Ed. Shively J.M. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. V. 2. P. 193–227.
https://doi.org/10.1007/7171_025

Niedzwiedzki D.M., Kobayashi M., Blankenship R.E. Triplet excited state spectra and dynamics of carotenoids from the thermophilic purple photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum* // Photosynth. Res. 2011. V. 107. P. 177–186.

Niedzwiedzki D.M., Swainsbury J.K., Canniffe D.P., Hunter C.N., Hitchcock A. A photosynthetic antenna complex foregoes unity carotenoid-to-bacteriochlorophyll energy transfer efficiency to ensure photoprotection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. P. 6502–6508.

Niwa S., Takeda K., Wang-Otomo Z.-Y., Miki K. Structure of the LH1-RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 A // Nature. 2014. V. 508. P. 228–232.

Scholz M., Dedic R., Breitenbach T., Hala J. Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common watersoluble photosensitizers // Photochem. Photobiol. Sci. 2014. V. 13. P. 1203–1212.

Razjivin A., Götze J., Lukashev E., Kozlovsky V., Ashikhmin A., Makhneva Z., Moskalenko A., Lokstein H., Paschenko V. Lack of excitation energy transfer from the bacteriochlorophyll soret band to carotenoids in photosynthetic complexes of purple bacteria // J. Phys. Chem. B. 2021. V. 125. P. 3538–3545.

Roszak A.W., Howard T.D., Southall J., Gardiner A.T., Law C.J., Isaacs N.W., Cogdell R.J. Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodopseudomonas palustris* // Science. 2003. V. 302. 1969–1972.

Takaichi S. Distribution and biosynthesis of carotenoids // The Purple Phototrophic Bacteria / Eds. Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T., Hunter C.N. New York: Springer, 2009. P. 97–117.

Inhibition of Carotenoid Biosynthesis in LH2 and LH1-RC Pigment-Protein Complexes of a Purple Sulfur Bacterium *Thermochromatium tepidum*

M. A. Bolshakov[1, *], A. A. Ashikhmin[1], Z. K. Makhneva[1], and A. A. Moskalenko[1]

[1]*Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

**e-mail: lfbv22@gmail.com*

Received April 12, 2021; revised June 2, 2021; accepted June 7, 2021

Abstract—The effect of the qualitative and quantitative content of carotenoids on the assembly of light-harvesting complexes isolated from the heat-resistant purple sulfur bacterium *Thermochromatium* (*T.*) *tepidum* was studied. To decrease the content of carotenoids in the photosynthetic membranes and complexes, an inhibitor of carotenoid genesis, diphenylamine (DPA), was used. The minimum carotenoid content of 40% was observed in *T. tepidum* cells grown in the presence of 120 μM DPA. At higher DPA concentrations, the growth of the culture stopped. Photosynthetic membranes and LH2 and LH1-RC complexes were isolated from DPA-treated cells; carotenoid content of these structures was 45 and 55%, respectively. Their spectral characteristics in the near IR region did not depend on the amount of carotenoids in the complexes and were similar to those of the native wild-type complexes. Simultaneously with a general decrease in the content of carotenoids, carotenoids from earlier stages of biosynthesis, such as neurosporene, ζ-carotene, and their hydroxy derivatives, appeared in the DPA-treated complexes. Emergence in DPA-treated complexes of carotenoids with a shorter chain of conjugated double bonds than in the control resulted in an increase in the efficiency of energy transfer from carotenoids to bacteriochlorophyll.

Keywords: carotenoids, HPLC, pigment-protein complexes, pigment-containing membranes

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 747–752

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ ГОМОСЕРИН ЛАКТОНОВ ИЗОЛЯТАМИ *PSEUDOMONAS* SPP.

© 2021 г.
И. Ф. Каримов[a], *, Т. О. Федорова[a], О. О. Жеребятьева[a], С. Д. Борисов[a], Е. А. Михайлова[a]

[a] *Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, 460006 Россия*

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

Поступила в редакцию 15.03.2021 г.
После доработки 13.06.2021 г.
Принята к публикации 07.07.2021 г.

Ацильные производные гомосерин лактона являются одними из ключевых факторов межклеточной коммуникации грамотрицательных бактерий. Они обеспечивают коллективное поведение бактерий и активацию вирулентности, устойчивости к действию внешних факторов, образование биопленок и других свойств, не наблюдающихся у одиночных форм клеток. В работе рассмотрена продукция сигнальных молекул во времени и при изменении температуры семи штаммов *Pseudomonas*. Установлено, что при 25°C отдельные виды продуцируют большее количество аутоиндукторов на ранних этапах, а при 37°C наблюдается двухфазность процесса их синтеза во внеклеточное пространство.

Ключевые слова: гомосерин лактон, аутоиндуктор, чувство кворума, *Pseudomonas*

DOI: 10.31857/S0026365621060070

Бактерии рода *Pseudomonas* представляют собой обитателей водной и почвенной среды, которые относятся к группе неферментирующих грамотрицательных бактерий. Основываясь на физиологических, включая образование пигмента, структуру колонии и строение жгутика, а также биохимических свойствах, псевдомонад подразделяют на группы и виды (Jun et al., 2015). Филогеномный анализ по данным таксономического дерева NCBI позволил выявить семь групп псевдомонад, пять из которых обладают высокой степенью разнообразия (группы *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri* и *P. syringae*), а две другие являются более консервативными и определяются наличием специфических белков (группы *P. chlororaphis* и *P. aeruginosa*) (Nicolaidis et al., 2020). Современные методы полногеномного секвенирования позволили выявить особенности нуклеотидной последовательности разных видов и штаммов (Kiewitz, Tümmler, 2000), и на данный момент по информации с портала “The Pseudomonas Genome Database” имеются данные о 613 геномах бактерий рода *Pseudomonas*, характеризующих 61 вид, из которых наибольшее число секвенированных полных геномов принадлежит *P. aeruginosa* (215) и *P. chlororaphis* (47). С другой стороны, изучение некоторых фенотипических свойств по-прежнему остается важной составляющей при описании бактериальных штаммов, так как наличие генов не свидетельствует о наличии признака (Suzuki, 2014), а лишь о возможности его проявления вследствие влияния внешних факторов и регуляторных систем генной экспрессии (Dötsch et al., 2015), что требует более сложного транскриптомного и метаболомного анализа. Подобные исследования являются необходимыми в контексте разработки методов борьбы с микроорганизмами, при этом отдельного внимания заслуживает изучение кворум-зависимых систем, обусловливающих коллективное поведение бактерий, синтез аутоиндукторов и образование биопленок.

Для *Pseudomonas* характерным является образование различных вариантов N-ацетил-гомосерин лактона (АГЛ) и регуляции с их помощью работы подконтрольных генов, построенной по типу LuxI–LuxR систем. Она наиболее охарактеризована для *P. aeruginosa*, которая продуцирует два типа АГЛ и синтезирует три вида рецепторных белков: LasR, RhlR и QscR. При этом последний, не имея своей соответствующей АГЛ-синтазы, способен воспринимать различные виды ацилпроизводных гомосерин лактона (Chugani, Greenberg, 2014). Регуляторные ансамбли системы чувства кворума запускают ряд стрессорных генов и факторов патогенности, в том числе образование биопленки (Alayande et al., 2018). В настоящий момент направление по поиску возможности разобщения коммуникационных сигналов у бакте-

рий является одним из перспективных в науке (Bali et al., 2019; Liu et al., 2020). Известно, что для *P. aeruginosa* типичными АГЛ являются N-бутирил-L-гомосерин лактон и N-(3-оксододеканоил)-L-гомосерин лактон (Smith, Iglewski, 2003), запускающих, соответственно, работу рецепторных белков LasR и RhlR. Иные виды *Pseudomonas* осуществляют синтез более широкого, но структурно близкого ряда ауторегуляторов, например, для *P. putida* характерно образование гомосерин лактонов с ацильными хвостами с длиной углеродного хвоста от 6 до 14 атомов (Dubern et al., 2006). Другие группы неферментирующих грамотрицательных бактерий, помимо АГЛ-ассоциированных (Gotschlich et al., 2001), имеют системы чувства кворума, построенные не на производных гомосерин лактона, а на различных производных *цис*-2-ненасыщенных жирных кислот (Wang et al., 2020).

Согласно классической схеме работы системы чувства кворума LuxI–LuxR типа, накопление АГЛ является плотностно-зависимым процессом, и концентрация аутоиндуктора в среде растет с течением времени (Miller, Bassler, 2001). Тем не менее, наблюдаются штаммовые различия в продукции сигнальных молекул, в том числе и у *P. aeruginosa*, разница между которыми может достигать одного порядка (Favre-Bonté et al., 2007). Однако в некоторых случаях процесс накопления АГЛ является стадийным и может иметь несколько максимумов, сменяющихся падением концентрации (Fekete et al., 2010). Такая динамика может определяться последовательным включением регуляторных генов (Beasley et al., 2020) или спонтанной деградацией аутоиндукторов до гомосерин лактона или гомосерина (Huang et al., 2003), причем последнее может зависеть также от температуры культивирования и кислотности среды (Yates et al., 2002). Для *P. putida* была показана динамика активности гена *ppuI*, кодирующего АГЛ-синтазу, пик который приходится на девятый час жизни культуры, однако не было описано наличие ацилгомосерин лактона в среде (Bertani, Venturi, 2004).

Целью нашей работы было изучение продукции АГЛ во времени и разных температурных условиях выделенными изолятами *Pseudomonas* spp., характеризующимися свободным образом жизни или ассоциированными с инфекционным процессом. Обсуждается роль динамичного изменения количества аутоиндуктора во внешней среде в коллективной жизни бактериальных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы получали путем высева из мочи, раневого отделяемого, мокроты, крови, отделяемого уха, почвы широколиственного леса на модифицированную среду Кинг А (“HiMedia”, Индия), после чего отбирали колонии для оценки типа метаболизма в ОФ-тесте, а также наличия цитохромоксидазы с использованием тест-полосок OXY-test (“Lachema”, Чехия). Чистую культуру идентифицировали с использованием реактивов и тест систем НЕФЕРМтест 24 (“Lachema”, Чехия) и API 20 NE (“bioMereuix”, Франция). Для этого готовили суспензию бактерий в 0.9% растворе хлорида натрия с плотностью 2.0 единицы по МакФарланду путем сравнения с эталонным раствором, представляющим собой смесь 0.2 мл 1% раствора $BaCl_2$ (“Химреактивснаб”, Россия) и 9.8 мл 1% раствора H_2SO_4 (“Химреактивснаб”, Россия). Полученную суспензию по 100 мкл вносили в лунки трех стрипов набора, а в первые пять лунок дополнительно перекрывали парафиновым маслом. Плашку инкубировали в течение 24 и 48 ч при 37°C в термостате ТС-1/80 (“Смоленское СКТБ СПУ”, Россия), после чего анализировали полученные результаты с использованием книги кодов для наборов тест-систем.

Аутоиндукторы получали путем культивирования бактерий в LB-бульоне (“Sigma-Aldrich”, США) в течение 24 ч при 25 или 37°C с отбором проб на 6, 12 и 24 ч выращивания. После этого клетки осаждали при 12 100 *g* на центрифуге Mini-Spin с ротором F-45-12-11 (“Eppendorf”, Германия), а надосадочную жидкость отбирали для дальнейшего исследования.

Для определения количества аутоиндуктора в полученном супернатанте был использован рекомбинантный штамм *Salmonella typhimurium* LT2 *rck:lux*, в котором промотор гена устойчивости к действию системы комплемента (*rck*) подконтрольный регулятору SdiA семейства LuxR-белков был клонирован перед кассетой генов свечения *luxCDABE Photorhabdus luminescens* ZM1. Результатом активации данного промотора является дозозависимая индукция свечения, отражающая присутствие аутоиндукторов первого типа в среде. В качестве контроля активности биосенсоров использовали N-(3-оксо)-гексаноил-L-гомосерин лактон (“Sigma-Aldrich”, США). Для данного метода использовалась суточная культура бактерий *S. typhimurium* LT2 *rck:lux*, выращенная на агаре LB (“Sigma-Aldrich”, США) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в качестве селективного фактора. Культуру клеток смывали стерильным бульоном LB до концентрации 10^7 кл./мл и дополнительно подращивали до экспоненциальной фазы роста в течение 90 мин при 37°C и 180 об./мин на шейкере OS-20 (“BioSan”, Латвия) в термостате ТС-1/80 (“Смоленское СКТБ СПУ”, Россия). Суспензию бактерий вносили по 100 мкл в непрозрачные лунки планшета для биолюминесцентного анализа, в которых уже были добавлены по 100 мкл испытуемой смеси супернатанта, содержащего аутоиндукторы, либо по 100 мкл бульона в лунках, используемых в качестве контро-

лей. Измерение кинетики свечения проводилось в течение 2 ч с помощью планшетного люминометра LM-01T (“Immunotech”, Чехия) и прилагаемого программного обеспечения Kilia.

Оценку формирования биопленки изолятами проводили с помощью полистироловых микропланшетов. Для этого готовили суспензию клеток LB-бульоне (“Sigma-Aldrich”, США) до оптической плотности 0.10 единиц против чистой среды путем измерения 200 мкл суспензии в прозрачных лунках стрипованного планшета (“НИИ Медполимер”, Россия) при длине волны 535 нм на фотометре StatFax303+ VIS (“Awareness”, США). Полученную суспензию инкубировали 18 ч при 37°C в термостате ТС-1/80 (“Смоленское СКТБ СПУ”, Россия), а затем разбавляли в соотношении 1 : 100 свежим LB бульоном и по 100 мкл полученной суспензии переносили в 96-луночный планшет. Инкубировали при 37°C в течение 24 ч без встряхивания, после чего аккуратно промывали планшет водой для удаления планктонных форм клеток, добавляли по 200 мкл 0.1% водного раствора кристаллического фиолетового и оставляли на 15 мин. Затем удаляли краситель и аккуратно промывали планшет водой от остатков несвязанного красителя, после чего добавляли по 200 мкл 95% этанола. Полученный окрашенный раствор переносили в новый планшет и замеряли оптическую плотность на фотометре StatFax 303+ VIS при длине волны 590 нм.

Расчеты средней арифметической, ошибки средней арифметической, а также статистическую значимость различий осуществляли путем расчета порогового *t*-критерия Стьюдента при заданном уровне значимости 0.05 с использованием программы Excel 2007 (“Microsoft”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные изоляты неферментирующих грамотрицательных бактерий с использованием набор тест-систем были идентифицированы как *Pseudomonas aeruginosa* (штамм CI2) из мочи больного уретритом, *P. aeruginosa* (штамм CI3) из раневого отделяемого, *P. aeruginosa* (штамм CI8) из мокроты, *P. putida* (штамм TP307) из крови, *P. luteola* (штамм TL5) из почвы широколиственного леса, *P. fluorescens* (штамм TF17) из отделяемого уха больного отитом и *P. alcaligenes* (штамм TA84) из раневого отделяемого.

Оценка присутствия аутоиндукторов в суточной культуре, выращенной при 25 и 37°C, показала, что не все из рассматриваемых штаммов способны к продукции АГЛ (рис. 1). В частности, супернатанты от двух штаммов (*P. aeruginosa* CI2 и *P. putida* TP307) характеризовались низким (достоверно не отличимым от фонового) уровнем свечения и не имели отличий в зависимости от температуры выращивания бактериальных культур. При этом биопленку образовывали все штаммы, но у *P. fluorescens* TF17 и *P. alcaligenes* TA84 данная надклеточная структура содержала на 22 и 41% меньше общей биомассы.

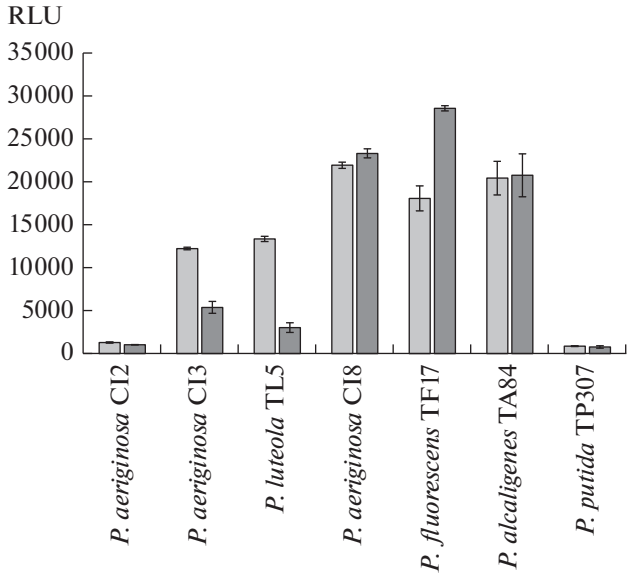


Рис. 1. Индукция свечения биосенсора под воздействием супернатанта культур псевдомонад, культивированных в течение 24 ч при 25°C (*1* – светлые столбцы) и 37°C (*2* – темные столбцы).

Эффект отсутствия аутоиндукторов может быть связан либо с дефектом продукции АГЛ, либо продукцией сигнальных молекул, не регистрируемых используемым люминесцирующим биосенсором. В частности, изучение физиологических свойств *P. fluorescens*, выделенного из молока, показало отсутствие продукции аутоиндукторов первого типа, но при этом было зарегистрировано формирование биопленок (Martins et al., 2014). В то же время, использованный сенсорный штамм, у которого сенсорным гомологом LuxR является белок SdiA, имеет большую степень сродства к гомосерин лактонам с длиной алкильного хвоста 6–10 атомов углерода (Michael et al., 2001).

Культуры клеток *P. aeruginosa* (штаммы CI3 и CI8), *P. luteola* TL5, *P. fluorescens* TF17 и *P. alcaligenes* TA84 синтезировали АГЛ, однако в неодинаковом количестве, и, в некоторых случаях, этот процесс зависел от температуры выращивания бактерий. Наибольшее количество аутоиндуктора было зарегистрировано в супернатанте *P. fluorescens* TF17, культивированной в течение 1 сут при 37°C, но рост при 25°C привел к меньшему на треть выходу сигнальных молекул. С другой стороны, для штамма *P. aeruginosa* CI8 подобная разница продуктивности весьма незначительна, а для *P. alcaligenes* TA84 не было обнаружено выраженного влияния температуры культивирования на синтез АГЛ. Напротив, для штаммов *P. aeruginosa* CI3 и

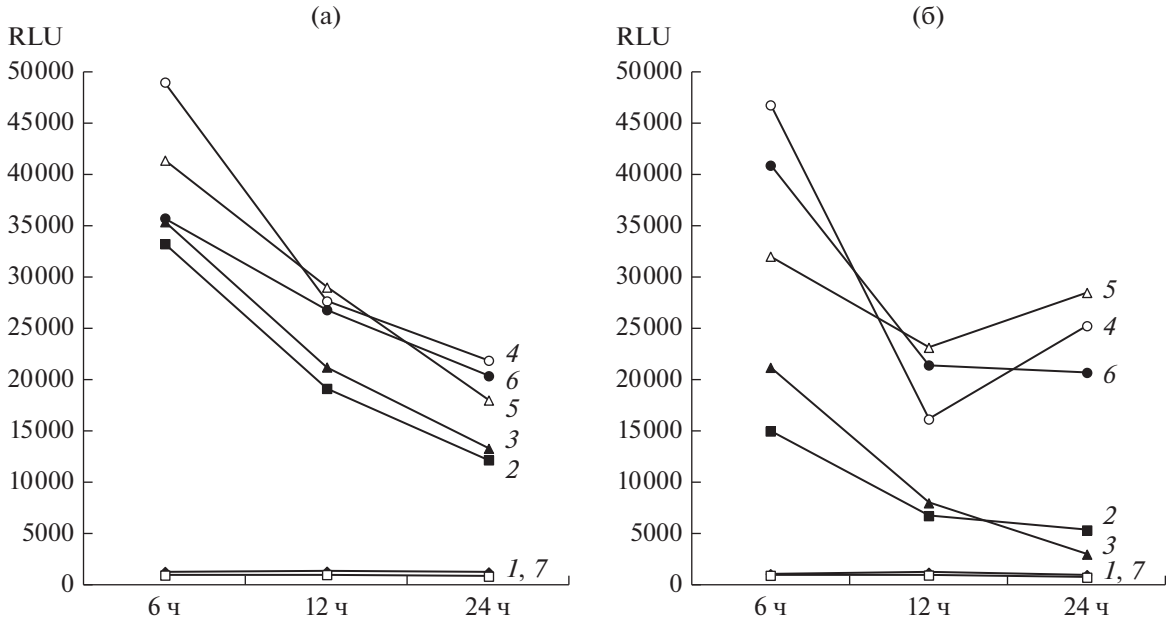


Рис. 2. Определение продукции АГЛ в супернатанте культур псевдомонад, культивированных при 25°С (а) и 37°С (б). Обозначения: *1* – *P. aeriginosa* CI2; *2* – *P. aeriginosa* CI3; *3* – *P. luteola* TL5; *4* – *P. aeriginosa* CI8; *5* – *P. fluorescens* TF17; *6* – *P. alcaligenes* TA84; *7* – *P. putida* TP307.

P. luteola TL5 зарегистрирован обратный эффект, заключающийся в более высокой продукции АГЛ при 25°С и снижению синтеза сигнальных молекул при 37°С. Действительно, температура, как один из ключевых факторов внешней среды, определяет не только скорость роста популяции в целом, но и запуск отдельных генов, в том числе и стресс-генов, стабильность белковых комплексов и, как следствие, продукцию аутоиндукторов, что позволяет клеткам адаптироваться к условиям и формировать стратегию клеточного ответа (Hansen et al., 2015; Li et al., 2018; Mizan et al., 2018). Помимо этого, изменение температуры может вести к лактонолизу и формированию линейных форм молекул, не обладающих индукционной активностью по отношению к рецепторным белкам (Yates et al., 2002).

Далее нами было определено присутствие аутоиндукторов в среде культивирования бактерий при 25 и 37°С на 6, 12 и 24 ч роста клеток (рис. 2). Три штамма, для которых ранее не было обнаружено продукции АГЛ, на ранних сроках роста также не синтезировали данные соединения. Однако в режиме культивирования при 25°С для других пяти культур наблюдалось снижение количества аутоиндуктора в среде с течением времени. Так, максимальный ответ биосенсора был получен от надосадочной жидкости, отобранной от штамма *P. aeruginosa* CI8 на шестом часу культивирования, причем через 6 ч наблюдалось резкое снижение концентрации аутоиндукторов на 45%, а в суточной культуре снижение происходило еще на 19%. Наибольшая относительная остаточная концентрация АГЛ на 24 ч инкубации (по сравнению с шестым часом существования культуры) была характерна для штамма *P. alcaligenes* TA84. В этом случае было зарегистрировано изменение отклика сенсорного штамма с 35777 ± 277 до 20409 ± ± 1953 RLU, что составляет 57%. В целом, при таком температурном режиме штаммы показывают сходную динамику продукции аутоиндукторов, характеризующуюся максимумом на шестом часу и дальнейшим снижением до уровня 57–75% на 12 ч и остатком в 36–57% на 1 сут культивирования.

Картина продукции аутоиндукторов во времени значительно изменяется при культивировании бактериальных изолятов при температуре 37°С. Для штаммов *P. aeruginosa* CI3, *P. luteola* TL5 и *P. fluorescens* TF17 зарегистрировано снижение продукции АГЛ на шестой час роста культуры на 55, 41 и 23% соответственно по сравнению с ростом при комнатной температуре. Остальные штаммы к данному временному интервалу существования культуры выработали объем ацильных производных гомосерин лактона, достоверно не отличимое от результатов, полученных в ходе культивирования при 25°С. Примечательным является тот факт, что все штаммы, для которых зарегистрировано наличие АГЛ в надосадочной жидкости, гораздо быстрее теряли данный экзопродукт при 37°С на 12 ч культивирования. По всей видимости, этот эффект связан с более высокой скоростью роста клеток и более ранним включением системы чувства кворума, что привело к связыванию

свободных молекул аутоиндуктора и понижению его концентрации во внешней среде.

Помимо этого, для штаммов *P. aeruginosa* CI8 и *P. fluorescens* TF17 был зарегистрирован второй всплеск продукции аутоиндукторов на 24 часу культивирования при 37°C, характеризующийся увеличением содержания сигнальных молекул на 44 и 23% соответственно. Подобная двухфазность продукции сигнальных молекул связана с особенностями регуляции системы Quorum sensing у псевдомонад. После активации регуляторных белков происходит также индукция экспрессии генов АГЛ-синтазы, что ведет к увеличению продукции производных гомосерин лактона (Jimenes et al., 2012). К тому же белки семейства LuxR уже находятся в связи с аутоиндукторами, и вновь образующиеся молекулы оказываются свободными и выходят во внешнюю среду (Lee, Zhang, 2015; Turkina, Vikström, 2019). С другой стороны, для штаммов *P. aeruginosa* CI3 и *P. luteola* TL5 было зарегистрировано снижение продукции АГЛ, хотя кривая интенсивности падения при 37°C была более сглаженная, чем при 25°C, что может быть связано с общим низким выходом аутоиндукторов при данной температуре культивирования.

Таким образом, результаты демонстрируют различия в продукции аутоиндукторов первого типа различными видами и штаммами псевдомонад, зависимость данного процесса от температуры культивирования, а также изменение содержания сигнальных молекул в среде с течением времени. Подобные физиологические особенности необходимо рассматривать как в контексте исследования систем чувство кворума бактерий, так и поиска методов борьбы с бактериальными инфекциями (Mahan et al., 2020) путем регулирования межклеточной сигнализации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В статье не содержится результатов исследований, выполненных кем-либо из авторов с участием людей или животных как объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Alayande A.B., Aung M.M., Kim I.S. Correlation between quorum sensing signal molecules and *Pseudomonas aeruginosa*'s biofilm development and virulency // Curr. Microbiol. 2018. V. 75. P. 787–793.

Bali E.B., Türkmen K.E., Erdönmez D., Sağlam N. Comparative study of inhibitory potential of dietary phytochemicals against quorum sensing activity of and biofilm formation by *Chromobacterium violaceum* 12472, and swimming and swarming behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Food Technol. Biotechnol. 2019. V. 57. P. 212–221.

Beasley K.L., Cristy S.A., Elmassry M.M., Dzyova N., Colmer-Hamood J.A., Hamood A.N. During bacteremia, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adapts by altering the expression of numerous virulence genes including those involved in quorum sensing // PLoS One. 2020. V. 15. e0240351.

Bertani I., Venturi V. Regulation of the N-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 5493–5502.

Chugani S., Greenberg E.P. An evolving perspective on the *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum sensing regulator QscR // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014. V. 4. Art. 152.

Dötsch A., Schniederjans M., Khaledi A., Hornischer K., Schulz S., Bielecka A., Eckweiler D., Pohl S., Häussler S. The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptional landscape is shaped by environmental heterogeneity and genetic variation // mBio. 2015. V. 6. e00749-15.

Dubern J.F., Lugtenberg B.J., Bloemberg G.V. The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II // J. Bacteriol. 2006. V. 188. P.2898–2906.

Favre-Bonté S., Chamot E., Köhler T., Romand J.A., van Delden C. Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients // BMC Microbiol. 2007. V. 7. Art. 33.

Fekete A., Kuttler C., Rothballer M., Hense B.A., Fischer D., Buddrus-Schiemann K., Lucio M., Müller J., Schmitt-Kopplin P., Hartmann A. Dynamic regulation of N-acyl-homoserine lactone production and degradation in *Pseudomonas putida* IsoF // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 72. P. 22–34.

Gotschlich A., Givskov M., Molin S., Eberl L. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility // Microbiology (SGM). 2001. V. 147. P. 2517–2528.

Hansen H., Purohit A.A., Leiros H.K., Johansen J.A., Kellermann S.J., Bjelland A.M., Willassen N.P. The autoinducer synthases LuxI and AinS are responsible for temperature-dependent AHL production in the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* // BMC Microbiol. 2015. V. 15. Art. 69.

Huang J.J., Han J.I., Zhang L.H., Leadbetter J.R. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 5941–5949.

Jimenez P.N., Koch G., Thompson J.A., Xavier K.B., Cool R.H., Quax W.J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2012. V. 76. P. 46–65.

Jun S.R., Wassenaar N.M., Nookaew I., Hauser L., Wanchai V., Land M., Timm C.M., Lu T.Y.S., Schadt C.W., Doktycz M.J., Pelletier D.A., Ussery D.V. Diversity of *Pseudomonas* genomes, including populus-associated isolates, as revealed by comparative genome analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 82. P. 375–383.

Kiewitz C., Tümmler B. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 3125–3135.

Lee J., Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* // Protein Cell. 2015. V. 6. P. 26–41.

Li T., Yang B., Li X., Li J., Zhao G., Kan J. Quorum sensing system and influence on food spoilage in *Pseudomonas fluorescens* from turbot // J. Food Sci. Technol. 2018. V. 55. P. 3016–3025.

Liu J., Sun X., Ma Y., Zhang J., Xu C., Zhou S. Quorum quenching mediated bacteria interruption as a probable strategy for drinking water treatment against bacterial pollution // Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2020. V. 17. P. 9539.

Mahan K., Martinmaki R., Larus I., Sikdar R., Dunitz J., Elias M. Effects of signal disruption depends on the substrate preference of the lactonase // Front. Microbiol. 2020. V. 14. Art. 3003.

Martins M.L., Uelinton M.P., Riedel K., Vanetti M.C.D., Mantovani H.C., Araújo E.F. Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk // Braz. J. Microbiol. 2014. V. 45. P. 1039–1046.

Michael B., Smith J.N., Swift S., Heffron F., Ahmer B.M. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 5733–5742.

Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2001. V. 55. P. 165–199.

Mizan M.F.R., Jahid I.K., Park S.Y., Silva J.L., Kim T.J., Myoung J., Ha S.D. Effects of temperature on biofilm formation and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila* // Ital. J. Food Sci. 2018. V. 30. P. 456–466.

Nikolaidis M., Mossialos D., Oliver S.G., Amoutzias G.D. Comparative analysis of the core proteomes among the pseudomonas major evolutionary groups reveals species-specific adaptations for *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas chlororaphis* // Diversity. 2020. V. 12. Art. 289.

Smith R.S., Iglewski B.H. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target // J. Clin. Invest. 2003. V. 112. P. 1460–1465.

Suzuki S., Horinouchi T., Furusawa C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles // Nat. Commun. 2014. V. 5. Art. 5792.
https://doi.org/10.1038/ncomms6792

Turkina M.V., Vikström E. Bacteria-host crosstalk: Sensing of the quorum in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections // J. Innate Immun. 2019. V. 11. P. 263–279.

Wang H., Liao L., Chen S., Zhang L.H. A quorum quenching bacterial isolate contains multiple substrate-inducible genes conferring degradation of diffusible signal factor // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. e02930-19.

Yates E.A., Philipp B., Buckley C., Atkinson S., Chhabra S.R., Sockett R.E., Goldner M., Dessaux Y., Cámara M., Smith H., Williams P. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa* // Infect. Immun. 2002. V. 70. P. 5635–5646.

Evaluation of Homoserine Lactone Production by *Pseudomonas* spp. Isolates

I. F. Karimov[1, *], T. O. Fedorova[1], O. O. Zherebyateva[1], S. D. Borisov[1], and E. A. Mikhailova[1]

[1]*Orenburg State Medical University, Orenburg, 460006 Russia*

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

Received March 15, 2021; revised June 13, 2021; accepted July 7, 2021

Abstract—Acyl derivatives of homoserine lactone are among the key factors in the intercellular communication of gram-negative bacteria. They provide for collective behavior of bacteria and the activation of their virulence, resistance to external factors, biofilm formation, and other properties that are not observed in single cell forms. In the present work, the patterns of production of signaling molecules depending on time and temperature were studied for seven *Pseudomonas* strains. It was found that at 25°C some species produced higher amounts of autoinducers in the early stages, while at 37°C a two-phase process of their synthesis into the extracellular space was observed.

Keywords: homoserine lactone, autoinducer, quorum sening, *Pseudomonas*

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 753–762

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПРОДУКЦИОННЫЕ И СТРУКТУРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФИТОПЛАНКТОННОГО СООБЩЕСТВА И БАКТЕРИОПЛАНКТОНА НА ДВУХ СТАНЦИЯХ В ОТКРЫТОЙ ЧАСТИ УСТЬЯ СЕВАСТОПОЛЬСКОЙ БУХТЫ. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МИДИЙНОЙ ФЕРМЫ

© 2021 г.
Е. С. Соломонова[a], *, А. И. Акимов[a]

[a]*Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук", Севастополь, 299011 Россия*

**e-mail: solomonov83@mail.ru*

Поступила в редакцию 04.06.2021 г.
После доработки 30.06.2021 г.
Принята к публикации 07.07.2021 г.

Исследована сезонная динамика продукционных и структурных характеристик фитопланктона на двух близлежащих станциях открытой части Севастопольской бухты, одна из которых является мидийной плантацией. Величина валовой первичной продукции, содержание хлорофилла *a*, общая биомасса фитопланктона, количественное соотношение крупных и мелких клеток водорослей, а также их сезонная динамика не различались для двух станций. Между соответствующими показателями станций наблюдались линейные зависимости, угловые коэффициенты регрессии которых были близки к единице. Продукция и биомасса фитопланктона были максимальными в летний период и составили 350 ± 43 мг С/м^3 сут и 450 ± 50 мг С/м^3 соответственно. Содержание хлорофилла *a* изменялось от 0.5 до 3 мг/м^3 при минимуме в январе–феврале и максимуме в летний период. Ассимиляционное число хлорофилла *a* за световой период имело значения, соответствующие отмеченным для продуктивных вод, и коррелировало с ходом температур в течение года. Суммарная величина потребления кислорода бактерио- и фитопланктоном в летний период составляла 30–70% от валового фотосинтеза. Получены сведения о сезонной изменчивости биомассы трех групп водорослей (*Synechococcus*, пикоэукариотический фитопланктон, нанофитопланктон); процент биомассы пиководорослей в массе черноморского фитопланктона в среднем составил 30% с максимумом в зимне-весенний и летний периоды. С помощью проточной цитометрии и витального флуорохрома SYBR Green I рассчитана численность бактериопланктона в исследуемой акватории и показана достоверная положительная связь между обилием бактерий и температурой воды.

Ключевые слова: мидийная ферма, проточная цитометрия, пикофитопланктон, нанофитопланктон, биомасса, хлорофилл *a*, Черное море, продукция фитопланктона, ассимиляционное число хлорофилла, бактериопланктон

DOI: 10.31857/S0026365621060148

При создании морской фермы по выращиванию мидий и устриц важными являются вопросы экологического мониторинга с целью определения состояния экосистемы и тенденций ее изменчивости в результате процессов жизнедеятельности моллюсков, выделяемые продукты которых (органический азот, фосфор, аммонийные соединения), оказывают как позитивное, так и негативное влияние на альгоценозы. В частности, выделение мидиями и моллюсками органического вещества может усилить процесс эвтрофирования вод, создавая условия для развития заморных явлений, что проявляется в акваториях со слабым водообменом (Золотницкий, Крючков, 2006). Органические вещества метаболитов мидий стимулируют развитие фитопланктона, расширяя его видовое разнообразие (Галкина и соавт., 1982; Кулаковский, 2000). Следует отметить, что определяющее влияние на степень эвтрофикации и сопутствующих явлений имеют гидрологические условия данной акватории, а также размеры и мощность мидийной фермы (Officer et al., 1982; Trottet et al., 2008). Известно, что двустворчатые моллюски могут предпочтительно выбирать фитопланктон для употребления его в пищу, что в значительной степени зависит от размера, морфологии, формы частиц, подвижности, токсичности и пищевой ценности жертвы (Safi et al., 2007; Safi, Hayden, 2010), что, в свою очередь, может привести к изменению размерной структуры фитопланктона в районе мидийного марихозяйства. Пикопланктон имеет тенденцию процветать в районах аквакультуры моллюсков, потому

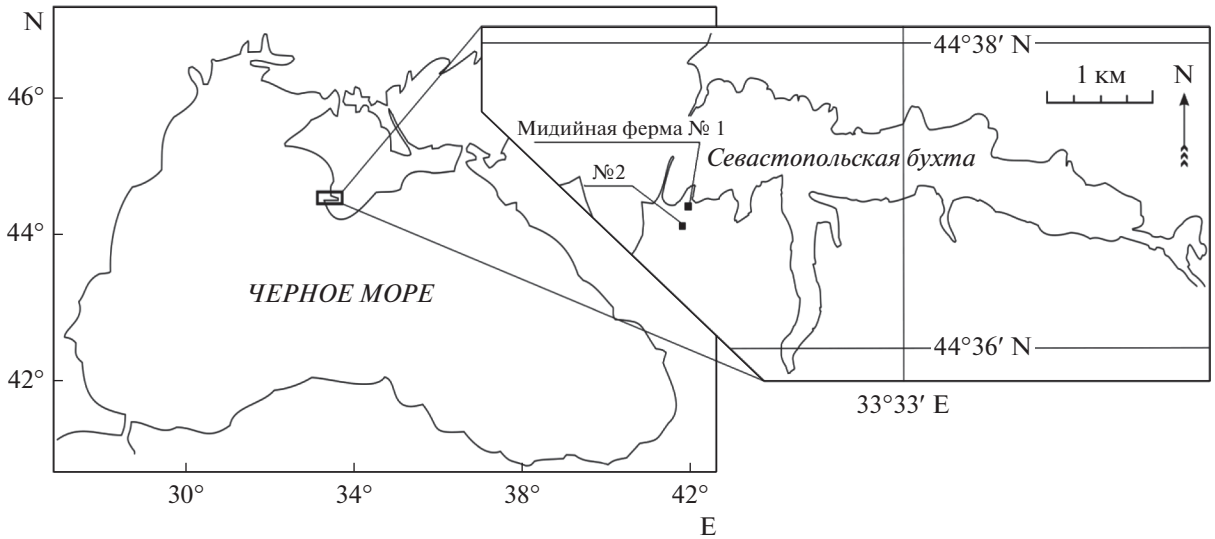


Рис. 1. Расположение станций в прибрежных водах Черного моря в районе Севастополя.

что их хищники (например, инфузории и гетерофлагелляты) и конкуренты (например, более крупные диатомовые водоросли) за питательные вещества удаляются посредством фильтрации моллюсками (Cranford et al., 2011). Следовательно, разведение моллюсков контролирует не только размер популяций фитопланктона, но и рост определенных видов водорослей за счет их избирательной фильтрации (Wetz et al., 2002; Cranford et al., 2011). Однако оценить, достоверен ли данный тезис для мидийного марихозяйства Черного моря, не представлялось возможным, так как пикофитопланктон Черного моря почти не попадал в поле зрения исследователей из-за его размеров. Применение современной приборной базы, в частности проточной цитометрии, позволяет восполнить этот пробел. В связи с чем для оценки влияния мидийного марихозяйства на прилегающие акватории важно использовать как структурные, так и функциональные показатели фитопланктонного сообщества.

Актуальными остаются вопросы мониторинга качественных и количественных изменений продукционных процессов в условиях возрастающего антропогенного воздействия, особенно в шельфовых и прибрежных акваториях, где это влияние может быть особенно велико. Применение проточной цитометрии и флуоресцентных методов в ряде вопросов упрощают исследования и позволяют получать дополнительную информацию.

Цель данной работы заключалась в оценке влияния мидийной фермы на состояние альгоценоза двух станций в сравнительном аспекте, а также в исследовании сезонных изменений продукционных и структурных показателей фитопланктонного сообщества и бактериопланктона шельфа Севастопольской бухты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пробы отбирали в поверхностном слое (0.1 м) ежемесячно с января по декабрь 2016 г. на двух станциях, расположенных на севастопольском взморье между бухтами Карантинная и Севастопольская (Черное море). Схема расположения станций показана на рис. 1. Собрано и обработано 200 проб.

Глубины под фермой составляют 16–18 м. Ферму относят к категории малых, с размерами 70 × 150 м и производительностью не более 100 тысяч моллюсков в год. Гидрологический режим шельфовой зоны характеризуется высокой интенсивностью водообмена и наличием сгонно-нагонных процессов (Попов, Ерохин, 2017).

Содержание хлорофилла и феофитина определяли стандартным спектрофотометрическим методом (Jeffrey, 1975) в ацетоновых экстрактах после фильтрации 1–2 л воды на стекловолокнистых фильтрах GFF. Пробы отбирали в 2-х повторностях.

Скорость фотосинтеза и дыхания определяли методом Винклера (Методика..., 2010) в лабораторных условиях при температуре, соответствующей естественным условиям. Продолжительность световой экспозиции при интенсивности света 120 мкЭ/м^2 с составляла 24 ч. При расчете данные пересчитывали на реальную продолжительность светового периода, вычитая 2 ч.

Для проведения исследований использовали бокс с соответствующей терморегуляцией и светодиодным источником освещения. Производили усреднение по 6 измерениям (для хлорофилла *a* по 4) и определяли стандартное отклонение.

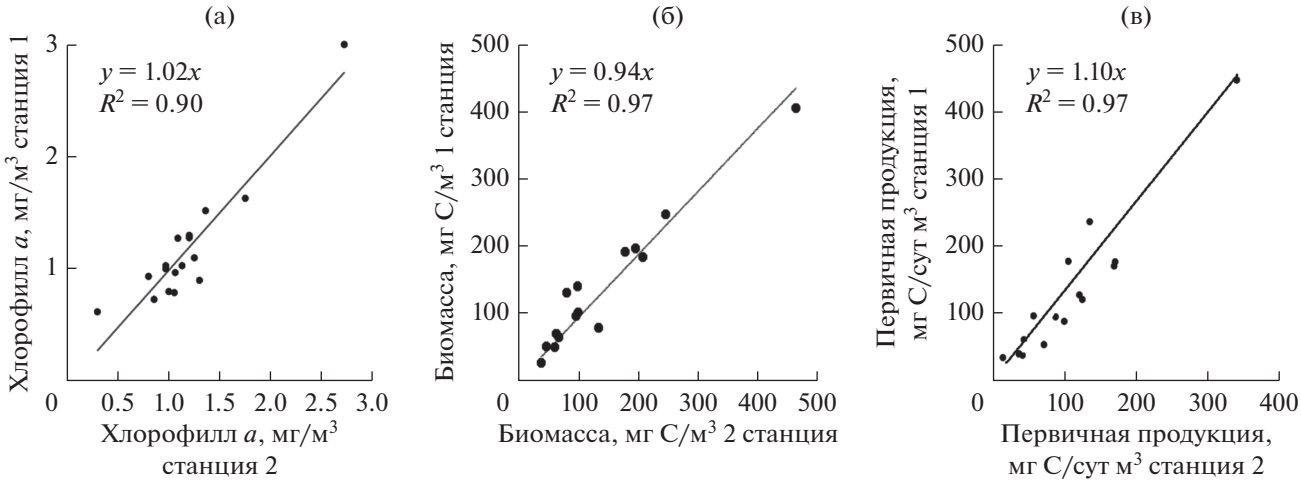


Рис. 2. Взаимосвязь хлорофилла *a* (а), биомассы (б) и фотосинтеза (в) на двух исследуемых станциях.

Валовую первичную продукцию рассчитывали в углеродных единицах, используя коэффициент пересчета 0.375 (Винберг, 1960).

Численность пико- (размер клеток 0.2–2 мкм) и нанофитопланктона (размер клеток 2–20 мкм) определяли с помощью проточного цитометра Cytomics FC 500 (“Beckman Coulter”, США), оборудованного 488-нм однофазным аргоновым лазером и программным обеспечением CXP в кластере на 2-х параметрических цитограммах по прямому светорассеиванию (FS) и флуоресценции отдельных клеток в красной (FL4, 675 нм) области спектра. Исследовали только указанные размерные группы водорослей из-за невозможности проточного цитометра пропускать клетки размером свыше 35 мкм (Муханов и соавт., 2016).

Идентификацию пикоцианобактерий осуществляли по оранжевой флуоресценции их фотосинтетического пигмента фикоэритрина (FL2, 575 нм) (Муханов и соавт., 2016). Эти группы образуют кластеры на цитограммах, характеризуются высоким содержанием фикоэритрина и его отсутствием у пикоэукариотического фитопланктона.

Биомассу исследуемых размерных групп в единицах углерода рассчитывали с использованием коэффициентов, определенных в работах Heldal et al. (2003) для *Synechococcus*, Worden et al. (2004) для пикоэукариотов и Verity et al. (1992) для нанофитопланктона.

Окраску бактериоплантона красителем SYBR Green I производили в соответствии с работой Рауэн и соавт. (2011). Рабочий раствор красителя готовили в разбавлении 10^{-2} и хранили в замороженном состоянии при –20°С. Конечное разбавление в пробе составляло 10^{-4}. Окраску производили в течение 40 мин непосредственно перед цитометрическими измерениями.

Цитометрические данные обрабатывали с использованием программы flowing software 2 (www.flowingsoftware.com).

Пробы фитопланктона концентрировали с использованием фильтров Whatman (GF/C) с диаметром пор 2 мкм. Доминирующие виды определяли под микроскопом ZEISS Primo Star (“ZEISS”, Германия).

Статистическую обработку данных выполняли с помощью стандартных программных пакетов Microsoft Exel 7.0, Statistica-5, Grapher-9, Sigma Plot для персонального компьютера. Рассчитывали стандартные отклонения (SD) по трем повторностям. Достоверность различий выборочных средних оценивали с помощью парного *t*-критерия (α) и коэффициентов корреляции (*R*). Для получения уравнений регрессии использовали линейный регрессионный анализ (P 95%).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные значения продукционных и размерно-структурных характеристик фитопланктона для двух станций показали отсутствие закономерных различий между исследуемыми параметрами в любой период наблюдений. Отмеченные в течение года изменения значений хлорофилла *a*, биомассы, скорости фотосинтеза, а также параметров размерной структуры имели высокую степень корреляции между собой для обеих станций, что показано на рис. 2.

Угловые коэффициенты линейных регрессий взаимосвязи исследуемых величин были близки к единице (при достаточно высоком коэффициенте детерминации). Полученные результаты позволяют сделать вывод об отсутствии заметного влияния мидийной фермы малой мощности на фитоценоз в конкретных гидрологических условиях открытой

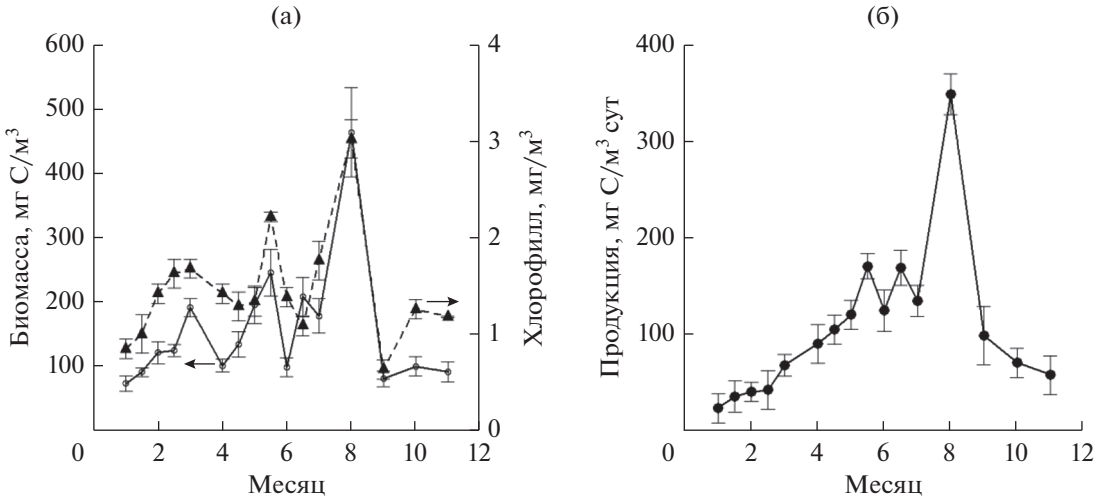


Рис. 3. Сезонные изменения концентрации хлорофилла *a* и биомассы водорослей (а) и валовой первичной продукции (б).

акватории, поэтому для дальнейшего анализа сезонных закономерностей данные по обеим станциям объединены в один массив.

Минимальные значения концентрации хлорофилла *a*, первичной продукции, суммарной биомассы исследуемых размерных групп водорослей наблюдали в зимний период (0.7 мг/м^3, 80 мг С/м^3, 25 мг С/м^3 сут[1]) (рис. 3). С января по март наблюдалось увеличение содержание хлорофилла *a*. В весенне-летний период зарегистрированы значительные колебания содержания хлорофилла *a*, которые коррелировали с биомассой и валовой первичной продукцией фитопланктона.

Общая тенденция изменения содержания биомассы и величины первичной продукции – повышение от зимы к лету. Среднее значение биомассы фитопланктона в весенне-летний период составило 255 ± 35 мг С/м^3. С мая по сентябрь зарегистрированы также наибольшие величины первичной продукции (в среднем 140 ± 25 мг С/м^3 сут), превосходящие зимний минимум в 2.5–3 раза. Абсолютный максимум продукционных показателей зафиксирован в августе при интенсивном развитии *Synechococcus*. Осенью, с середины сентября, значения этих показателей снижаются, что связано, по-видимому, с уменьшением температуры и продолжительности светового дня.

Между величиной первичной продукции и биомассой наблюдалась корреляционная зависимость с коэффициентом детерминации $R^2 = 0.89$ (рис. 4а). Корреляция между продукцией и содержанием хлорофилла *a* была более слабой, $R^2 = 0.72$ (рис. 4б). Это объясняется существенной сезонной изменчивостью удельного содержания хлорофилла *a*, которая в значительной степени зависит от величины инсоляции и имеет обратную направленность, в отличие от продукционных показателей.

Ассимиляционное число (далее АЧ) хлорофилла *a* имело минимальные (4–6 мг С/мг Хл ч) значения в январе и начале апреля при температурах 9–11°С. Последующее повышение этого параметра в течение года коррелировало с ходом температуры; максимум наблюдался с начала июня до середины сентября в диапазоне температур 21–26°С, с колебаниями в пределах 8–12 мг С/мг Хл ч. Заметное снижение АЧ хлорофилла *a* наблюдалось после середины сентября и также было связано с уменьшением температуры воды и продолжительности светового периода (рис. 5).

Измерение скорости дыхания в зимне-весенний период при температурах 9–11°С и относительно низком содержании хлорофилла *a* кислородным методом было весьма неточным, так как средние значения величины потребления кислорода по 6 измерениям не превосходили достоверно величину погрешности измерений. Интенсивность дыхания с середины мая по ноябрь (15–26°С) была равна 68 ± 40 мг С/м^3 сут, что составило примерно 30–70% от величин валового фотосинтеза. Между тем детализацию сезонной изменчивости потребления кислорода осуществить не удалось. Можно отметить, что максимальное потребление кислорода наблюдалось в августе–сентябре и совпадало с максимумом биомассы бактерий в пробах.

С помощью цитофлуориметра проведена оценка количественного содержания трех размерных групп водорослей в исследуемых пробах: *Synechococcus* (прокариотическая водоросль), эукариотических пиководорослей и нанофитопланкто-

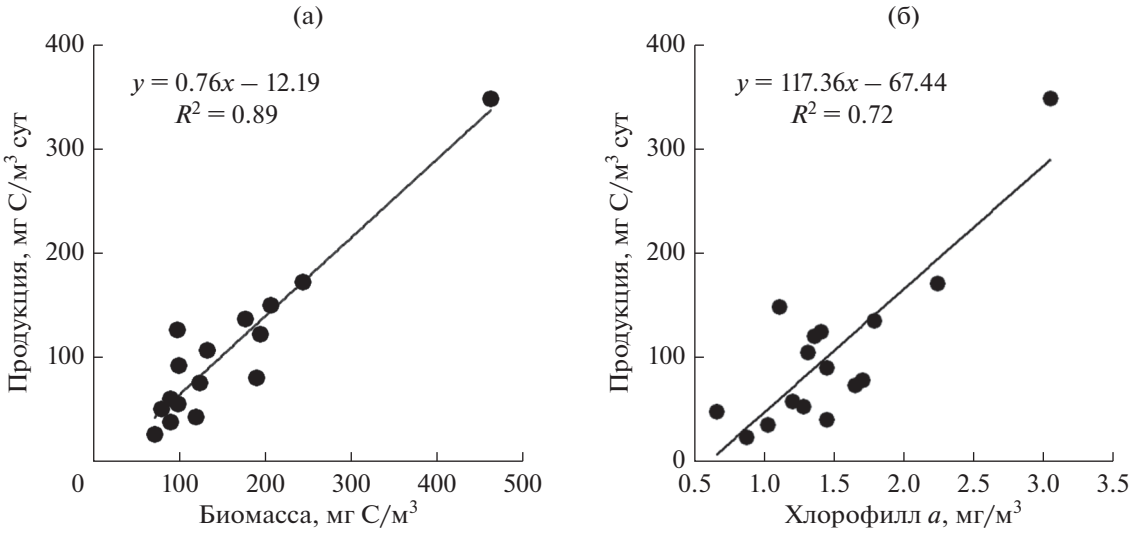


Рис. 4. Взаимосвязь между величинами первичной продукции, биомассы и хлорофилла *a*.

на (рис. 6). Вклад *Synechococcus* в суммарную биомассу фитопланктона составлял в среднем около 7%, за исключением августа, когда зарегистрирован летний пик его развития – 32% от суммарной биомассы фитопланктона. Сообщество эукариотических пиководорослей характеризовалось двумя максимумами биомассы в течение годового цикла: зимне-весенним пиком при температуре воды <15°С, когда содержание этих видов составляло примерно 50% от общей биомассы, и летним, когда вклад эукариотических пиководорослей в суммарную биомассу был около 10%. Основной вклад в суммарную биомассу водорослей вносил нанофитопланктон, концентрация которого имела максимальные значения с мая по август.

В ранневесенний период в пробах преобладали диатомовые водоросли *Skeletonema costatum* Cleve, 1878, *Psevdo-nitzschia delicatissima* Cleve, 1928 и кокколитофорида *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Hay, Mohler, 1967. Начиная с конца апреля, по мере прогревания вод и снижения концентрации биогенных элементов, наблюдали развитие водорослей *Chaetoceros curvisetus* Cleve, 1889, *Chaetoceros affinis* Lauder, 1864, а также *Emiliania huxleyi*. Лето характеризовалось развитием динофитовых водорослей *Prorocentrum cordatum* Ostenfeld, 1976, *Prorocentrum micans* Ehrenberg, 1834 с доминированием цианобактерий.

Методом проточной цитометрии с использованием витального красителя SYBR GREEN рассчитана численность бактериопланктона в исследуемой акватории (рис. 7). Отмечены значительные колебания значений данного показателя в течение периода измерений, при общей тенденции увеличения летом и при возрастании температуры.

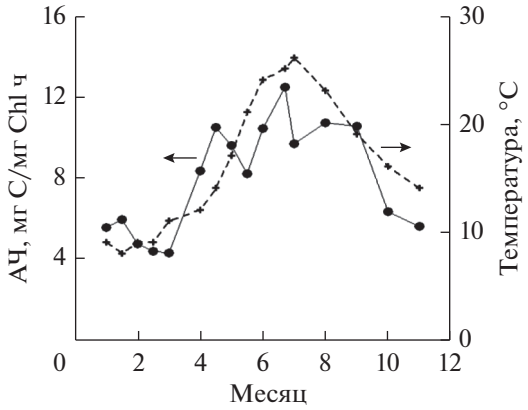


Рис. 5. Сезонные изменения ассимиляционного числа хлорофилла *a* и температуры.

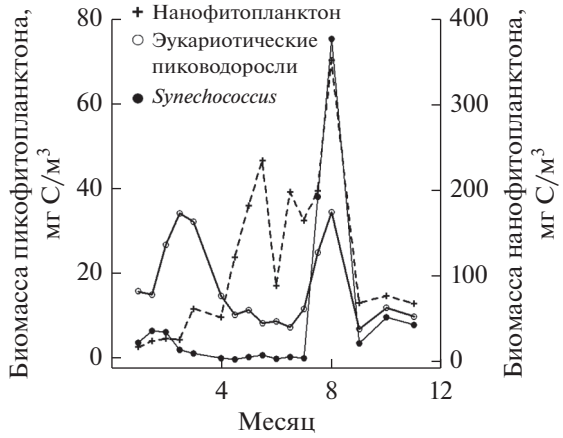


Рис. 6. Сезонный ход биомассы выделенных размерных групп водорослей.

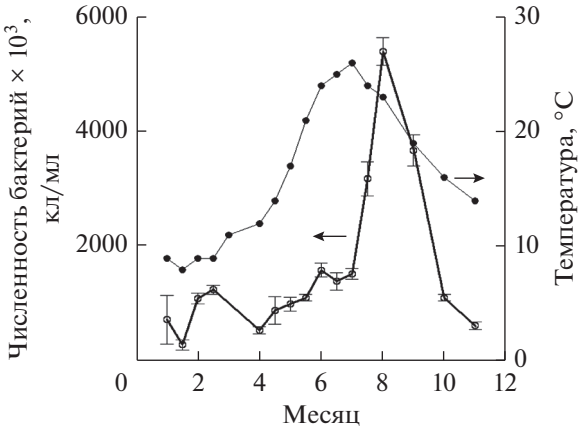


Рис. 7. Сезонный ход численности бактерий в исследуемой акватории.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мидийное марихозяйство оказывает влияние на морскую среду, изменяя ее физические и химические характеристики: в воду поступают продукты метаболизма мидий (фекалии и псевдофекалии), что способствует увеличению в среде концентрации азота и фосфатов, а также растворенного органического вещества (Gilbert et al., 1997; Mirto et al., 2000; Куфтаркова и соавт., 2006). Это, в свою очередь, может привести к трансформации сложившейся экосистемы, к качественным и количественным изменениям бентосных и пелагических сообществ гидробионтов (Куфтаркова и соавт., 2011). Считается, что степень влияния мидийно-устричных хозяйств особенно велика в закрытых и полузакрытых акваториях и зависит от интенсивности водообмена в них (Officer et al., 1982).

Несмотря на то, что в литературе описаны различные воздействия мидийных плантаций на микроводоросли, на сегодняшний день работы, посвященные этому аспекту, показали неоднозначные результаты. Исследуемая нами ферма расположена между бухтами Карантинная и Севастопольская Черного моря и находится в зоне активного водообмена. Глубина на ферме 16–18 м, что позволяет беспрепятственно поступать в ее акваторию водам открытой части моря. В работах (Куфтаркова и соавт., 2011; Попов, Ерохин, 2017) детально рассмотрен данный район исследования и показано, что определяющими и формирующими динамику прибрежных вод являются особенности района, в частности, активность основного черноморского течения, а также интенсивность сгонно-нагонных процессов. Это способствует выносу продуктов метаболизма мидий за пределы марихозяйства (Мысленков, Самсонов, 2014).

Проведенные нами исследования продукционных и структурных характеристик двух станций в районе Черного моря показали отсутствие заметного влияния мидийно-устричного хозяйства небольшой производительности на фитопланктонное сообщество в условиях открытой акватории Черноморского шельфа. Аналогичные результаты получены в ряде других работ (Murdoch, Oliver, 1995; Prins et al., 1998; Dupuy et al., 2000; Zhang et al., 2013), в частности, при исследовании влияния мидийных плантаций в центре Залива Святого Лаврентия (Канада) (Grant et al., 2007; Trottet et al., 2008). Однако авторами (Jiang et al., 2016) показано, что средняя концентрация общего хлорофилла *a* (сумма фракционированного по размеру хлорофилла *a*) в пределах площади мидийного марихозяйства была примерно на 60% меньше, чем на контрольном участке. Авторы связывают это с уменьшением численности используемых в питании устриц крупных видов микроводорослей в зоне аквакультуры и увеличением численности пикофитопланктона, при этом концентрации питательных веществ не показали статистических различий между районами исследования. Наши результаты не подтверждают данный тезис. С помощью проточной цитометрии были идентифицированы три размерные группы водорослей – *Synechococcus* (прокариотическая водоросль), эукариотические пиководоросли и нанофитопланктон, различий в биомассе которых между станциями в течение периода исследования не отмечено. Как и было сказано выше, скорее всего различия в получаемых данных, прежде всего, связаны с местными характеристиками, такими как расстояние между местом отбора проб, самой фермой по выращиванию мидий (различия в плотности мидий внутри ферм), а также с гидродинамическими особенностями в пределах участка культивирования мидий.

Представленные данные по распределению сезонных величин концентрации хлорофилла *a*, биомассы и продукции в целом соответствуют сложившимся ранее представлениям о продуктивности шельфовой части Черного моря, которая главным образом определяется гидрометеорологическими и гидродинамическими факторами. Минимальные зимне-весенние температуры воды 2016 г. были выше 8°C. Как правило, при таких теплых зимах и более слабой вертикальной конвекции не наблюдается массового развития таких видов, как *Skeletonema costatum*, *Psevdo-nitzschia delicatissima* и кокколитофориды *Emiliania huxleyi*, которые зачастую вызывают цветение при более холодных зимах (Сеничива, 2008). Наблюдаемое нами в феврале и марте повышение концентрации хлорофилла *a* и биомассы было вызвано развитием именно этих видов, общая биомасса составляла 100–200 мг C/м^3, что более чем на порядок меньше, чем в холодные годы. По мере прогревания вод и снижения концентрации биогенных элементов, по данным Сеничевой (Сеничива, 2008),

мелкоклеточные виды сменяются в апреле–мае более теплолюбивыми видами *Chaetoceros curvisetus*, *Chaetoceros affinis*, а также кокколитофоридой *Emiliania huxleyi*. Это и привело к наблюдаемому нами майскому повышению концентрации хлорофилла *a* и биомассы нанофитопланктона.

В летний период основной вклад в биомассу вносили различные виды динофитовых, возрастала роль пикофитопланктона. Рассматривая отдельно вклад пикофитопланктона, который недостаточно изучен в Черном море, и сопоставляя наши результаты с полученными ранее, следует отметить, что диапазоны изменения его количественных показателей в целом соответствуют значениям, приведенным в литературе (Стельмах, 1988; Заика и соавт., 1989, 1991; Шалапёнок, Шалапёнок, 1997; Муханов и соавт., 2016). В работе Л.В. Стельмах (Стельмах, 1988) показано, что на долю пикофитопланктона в Севастопольской бухте приходилось от 18 до 44% первичной продукции и от 20 до 40% хлорофилла *a* в течение года; в работе (Муханов и соавт., 2016) отмечены максимальные значения биомассы цианобактерий в летний период.

В течение сезона наблюдали два максимума количества бактерий, один их которых совпал с августовским пиком развития фитопланктона, в частности *Synechococcus*. Максимальные значения численности бактериопланктона в исследуемой акватории получены в летний и раннеосенний периоды, минимальные – в зимний и весенний, что в целом коррелирует с изменениями температуры. Как указывает ряд авторов (Рылькова, 2013; Серегин, 2013), обилие бактериопланктона, главным образом, связано именно с повышением температуры.

Первичная продукция Черного моря является одним из основных показателей ресурсного потенциала водной экосистемы. В ходе проведенного исследования показано, что в холодный период получены минимальные значения, а по мере прогрева воды и увеличения солнечной радиации в теплое время года отмечены максимальные значения валовой первичной продукции (среднее значение 350 ± 43 мг С/м^3 сут), превосходя зимний минимум в 3 раза. А.Б. Демидов (Демидов, 2001), проведя детальный анализ сезонных изменений первичной продукции различных прибрежных районов Черного моря, показал, что во всех шельфовых районах, за исключением Придунайского, где прослеживается только один летний максимум первичной продукции, проявляются зимне-весенний и летний максимумы первичной продукции и биомассы фитопланктона. В ходе нашего мониторинга наблюдался одновершинный характер сезонного хода продукции и биомассы фито- и бактериопланктона. По нашему мнению, это связано с особенностями гидрологического режима акватории: небольшой глубиной, высокой скоростью водообмена, высокими зимними температурами и, как следствие, слабой вертикальной динамической активностью в зимне-весенний период. Августовский пик, возможно, связан со сгонно-нагонными явлениями, о чем косвенно можно судить по некоторому снижению температуры воды.

Параллельно с первичной продукцией фитопланктона считали АЧ хлорофилла *a*. Как указано выше, в летний период оно в среднем составило 10 ± 4 мг С/мг Хл ч при колебаниях от 8 до 12, а для холодного периода года отмечены более низкие значения, которые варьировали от 4 до 6 мг С/мгХл час. Величина и сезонная амплитуда изменений АЧ совпадают с данными, приводимыми Ведерниковым для высокопродуктивных прибрежных вод (Ведерников, 1978). В ряде работ для умеренных и высоких широт зарегистрирована положительная связь температуры и ассимиляционного числа хлорофилла *a* (Williams, 1966; Steven, 1971).

Таким образом, проведенные исследования показали, что основные продукционные и структурные характеристики фитоценоза мидийной фермы малой мощности, расположенной в открытой части шельфовой зоны, и реперной станции существенно не различались. Значительного снижения концентраций фитопланктона на мидийной плантации не произошло, ни с точки зрения общих концентраций хлорофилла *a*, ни с точки зрения биомассы конкретных групп фитопланктона, определенной с помощью проточной цитометрии. Можно сказать, что местное производство мидий, вероятно, недостаточно велико, чтобы оказывать существенное влияние на состав и биомассу планктона в пространственных и временных масштабах. Оценка сезонных изменений продукционных и структурных показателей фитопланктонного сообщества и бактериопланктона в течение годового цикла показала, что между биомассой фитопланктона, первичной валовой продукцией и содержанием хлорофилла *a* наблюдалась положительная корреляция. Ассимиляционное число хлорофилла *a* и концентрация бактерий повышались с увеличением температуры. Суммарная величина дыхания фито- и бактериопланктона в пробах составляла 30–70% от валового фотосинтеза. Одновершинный характер сезонных изменений исследуемых параметров, с летним максимумом, был обусловлен особенностями гидрологического режима шельфовой зоны и высокими зимними температурами 2016 г., что приводило к замедлению вертикальной циркуляции и исчезновению зимне-весеннего пика фитопланктона.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы госзадания № 121041400077-1 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования

гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом".

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

Ведерников В.И. Сезонные изменения ассимиляционного числа морского фитопланктона // Тр. ВГБО. 1978. Т. 22. С. 18–31.

Винберг Г.Г. Первичная продукция водоемов. Минск: РИСО АН БССР, 1960. 23 с.

Галкина В.Н., Кулаковский Э.Е., Кунин Б.Л. Влияние аквакультуры мидий в Белом море на окружающую среду // Океанология. 1982. Т. 22. № 2. С. 321–324.

Демидов А.Б. Сезонные изменения первичной продукции и хлорофилла "*a*" в открытых районах Черного моря. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Москва: МГУ, 2001. 44 с.

Заика В.Е., Шалапёнок Л.С., Покотилов С.Л. Изменение частоты делящихся цианобактерий по глубине и времени суток // АН УССР, ИнБЮМ. Севастополь, 1991. 9е. Деп. в ВИНИТИ 21.02.91, № 870-В91.

Заика В.Е., Шевченко В.А., Булатов К.В. Экология морского фототрофного пикопланктона. М.: НЦБИ, 1989. 171 с.

Золотницкий А.П., Крючков В.Г. О возможных экологических последствиях крупномасштабного культивирования мидий в шельфовой зоне Черного моря // Современные проблемы экологии Азово-Черноморского бассейна / Материалы II межд. конф., 26–27 июня 2006 г., Керчь, ЮгНИРО. Керчь: Изд-во ЮгНИРО, 2006. С. 30–35.

Куфтаркова Е.А., Губанов В.И., Ковригина Н.П., Еремин И.Ю., Сеничева М.И. Экологическая оценка современного состояния вод в районе взаимодействия Севастопольской бухты с прилегающей частью моря // Морской экологический журнал. 2006. Т. 5. № 1. С. 72–91.

Куфтаркова Е.А., Ерёмин И.Ю., Субботин А.А. Тонкая вертикальная химическая структура вод в районе мидийной фермы (предпроливная часть Севастопольской бухты) // Морской экологический журнал. 2011. Т. 10. № 1. С. 38–42.

Муханов В.С. Рылькова О.А., Чурилова Т.Я., Сахонь Е.Г., Пименов Н.В. Структура и сезонная трофодинамика пикофитопланктона в Севастопольской бухте и сопредельных водах Черного моря // Микробиология. 2016. Т. 85. № 5. С. 512–521.

Mukhanov V.S., Rylkova O.A., Churilova T.Y., Sakhon E.G., Pimenov N.V. Structure and seasonal trophodynamics of picophytoplankton in Sevastopol Bay and adjacent waters (the Black Sea) // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 553–561.

Мысленков С.А., Самсонов Т.Е. Исследование течений на шельфе Черного моря с помощью ГНСС-мониторинга // Известия высших учебных заведений. Геодезия и аэрофотосъемка. 2014. Т. 3. С. 60–68.

Объемная концентрация растворенного кислорода в морских водах. Методика измерения йодометрическим методом. РД № 52.10.736-2010; утвержден: 15.11.2010; введен: 2011.07.01 / Росгидромет. М., 2010. URL: https://meganorm.ru/Data2/1/4293791/4293791177.htm

Попов М.А., Ерохин А.В. Течения в районе устрично-мидийной фермы как фактор оптимального функционирования марихозяйства (Севастополь, Черное море) // Морской биологический журнал. 2017. Т. 2. № 4. С. 58–66.
https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.4.06

Рауэн Т.В., Ханайченко А.Н., Муханов В.С. Влияние микроводорослей и их фильтратов на численность бактерий в среде выращивания камбалы калкана // Морской экологический журнал. 2011. Т. 10. № 3. С. 48–56.

Рылькова О.А. Многолетние изменения численности бактериопланктона в прибрежье Севастополя (Черное море) // Морской экологический журн. 2013. Т. 12. № 1. С. 74–79.

Сеничива М.И. Видовое разнообразие, сезонная и межгодовая изменчивость микроводорослей в планктоне к берегов Крыма // Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования / Под. ред. Токарева Ю.Н. и др. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. С. 18–23.

Серегин С.А. Сезонная и многолетняя динамика общей численности бактериопланктона в прибрежных водах Севастополя // Рыбное хозяйство Украины. 2013. Т. 2. С. 10–16.

Стельмах Л.В. Вклад пикопланктона в первичную продукцию и содержание хлорофилла "*a*" в эвтрофных водах на примере Севастопольской бухты // Океанология. 1988. Т. 28. № 1. С. 127–131.

Шалапёнок Л.С., Шалапёнок А.А. Гетерогенность пигментного состава пикоэритринсодержащих пикоцианобактерий *Synechococcus* sp. в Черном море // Микробиология. 1997. Т. 66. № 1. С. 95–100.

Shalapenok L.S., Shalapenok A.A. Heterogeneous pigment composition of phycoerythrin-containing picocyanobacteria *Synechococcus* spp. in the Black Sea // Microbiology (Moscow). 1997. V. 66. P. 80–85.

Cranford P.J., Ward J.E., Shumway S.E. Bivalve filter feeding: variability and limits of the aquaculture biofilter // Shellfish Aquaculture and the Environment / Ed. Shumway S. Wiley-Blackwell, 2011. P. 81–124.
https://doi.org/10.1002/9780470960967.ch4

Dupuy C., Le Gall S., Hartmann H.J., Bréret M. Retention of ciliates andflagellatesby the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds, protists as a trophiclink between bacterioplankton and benthic suspension-feeders // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1999. V. 177. P 165–175.

Gilbert F., Souchu P., Bianchi M., Bonin P. Influence of shellfish farming activities on nitrification, nitrate reduction to ammonium and denitrification at the water-sediment interface of the Thau lagoon, France // Mar. Ecol.

Progr. Ser. 1997. V. 151. P. 143–153.
https://doi.org/10.3354/meps151143

Grant J., Curran K.J., Guyondet T.L., Tita G., Bacher C., Koutitonsky V., Dowd M. A box model of carrying capacity for suspended mussel aquaculture in Lagune deGrande-Entrée, Îles-de-la-Madeleine // Québec. Ecol. Model. 2007. V. 200. P. 193–206.

Heldal M., Scanlan D.J., Norland S., Thingstad F., Mann N.H. Elemental composition of single cells of various strains of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* using X-ray microanalysis // Limnol. Oceanogr. 2003. V. 48. P. 1732–1743.
https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.5.1732

Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a, b, c* 1 and *c* 2 in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1975. V. 167. P. 191–194.
https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3

Jiang T., Chen F., Yu Z., Lu L., Wang Z. Size-dependent depletion and community disturbance of phytoplankton under intensive oyster mariculture based on HPLC pigment analysis in Daya Bay, South China Sea // Environ. Pollut. 2016. V. 219. P. 804–814.

Mirto S., Danovaro R., Mazzola A. Microbial and meiofaunal response to intensive mussel-farm biodeposition in coastal sediments of the western Mediterranean // Mar. Poll. Bull. 2000. V. 40. P. 244–252.
https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00209-X

Murdoch R., Oliver M. Study of chlorophyll concentrations within and around mussel farms: Beatrix Bay, Pelorus Sound. 1995. 1995/6-WN. NIWA, Wellington.

Officer G.B., Smayda T.J., Mann R. Benthic filter feeding: a natural eutrophication control // Mar. Ecol. Progr. Ser. 1982. V. 9. P. 203–210.

Prins T.C., Smaal A.C., Dame R.F. A review of the feedbacks between bivalvegrazing and ecosystem processes // Aquat. Ecol. 1998. V. 31. P. 349–359.

Safi K.A., Hayden B. Differential grazing on natural planktonic populations by the mussel *Perna canaliculus* // Aquat. Biol. 2010. V. 11. P. 113–125.

Safi K.A., Hewitt J.E., Talman S.G. The effect of high inorganic seston loads on prey selection by the suspension-feeding bivalve, *Atrina zelandica* // Exp. Mar. Biol. Ecol. 2007. V. 344. P. 136–148.

Steven D.M. Primary productivity of the tropical western Atlantic Ocean near Barbados // Mar. Biol. 1971. V. 10. P. 261–264.
https://doi.org/10.1007/BF00352816

Trottet A. Roy S., Tamigneaux E., Lovejoy C., Tremblay R. Impact of suspended mussels (*Mytilus edulis* L.) on plankton communities in a Magdalen Islands lagoon (Québec, Canada): A mesocosm approach // Exp. Mar. Biol. Ecol. 2008. V. 365. P. 103–115.

Verity P.G., Robertson C.Y., Tronzo C.R., Andrews M.G., Nelson J.R., Sieracki M.E. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton // Limnol. Oceanogr. 1992. V. 37. P. 1434–1446.
https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.7.1434

Wetz M.S., Lewitus A.J., Koepfler E.T., Hayes K.C. Impact of the eastern oyster *Crassostrea virginica* on microbial community structure in a salt marsh estuary // Aquat. Microbial Ecol. 2002. V. 28. P. 87–97.

Williams R.B., Murdoch M.B. Phytoplankton production and chlorophyll concentration in the Beaufort channel, North Carolina // Limnol. Oceanogr. 1966. V. 11. P. 73–82.
https://doi.org/10.4319/lo.1966.11.1.0073

Worden A.Z., Nolan J.K., Palenik B. Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: the importance of the eukaryotic component // Limnol. Oceanogr. 2004. V. 49. P. 168–179.
https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.1.0168

Zhang X., Huang X., Huang L. Phytoplankton community structure shaped by key environmental factors in fish and shellfish farms in Daya Bay, South China // Aquatic Ecosystem Health and Management. 2013. V. 16. №. 3. P. 300–310.
https://doi.org/10.1080/14634988.2013.817935

Production and Structural Parameters of the Phytoplankton and Bacterioplankton Communities at Two Stations in the Open Part of the Sevastopol Bay Mouth: Assessment of the Effect of the Mussel Farm

E. S. Solomonova[1, *] and A. I. Akimov[1]

[1]*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia*
**e-mail: solomonov83@mail.ru*

Received June 4, 2021; revised June 30, 2021; accepted July 7, 2021

Abstract—Seasonal dynamics of phytoplankton production and structural characteristics was studied at two closely located stations in the open part of the Sevastopol Bay mouth, one of which was a mussel farm. The net primary production, chlorophyll *a* content, total phytoplankton biomass, the quantitative ratio between small and large algal cells, and their seasonal dynamics were the same for both stations. Linear dependencies were observed between the relevant parameters of the stations, with the angular regression coefficients close to 1. The phytoplankton production and biomass peaked during the summer period, reaching 350 ± 43 mg C/(m^3 day) and 450 ± 50 mg C/m^3, respectively. Chlorophyll *a* content varied from 0.5 to 3 mg/m^3, with the minimum in January–February and the maximum in summer. The assimilation number values for chlorophyll *a* during the light period corresponded to those reported for production waters and correlated with the temperatures during the year. Total oxygen consumption by bacterio- and phytoplankton during the summer

period was 30–70% oof net photosynthesis. The data were obtained on seasonal biomass variations in three groups of algae (*Synechococcus*, picoeukaryotic phytoplankton, and nanophytoplanktom); on average, picoalgae constituted 30% of the phytoplankton biomass, with maxima during the winter-spring and summer periods. Bacterioplankton abundance was determined using flow cytometry and the SYBR Green I vital fluorochrome. A positive relation between bacterial abundance and water temperature was shown.

Keywords: mussel farm, fow cytometry, picophytoplankton, nanophytoplankton, biomass, chlorophyll *a*, Black Sea, phytoplankton production, chlorophyll assimilation number, bacterioplankton

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2021, том 90, № 6, с. 763–768

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ВЫСОКОПЕРСИСТЕРНЫЕ ШТАММЫ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ КАК ОСНОВА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ

© 2021 г.
Ю. А. Николаев[a], *, Н. Г. Лойко[a], Е. В. Дёмкина[a], И. А. Борзенков[a], Т. А. Канапацкий[a], Г. И. Эль-Регистан[a]

[a] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН Москва, 119071 Россия*

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

Поступила в редакцию 14.07.2021 г.
После доработки 18.07.2021 г.
Принята к публикации 18.07.2021 г.

Повышение стабильности биопрепаратов на основе углеводородокисляющих бактерий (УОБ), используемых для биоремедиации нефтезагрязненных объектов окружающей среды, является актуальной задачей вследствие частых и массовых разливов нефти. В настоящем исследовании с целью повышения титра жизнеспособных клеток при хранении жидких культур УОБ в неблагоприятных для длительного выживания условиях (температура 18–24°C, доступ кислорода) разработан новый подход, предполагающий создание штамма, образующего повышенное количество клеток-персистеров (высокоперсистерный штамм, ВПШ). ВПШ УОБ *Acinetobacter seifertii* WS1 получен методом антибиотической селекции с использованием ципрофлоксацина. После 13 последовательных циклов селекции доля клеток-персистеров в популяции выросла с исходного уровня 1.2 до 52%. При хранении полученного ВПШ *A. seifertii* в течение нескольких месяцев выживало в 2–4 раза больше клеток, чем в контрольной культуре. Новый штамм сохранял способность к образованию высокого уровня клеток-персистеров при множественных пассажах без антибиотической селекции. После хранения в течение 4 мес. культура ВПШ окисляла нефть со скоростью в 2–4 раза более высокой, чем контрольная культура. Разработанный подход повышения титра жизнеспособных клеток при их длительном хранении применен впервые и может быть использован для нужд экобиотехнологии.

Ключевые слова: углеводородокисляющие бактерии, *Acinetobacter seifertii*, штамм с высоким содержанием клеток-персистеров, длительное хранение, деструкция нефти

DOI: 10.31857/S0026365621060124

Фенотипическая гетерогенность микробных популяций является их конститутивным свойством, обеспечивающим адаптацию и выживание популяций в постоянно меняющихся условиях внешней среды. В литературе широко рассматривается внутрипопуляционная гетерогенность, приводящая к выживанию в стрессовых и неростовых условиях (например, при воздействии бактериоцидных антибиотиков) одной субпопуляции за счет гибели другой. Такая адаптационная стратегия основана на диверсификации изогенной (и даже моноклональной) бактериальной популяции и может рассматриваться в качестве одного из известных феноменов: (1) каннибализм у спорообразующих бактерий в голодающей культуре, когда одна субпопуляция, с низким уровнем белка SpoOA, лизируется и служит дополнительным источником питания для другой субпопуляции, с более высоким уровнем этого белка, “включающим” программу спорообразования (Veening et al., 2005; Lopez, Kolter, 2010); (2) автолиз одной субпопуляции *Streptococcus pneumoniae* приводит к появлению в среде свободной ДНК, которая захватывается компетентными клетками другой субпопуляции, вследствие чего осуществляется передача признаков вирулентности в популяции в целом (Dagkessamanskaia et al., 2004; Guiral et al., 2005); (3) персистенция – это способность одной из субпопуляций, – клеток-персистеров, выживать при воздействии бактерицидных препаратов при одновременной гибели клеток другой субпопуляции (Balaban et al., 2019), продукты автолиза которой способствуют выживанию персистеров (Grant et al., 2012). Клетки-персистеры (П) всегда образуются в развивающейся культуре (П второго типа), но в большем количестве – в культуре стационарной фазы роста (П первого типа) (до 1.0% от общего числа клеток популяции); в новом цикле роста П воспроизводят родительскую популяцию, чувствительную к антибиотикам и другим стрессорам и образующую вновь П (Lewis, 2010; Van der Bergh et al., 2017; Balaban et al., 2019). Показано,

что применение антибиотиков обусловливает приобретение к ним устойчивости за счет как появления антибиотикорезистентных штаммов, так и отбора высокоперсистерных клонов (Van der Bergh et al., 2016a; Bakkeren et al., 2020; Sulaiman, Lam, 2021). Для изучения П как основного фенотипа развития устойчивости к антибиотикам был предложен способ получения высокоперсистерных штаммов (Van der Bergh et al., 2016b). Нами в предыдущих исследованиях была выдвинута гипотеза о созревании П, в которых прошли процессы цитодифференцировки (Balaban et al., 2004, 2019), в цистоподобные покоящиеся формы (ПФ) (Лойко и соавт., 2015; Мулюкин и соавт., 2015), устойчивые к повреждающим воздействиям и сохраняющие жизнеспособность в течение длительного времени (месяцы–годы–миллионы лет) (Эль-Регистан и соавт., 2006). Применение таких ПФ для создания бактериальных препаратов как экологического, так и других назначений, представляется перспективным. В частности, стабилизация жидких биопрепаратов углеводородокисляющих бактерий является актуальной задачей, т.к. они широко используются для целей биоремедиации экотопов, загрязненных нефтепродуктами (Das, Chandran, 2011).

Целью настоящего исследования явилось получение высокоперсистерных штаммов углеводородокисляющих грамотрицательных бактерий и исследование сохранения ими жизнеспособности при длительном хранении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе использовали штамм *Acinetobacter seifertii* WS1 из коллекции культур лаборатории нефтяной микробиологии Института микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН, способный к окислению углеводородов.

Культивирование и определение углеводородокисляющей активности бактерий. Культуру бактерий *A. seifertii* WS1 для получения биопрепарата выращивали в богатой питательной среде LB (Miller, “Sigma-Aldrich”) в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды при температуре 28–30°C на орбитальной качалке (100 об./мин) до стационарной фазы роста. Функциональную (углеводородокисляющую) активность культуры *A. seifertii* после хранения проверяли при росте в минеральной среде Раймонда (г/л): $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.01; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.02; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.01; Na_2HPO_4 – 1.5; KH_2PO_4 – 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2; NH_4NO_3 – 1.0; NaCl – 5.0; pH 6.8–7.2. В качестве единственного источника углерода и энергии в минеральную среду использовали сырую нефть (Черемуховское месторождение, Республика Татарстан, РФ) в концентрации 2 об. %. Бактерии после 4 мес. хранения при 18–24°C и свободном доступе воздуха вносили в среду культивирования (200 мкл, что соответствует ≈6 × 10^8 кл.). Выращивание бактериальных клеток проводили в герметично закрытых флаконах объемом 120 мл с 10 мл среды при температуре 30°C на качалке (100 об./мин). О росте культур и, соответственно, потреблении нефти судили по эмиссии CO_2 (накоплению газа в воздушной фазе) с помощью газового хроматографа Кристалл 5000 (“Хроматэк”, Россия).

Получение высокоперсистерных штаммов. Высокоперсистерные штаммы (ВПШ) *A. seifertii* получали по схеме, описанной в работе Van der Bergh и соавт. (2016a). В пробирки с 5 мл среды LB и антибиотиком ципрофлоксацином (2 мкг/мл, раствор для инфузий; “Курган-синтез”, РФ) вносили 100 мкл культуры стационарной фазы роста, выращенной на среде LB до конечной концентрации (5.9 ± 0.4) × 10^7 кл./мл. Через 3.5 ч (время инкубации с антибиотиком оптимизировано в предварительных экспериментах) определяли количество жизнеспособных клеток (титр колониеобразующих единиц, КОЕ при рассеве на плотные среды), отмывали клетки от антибиотика (при помощи центрифугирования при 5000 *g* в течение 10 мин) 4 раза фосфатным буфером (0.05 М, pH 7.0). Отмытые клетки разводили в 10^3, 10^4, 10^5 раз и использовали в качестве инокулята для выращивания *A. seifertii* в среде LB, как описано выше. Клеточную популяцию, выросшую в варианте опыта с наибольшим разведением инокулята, использовали для следующего цикла экспериментов, как описано выше. Стабильность ВПШ проверяли путем девятикратных пересевов в жидкие (LB) и на плотные (LA) среды без антибиотиков. Жизнеспособность бактериальных клеток в длительно хранящихся культурах определяли по числу КОЕ при высеве клеточных суспензий из десятичных разведений на агаризованную среду LA.

Статистическая обработка данных. Исследования проводили в двух–трехкратной повторности по два параллельных эксперимента в каждом. При расчете титра КОЕ определяли среднее арифметическое и экспериментальный разброс (ошибку) (функция Excell “среднее отклонений экспериментальных значений от среднего”) из 5–7 параллельных проб с использованием программы Microsoft Office Excell 2007. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали экспериментальную ошибку (для экспериментов по определению КОЕ не более 30%). На рисунках представлены результаты типичных экспериментов, каждая точка представляет среднее арифметическое и экспериментальный разброс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходное количество клеток-персистеров первого типа (П I) в культуре *A. seifertii* дикого ти-

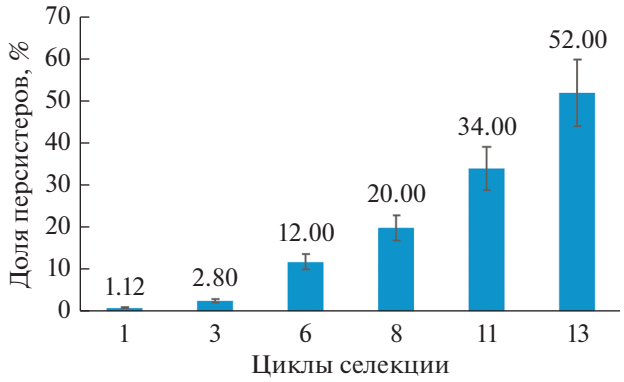


Рис. 1. Изменение количества клеток-персистеров *A. seifertii* в ходе селекции с ципрофлоксацином.

па (ДТ) составляло 1.12% (рис. 1). В качестве селектирующего агента применяли антибиотик ципрофлоксацин. Как видно из рис. 1, с каждым циклом селекции доля клеток-персистеров возрастала. Через 13 циклов селектирующей обработки антибиотиком был получен штамм, численность персистеров у которого составляла 52%. Это свойство стабильно сохранялось в течение последующих 9 пересевов в свежую жидкую (LB) или на плотную (LA) среды без антибиотиков.

При хранении в течение 110 сут исходного (ДТ, дикий тип) штамма и ВПШ после 13 циклов обработки антибиотиком титр жизнеспособных клеток у штамма ДТ снижался более чем на два порядка. У ВПШ число жизнеспособных клеток было выше в 2–4 раза по сравнению с контролем (рис. 2). Несоответствие (~ в 50 раз) между возрастанием удельной доли клеток-персистеров в ВПШ относительно исходного штамма ДТ и превышением (в 2–4 раза) титра КОЕ ВПШ над ДТ, по-видимому, можно объяснить следующими соображениями. Теоретически стратегия “страховки” (bet-hedging) описывает общую популяционную стратегию, обеспечивающую минимизацию рисков исчезновения популяции (вида) при смене условий окружающей среды (Browning et al., 2020). Популяция разделяется (молекулярно-генетическими механизмами) на субпопуляции, у каждой из которых реализуется собственная тактика поведения, что обеспечивает выживание (адаптацию) одной из субпопуляций за счет гибели другой. В нашем случае это: а) среднесрочное (час–сутки) сохранение клеток-персистеров при одновременном автолизе субпопуляции обычных клеток-неперсистеров; б) долгосрочное сохранение жизнеспособности покоящихся форм (ПФ), созревающих из П в образованном автолизате. Пока остается неизвестным, каково должно быть соотношение численности П, созревающих в ПФ, и автолизирующихся клеток, хотя для выживания П и созревания ПФ автолизат необходим (Бухарин и соавт., 2005). Если рассматривать эту ситуацию на уровне функционирования сообщества, то эволюционно должны были сформироваться пределы (min–max) доли в популяциях высокоустойчивых персистеров и образовавшихся из них ПФ, обеспечивающие стабильность состава и функционирования сообщества в целом. Можно предполагать, что более чем 50%-ное образование персистеров – это “завышенный” резерв для сохранения структуры сообщества, поэтому значительная часть персистеров в наших экспериментах не созревала в ПФ. Следует отметить, что отмирание клеток ВПШ протекало гораздо медленнее, чем клеток контрольного штамма: через 1 мес. хранения титр КОЕ в ВПШ был в 24 раза выше, чем в штамме ДТ. А через 3 мес. хранения титр КОЕ в культуре ВПШ был в 2–4 раза выше, чем в контрольном варианте (культура ДТ) (см. рис. 2). Эти данные не противоречат приведенному объяснению.

О сохранении углеводородокисляющей активности исходного и высокоперсистерного штаммов *A. seifertii* судили по образованию CO_2 клетками, растущими на нефти как единственном источнике углерода, при использовании в качестве инокулята культур ДТ и ВПШ, хранившихся в течение 4 мес. (рис. 3).

Как видно из рис. 3, культура *A. seifertii* ВПШ окисляла нефть со скоростью, в 2–3 раза превышающей таковую культуры ДТ, что соответствует большему содержанию жизнеспособных клеток (см. рис. 2). Следует также отметить, что при рассеве ПФ исходного и высокоперсистерного штаммов *A. seifertii* на плотные среды они формировали популяции фенотипически различающихся между собой вариантов-диссоциантов. При этом диссоцианты не отличались способностью окислять коротко- и длинноцепочечные или циклические углеводороды, зато существенно различались характеристиками устойчивости к стрессорам, например, к высоким концентрациям NaCl и ионов Cu^{2+} (данные не приводятся). Следует отметить, что прорастание ПФ в виде спектра различающихся диссоциантов типично для цистоподобных

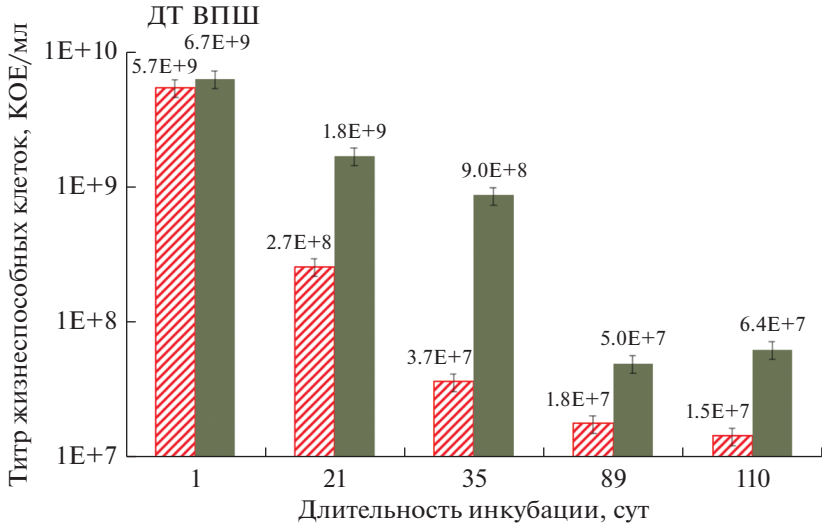


Рис. 2. Титр жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) исходного (ДТ) и высокоперсистерного (ВПШ) штаммов *A. seifertii* при хранении в течение 4 мес.

ПФ и многократно показано ранее для бактерий разных таксонов, в том числе биотехнологически значимых штаммов (Эль-Регистан, 2006; Solyanikova et al., 2011; Мулюкин и соавт., 2014; Ivshina et al., 2015).

Таким образом, в результате проведенных исследований впервые получен высокоперсистерный (более 50%) штамм *A. seifertii* – деструктора нефтепродуктов. При длительном (4 мес.) хранении ВПШ в провокационных условиях (при температуре 18–24°C и доступе кислорода) число сохранивших жизнеспособность клеток было в 2–4 раза больше, чем в исходном штамме. Полученный новый ВПШ сохранял способность к образованию персистеров в течение 9 и более пересевов без селекции. После хранения в течение 4 мес. культура ВПШ окисляла нефть с большей скоростью по сравнению с таковой контрольной культуры. По показателю повышения эффективности биодеструкции нефти относительно исходного штамма после длительного хранения, созданный штамм сопоставим с культурами, стабилизированными с применением новых биокомпозитных материалов (Николаев и соавт., 2021, в печати).

Разработанный прием получения высокоперсистерных штаммов, обеспечивающий сохранение высокого титра жизнеспособных клеток при длительном хранении и высокую функциональную активность, может быть рекомендован для нужд экобиотехнологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-05009/18 и, частично, госзадания Минобрнауки РФ для ФИЦ Биотехнологии РАН.

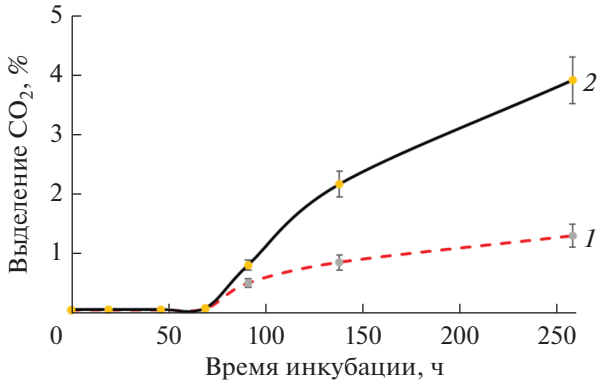


Рис. 3. Накопление CO_2 высокоперсистерным (ВПШ) (*2*) и исходным (ДТ) (*1*) штаммами *A. seifertii* после хранения в течение 4 мес., при их росте в минеральной среде с нефтью.

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

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

Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 595–609.

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

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

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

Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 15–27.

Mulyukin A.L., Suzina N.E., Mel'nikov V.G., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Microbiology (Moscow). 2014. V. 85. P. 149–159.

Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Дёмкина Е.В., Лойко Н.Г., Канапацкий Т.А., Перминова И.В., Хрептугова А.Н., Григорьева Н.В., Близнец И.В., Манучарова Н.А., Сорокин В.В., Коваленко М.А., Эль-Регистан Г.И. Новые биокомпозитные материалы на основе углеводородокисляющих бактерий и их потенциал для деградации нефтепродуктов // Микробиология. 2021. (В печати).

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

Bakkeren E., Diard M., Hardt W.D. Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence // Nat. Rev. Microbiol. 2020. V. 18. P. 479–490.

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

Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.M., Hardt W.D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.W., Tenson T., Van Melderen L., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 441–448.

Browning A.P., Sharp J.A., Mapder T., Baker C.M., Burrage K., Simpson M.J. Persistence as an optimal hedging strategy // Biophys. J. 2020. V. 120. P. 133–142.

Dagkessamanskaia A., Moscoso M., Hénard V., Guiral S., Overweg K., Reuter M., Martin B., Wells J., Claverys J.-P. Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells // Mol. Microbiol. 2004. V. 51. P. 1071–1086.

Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview // Biotechnol. Res. Int. 2011. Art. 941810.
https://doi.org/10.4061/2011/941810

Grant S.S., Kaufmann B.B., Chand N.S., Haseley N., Hung D.T. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 12147–12152.

Guiral S., Mitchell T.J., Martin B., Claverys J.-P. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 8710–8715.

Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. P. 307–314.

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

Lopez D., Kolter R. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis* // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. P. 134–149.

Solyanikova I.P., Suzina N.E., Golovleva L.A., Mulyukin A.L., El-Registan G.I. Improved xenobiotic-degrading activity of *Rhodococcus opacus* strain 1cp after dormancy // J. Environ. Sci. Health B. 2011. V. 46. P. 638–647.

Sulaiman J.E., Lam H. Evolution of bacterial tolerance under antibiotic treatment and its implications on the development of resistance // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 617412.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.617412

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

Van den Bergh B., Michiels J.E., Michiels J. Experimental evolution of *Escherichia coli* persister levels using cyclic an-

tibiotic treatments // Methods Mol. Biol. 2016a. V. 1333. P. 131–143.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5_12

Van den Bergh B., Michiels J.E., Wenseleers T., Windels E.M., Boer P.V., Kestemont D., De Meester L., Verstrepen K.J., Verstraeten N., Fauvart M., Michiels J. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence // Nat. Microbiol. 2016b. V. 1. Art. 16020.
https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.20

Veening J.-W., Hamoen L.W., Kuipers O.P. Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. 2005. V. 56. P. 1481–1494.

Highly Persistent Strains of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria as a Base for Increasing the Viable Cell Numbers during Long-Term Storage

Yu. A. Nikolaev[1, *], N. G. Loiko[1], E. V. Demkina[1], I. A. Borzenkov[1], T. A. Kanapatskii[1], and G. I. El'-Registan[1]

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

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

Received July 14, 2021; revised July 18, 2021; accepted July 18, 2021

Abstract—Due to frequent and large-scale oil spills, increasing the stability of biopreparations with hydrocarbon-oxidizing bacteria (HOB), which are used for bioremediation of oil-contaminated environmental objects, is presently an important task. In the present work, a new approach for maintaining the viable HOB cell titer under unfavorable storage conditions (oxygen availability at 18–24°C) was developed, which implies constructing a strain with increased number of persister cells (High Persistence Strain, HPS). The HPS of a HOB bacterium *Acinetobacter seifertii* WS1 was obtained by antibiotic selection with ciprofloxacin. The share of persister cells in the population increased after 13 sequential selection cycles from 1.2 to 52%. Several months of storage of the *A. seifertii* HPS resulted in 2–4 times better survival than in the control. The new strain retained ability to produce high numbers of persister cells after numerous transfers without antibiotic selection. The rate of oil oxidation by the HPS culture after 4-month storage was 2–4 times higher than in the control culture. The eveloped approach to increasing the viable cell titer of long-term-stored cells has not been applied previously and may be used in ecobiotechnology.

Keywords: hydrocarbon-oxidizing bacteria, *Acinetobacter seifertii*, strains with high persister cells content, long-term storage, oil degradation