

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 91, номер 6, 2022

## ОБЗОРЫ

Редактирование геномов метанотрофных бактерий: возможные мишени и доступный инструментарий

*В. Н. Хмеленина, С. Ю. Бут, О. Н. Розова, И. Ю. Ошкин,  
Н. В. Пименов, С. Н. Дедыш*

647

На краю радуги: длинноволновые хлорофиллы и фотосинтетическая адаптация цианобактерий к дальнему красному свету

*А. В. Пиневиц, С. Г. Аверина*

666

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Ацидобактерии в низинных болотах: филогенетическое разнообразие и анализ геномов ключевых представителей

*С. Н. Дедыш, А. А. Иванова, Ш. А. Бегматов, А. В. Белецкий,  
А. Л. Ракитин, А. В. Марданов, Д. А. Филиппов, Н. В. Равин*

685

Анализ устойчивости к осмотическому стрессу биопленок почвенных бактерий *Azospirillum brasilense*

*Д. И. Мокеев, И. В. Волохина, Е. М. Телешева, С. С. Евстигнеева,  
В. С. Гринев, Т. Е. Пылаев, Л. П. Петрова, А. В. Шелудько*

695

Выживание стареющих микробных популяций при летальных воздействиях

*Г. И. Эль-Регистан, Н. Г. Лойко, Ю. А. Николаев*

708

Деградация глицинбетаина в реакции Стикленда галоалкалофильной бактерией *Halonatronomonas betaini*, выделенной из содового озера Танатар III

*Е. Н. Деткова, Ю. В. Болтянская, В. В. Кевбрин*

720

Состав микробных обрастаний на поверхности пластиков и стали, экспонированных в водоеме на полигоне твердых бытовых отходов

*Т. П. Турова, Д. Ш. Соколова, Е. М. Семенова, Д. М. Киреев,  
А. Б. Лаптев, Т. Н. Назина*

726

Эндوفитные грибы *Pezizcula radiciala* в клубеньках актиноризных растений

*Г. А. Кочкина, Н. Е. Иванушкина, И. П. Пинчук, С. М. Озерская*

742

Антимикробная активность бактерий, выделенных из многоножек *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha* sp.

*Т. А. Ефименко, А. В. Якушев, А. А. Карбанова, А. А. Глухова, М. В. Демьянкова,  
Б. Ф. Васильева, Ю. В. Бойкова, Н. Д. Малкина, Л. П. Терехова, О. В. Ефременкова*

749

Влияние фторидных соединений сурьмы на почвенную микрофлору и методы их детоксикации

*И. В. Киселева, А. Н. Холомейдик, Л. Н. Щапова, А. Е. Панасенко*

763

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Микоцитопирование некоторых “самостоятельных” видов рода *Candida*

*В. И. Голубев*

769

Поправка

772

# Contents

---

---

Vol. 91, No. 6, 2022

---

---

## Reviews

- Genome Editing in Methanotrophic Bacteria: Potential Targets and Available Tools  
*V. N. Khmelenina, S. Yu. But, O. N. Rozova, I. Yu. Oshkin,  
N. V. Pimenov, and S. N. Dedysch* 647
- On the Edge of the Rainbow: Red-Shifted Chlorophylls and Far-Red Light  
Photoadaptation in Cyanobacteria  
*A. V. Pinevich and S. G. Averina* 666
- 

## Experimental Articles

- Acidobacteria in Fens: Phylogenetic Diversity and Genome Analysis  
of the Key Representatives  
*S. N. Dedysch, A. A. Ivanova, Sh. A. Begmatov, A. V. Beletsky, A. L. Rakitin,  
A. V. Mardanov, D. A. Philippov, and N. V. Ravin* 685
- Resistance of Biofilms Formed by the Soil Bacterium *Azospirillum brasilense*  
to Osmotic Stress  
*D. I. Mokeev, I. V. Volokhina, E. M. Telesheva, S. S. Evstigneeva, V. S. Grinev,  
T. E. Pylaev, L. P. Petrova, and A. V. Shelud'ko* 695
- Survival of Aging Microbial Populations under Lethal Impacts  
*G. I. El-Registan, N. G. Loiko, and Yu. A. Nikolaev* 708
- Glycine Betaine Degradation via the Stickland Reaction by a Haloalkaliphilic Bacterium  
*Halonatronomonas betaini* Isolated from the Tanatar III Soda Lake  
*E. N. Detkova, Yu. V. Boltyanskaya, and V. V. Kevbrin* 720
- Composition of Microbial Fouling on the Surface of Plastic and Steel Exposed in a Pond  
at a Solid Waste Landfill  
*T. P. Tourova, D. S. Sokolova, E. M. Semenova, D. M. Kireev,  
A. B. Laptev, and T. N. Nazina* 726
- Endophytic Fungi *Pezizula radicolica* in the Root Nodules of Actinorizal Plants  
*G. A. Kochkina, N. E. Ivanushkina, I. P. Pinchuk, and S. M. Ozerskaya* 742
- Antimicrobial Activity of Bacteria Isolated from the Millipedes *Nedyopus dawydoffiae*  
and *Orthomorpha* sp.  
*T. A. Efimenko, A. V. Yakushev, A. A. Karabanova, A. A. Glukhova, M. V. Demiankova,  
B. F. Vasilieva, Y. V. Boykova, N. D. Malkina, L. P. Terekhova, and O. V. Efremenkova* 749
- Impact of Antimony Fluoride Compounds on Soil Microflora and Methods  
of Their Detoxification  
*I. V. Kiseleva, A. N. Kholomeidik, L. N. Shchapova, and A. E. Panasenko* 763
- 

## Short Communications

- Mycocinotyping of Some Unaffiliated *Candida* Species  
*W. I. Golubev* 769
- Errata 772
- 
-

## РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ: ВОЗМОЖНЫЕ МИШЕНИ И ДОСТУПНЫЙ ИНСТРУМЕНТАРИЙ

© 2022 г. В. Н. Хмеленина<sup>а</sup>, С. Ю. Бут<sup>а, б</sup>, О. Н. Розова<sup>а, б</sup>, И. Ю. Ошкин<sup>б</sup>,  
Н. В. Пименов<sup>б</sup>, С. Н. Дедыш<sup>б, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пущинский научный центр  
биологических исследований Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

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

\*e-mail: dedysh@mail.ru

Поступила в редакцию 17.07.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 26.07.2022 г.

Аэробные метанотрофные бактерии – это прокариотические микроорганизмы, обладающие уникальными ферментами, метанмонооксигеназами, позволяющими им использовать метан (CH<sub>4</sub>) в качестве ростового субстрата. Эта метаболическая особенность метанотрофов делает их привлекательными объектами биотехнологий, основанных на использовании метана для производства микробного белка и ряда целевых метаболитов. Растущий интерес к этим технологиям обусловлен высокой доступностью CH<sub>4</sub>, являющегося основным компонентом природного газа и биогаза, образующегося в результате анаэробной переработки органических отходов. Аэробные метанотрофы окисляют метан при температуре и давлении окружающей среды, поэтому перспективны в качестве биокатализаторов преобразования CH<sub>4</sub> в продукты с добавленной стоимостью. Развитие биотехнологий конверсии метана с применением метанотрофов предполагает привлечение методов геномного редактирования для улучшения характеристик штаммов этих бактерий, используемых для производства. Специфика метаболизма CH<sub>4</sub>-использующих бактерий, а также сложности работы с этими объектами долгое время сдерживали развитие метаболической инженерии метанотрофов. В настоящем обзоре рассмотрены успехи последних десятилетий в области метаболической инженерии аэробных метанотрофов, описаны вероятные мишени и доступный инструментарий редактирования геномов этих микроорганизмов. Использование этого инструментария открывает возможности получения штаммов с биотехнологически ценными характеристиками, а также более глубокого изучения метаболических особенностей аэробных метанотрофов.

**Ключевые слова:** метанотрофные бактерии, разнообразие аэробных метанотрофов, специфика метаболизма метанотрофов, биоконверсия метана, редактирование геномов, метаболическая инженерия

DOI: 10.31857/S0026365622600584

Аэробные метанотрофные бактерии – это группа прокариотических микроорганизмов, специализированных на использовании метана (CH<sub>4</sub>) в качестве единственного источника углерода и энергии (Hanson, Hanson, 1996; Гальченко, 2001; Trotsenko, Murrell, 2008; Chistoserdova, Lidstrom, 2013; Khmelena et al., 2018). Способность к окислению метана обусловлена наличием у этих бактерий уникального фермента – метанмонооксигеназы (ММО), которая существует в двух структурно и биохимически различных формах (Murrell et al., 2000; Murrell, Smith, 2010). Одна из форм, мембранная ММО (particulate ММО, рММО), имеется у подавляющего большинства известных метанотрофов и локализована во внутрицитоплазматических мембранах (ВЦМ), выявляемых на ультратонких срезах клеток метанотрофов. Другая форма

этого фермента, растворимая ММО (soluble ММО, sММО), присутствует лишь у некоторых метанотрофов и локализована в цитоплазме. Структурные и каталитические характеристики этих форм ММО, а также история попыток гетерологичной экспрессии этих ферментов в неметанотрофных микроорганизмах освещены в недавнем обзоре (Khider et al., 2021).

Метанотрофные бактерии населяют широкий спектр экосистем (Knief, 2015) и играют ключевую роль в глобальном цикле углерода, снижая потоки парникового газа CH<sub>4</sub> из природных и антропогенных местообитаний в атмосферу (Conrad, 2009). Помимо очевидной биосферной значимости аэробных метанотрофов, эти бактерии имеют большой, но пока лишь частично востребованный биотехнологический потенциал, обусловленный

их способностью осуществлять конверсию метана в различные продукты с добавленной стоимостью (Strong et al., 2015; Pieja et al., 2017; Kalyuzhnaya et al., 2020). Растущий интерес к подобным биотехнологиям обусловлен сравнительной дешевизной и высокой доступностью  $\text{CH}_4$ , являющегося основным компонентом природного газа и биогаза, образуемого в результате анаэробной трансформации органических отходов.

Первой реализованной в промышленном масштабе технологией с использованием метанотрофов явилось получение микробной биомассы, пригодной в качестве эффективной белковой добавки в корм сельскохозяйственных животных (“Гаприна”) (Григорян, Горская 1970; Namer, Harrison, 1980; Егоров и соавт., 1990; Лалов, 1991). Уже более полувека активно изучаются возможности использования метанотрофов для получения разнообразных соединений, таких как каротиноиды, полигидроксibuтират и полисахариды (Bothe et al., 2002; Ye et al., 2007), а также для биоремедиации экосистем, загрязненных хлорированными углеводородами (Murrell, Smith, 2010; Smith, Nichol, 2018). В исследованиях последних десятилетий основной упор делается на модификации биохимических путей метанотрофов для получения целевых метаболитов (Kalyuzhnaya et al., 2015; Henard et al., 2016; Garg et al., 2018; Nguyen et al., 2019; Nguyen, Lee, 2019; Pham et al., 2022b). Основные организмы-объекты этих работ по метаболической инженерии, ныне доступный инструментарий для редактирования геномов метанотрофных бактерий, а также возможные мишени направленных модификаций рассмотрены нами ниже.

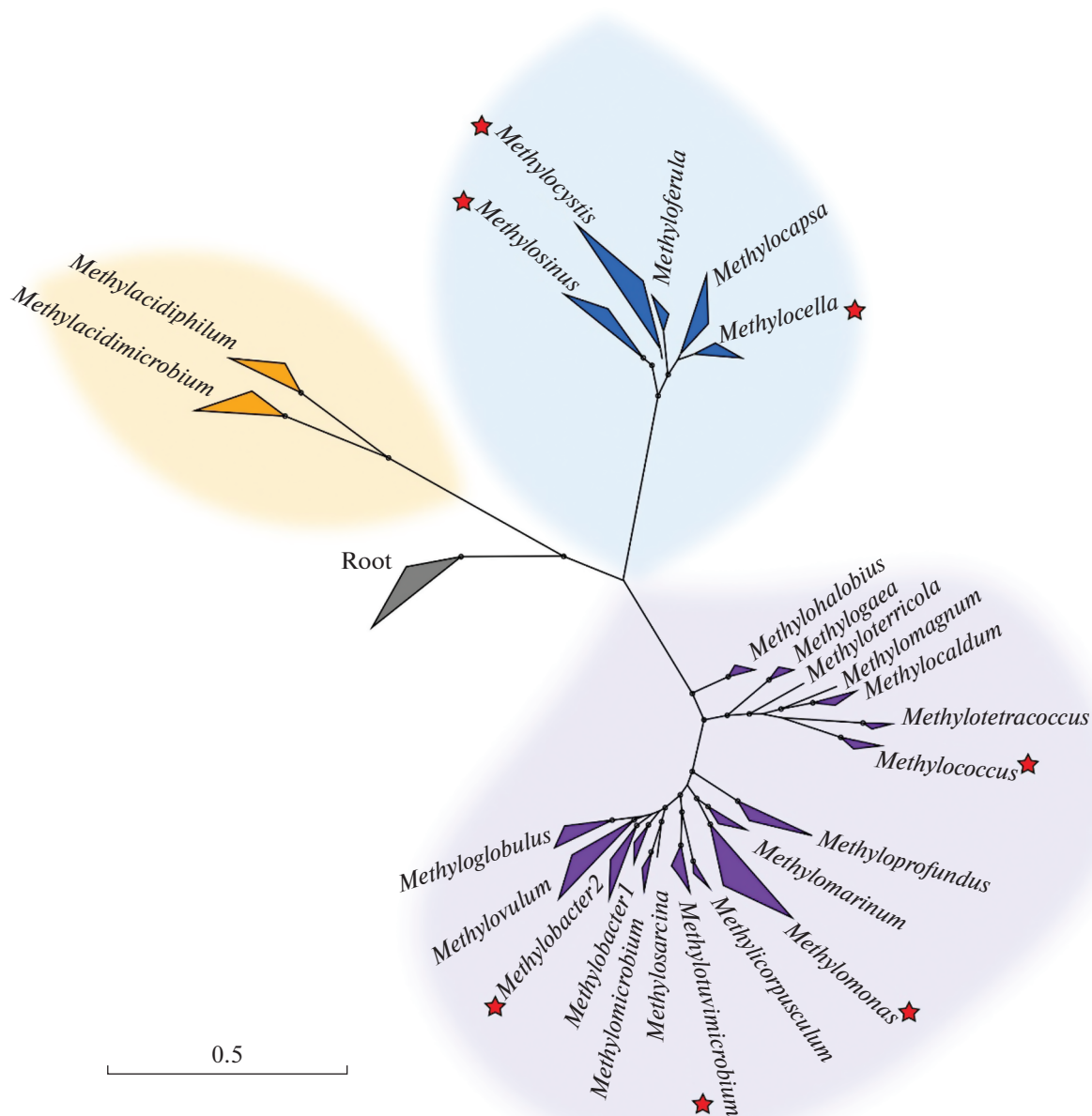
## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АЭРОБНЫХ МЕТАНОТРОФОВ

**Охарактеризованное разнообразие метанотрофных бактерий.** Ныне известные аэробные метанотрофные бактерии формируют три основные филогенетические ветви, две из которых лежат в пределах филума *Proteobacteria*, а третья – в пределах *Verrucomicrobia* (рис. 1). Протеобактериальные метанотрофы, принадлежащие к классам *Alpha*- и *Gamma*proteobacteria, представлены наибольшим числом изученных культур и охарактеризованных таксонов (четыре семейства, около трех десятков родов и шести десятков видов) (Dedysh, Knief, 2018). Перечень этих таксонов включает организмы с различными фенотипическими характеристиками и предпочтениями к росту при различных температурах, рН среды, солёности и проч. Метанотрофы класса *Gamma*proteobacteria высоко специализированы на использовании  $\text{C}_1$ -соединений и не растут на полиуглеродных субстратах, таких как сахара или органические кислоты. В числе

*Alphaproteobacteria*, напротив, имеется ряд факультативных метанотрофов, способных помимо метана использовать ограниченное число органических соединений, таких как ацетат, пируват, этанол и некоторые короткоцепочечные алканы (Dedysh, Dunfield, 2010). Метанотрофные представители *Verrucomicrobia* формируют узкий филогенетический кластер, представленный семейством *Methylacidiphilaceae*, и являются термофильными или мезофильными ацидофилами, населяющими исключительно геотермальные экосистемы (Op den Camp et al., 2009; Schmitz et al., 2021). В отличие от протеобактериальных метанотрофов, представители *Methylacidiphilaceae* являются автотрофами и используют метан в качестве источника энергии, окисляя его до  $\text{CO}_2$ , который затем фиксируют в цикле Кальвина (Khadem et al., 2011). Альтернативным источником энергии для этих метанотрофов является  $\text{H}_2$  (Schmitz et al., 2021). Более полная информация об охарактеризованных на сегодняшний день аэробных метанотрофах представлена на веб-сайте Methanotroph Commons (<http://www.methanotroph.org>).

**Метаболическое разнообразие аэробных метанотрофов.** Метанотрофы окисляют  $\text{CH}_4$  до метанола ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) в присутствии кислорода с образованием одной молекулы воды и потреблением двух электронов и двух протонов. По сравнению с sММО, рММО имеет более высокое средство к метану, ее функционирование коррелирует с более высокой эффективностью роста (Murrell et al., 2000). Для активности sММО необходим НАДН, а непосредственным донором электронов для рММО является убихинол ( $\text{UQH}_2$ ), восстанавливаемый НАДН через комплекс I цепи переноса электронов. Не исключено также, что электроны, образующиеся при окислении метанола, передаются непосредственно на рММО для окисления метана (Lieven et al., 2018). У метанотрофов, имеющих как растворимую, так и мембранную ММО, экспрессия этих ферментов регулируется ионами меди: рММО экспрессируется во время роста при высоком соотношении меди и биомассы, тогда как sММО – при низком соотношении меди к биомассе (Murrell et al., 2000). Благодаря свойству sММО окислять широкий спектр субстратов, включая окисигенирование монооксида углерода, некоторых алканов, алкенов, галогенированных метанов и циклических соединений (задокументировано более чем 100 субстратов, см. обзор Murrell, Smith 2010), изучаются возможности использования метанотрофных бактерий в биоремедиации для разложения ряда загрязняющих веществ, таких как трихлорэтилен (ТХЭ) и хлорированные углеводороды (Smith, Nichol, 2018), а также для синтеза гомохиральных эпоксидов (Jiang et al., 1996, 2010; Khider et al., 2021).





**Рис. 1.** Филогенетическая дендрогрaмма, построенная на основании результатов сравнительного анализа 157 последовательностей геномов аэробных метанотрофных бактерий, представленных в базе данных GTDB (Parks et al., 2022). Анализ выполнен с помощью Genome Taxonomy Database toolkit, версия 2.0.0 (Chaumeil et al., 2020). Филогенетические ветви метанотрофных представителей *Verrucomicrobia*, *Alpha*- и *Gammaproteobacteria* выделены оранжевым, синим и лиловым цветами соответственно. Звездочками обозначены роды метанотрофов, представители которых становились объектами исследований с использованием генетических манипуляций. Уровни поддержки (бутстреппы) рассчитаны методом “maximum-likelihood” путем построения 100 альтернативных дендрогрaмм. Значения бутстреппов более 70% показаны черными кружками. В качестве корня использованы геномы бактерий филума *Calditerrichota*. Маркер – 0.5 замен на одну аминокислотную позицию.

Окисление метанола в формальдегид катализирует метанолдегидрогеназа (МДГ). У метанотрофов имеются две формы МДГ, обе содержат пирролохинолинхинон (PQQ) в качестве простетической группы. Гетеротетрамерная МхaFI-МДГ содержит кальций в активном центре, тогда как

односубъединичная ХохF-МДГ содержит редкоземельный элемент вместо кальция. Окислительные превращения формальдегида в формиат катализируют ферменты тетрагидрофолат (ТГФ)- и тетрагидрометаноптерин (ТГМП)-зависимых путей. Последнюю стадию окисления метана до

CO<sub>2</sub> катализирует формиатдегидрогеназа (ФДГ), поставляющая НАДН для монооксигенирования метана или в дыхательную систему для синтеза АТФ. У метанотрофов обнаруживаются до четырех изоформ ФДГ, причем некоторые из них катализируют обратимую реакцию.

Для ассимиляции углерода метанотрофы используют три биохимических пути: сериновый цикл, рибулозомонофосфатный (РМФ) путь и цикл Кальвина. Метанотрофы класса *Alphaproteobacteria* используют сериновый путь, в котором C<sub>1</sub>-соединение в форме N<sub>5</sub>,N<sub>10</sub>-метилтен-тетрагидрофолата реагирует с глицином с образованием серина (Chistoserdova, Lidstrom, 2013). Затем аминокетид серина переносится на глиоксилат с образованием глицина и гидроксипирувата, последний в серии реакций трансформируется в глицеральдегид-3-фосфат и пируват — универсальные метаболиты-предшественники всех компонентов клеток. Метанотрофы класса *Gammaproteobacteria* ассимилируют углерод посредством РМФ и серинового путей, функционирующих одновременно. Эта избыточность характерна для метанотрофов, но не для не растущих на метане метилотрофов (Бут и соавт., 2017). Первыми соединениями при построении C—C связи в РМФ пути являются C<sub>6</sub>-фосфосахара: гексулозо-6-фосфат, образуемый конденсацией формальдегида и рибулозо-5-фосфата, далее изомеризацией гексулозо-6-фосфата образуется фруктозо-6-фосфат. Эти реакции катализируют два специфических фермента — гексулозофосфатсинтаза (ГФС) и фосфогексулоизомераза (ФГИ). Геномный анализ выявил дупликацию, а иногда и трипликацию генов *hps* у некоторых быстрорастущих метанотрофов (Розова и соавт., 2017), однако влияние количества генов *hps* на физиологические характеристики штаммов предстоит определить. Для распада фосфосахаров и синтеза C<sub>3</sub>-соединений эти метанотрофы используют ферменты пентозофосфатного и гликолитического путей, путь Энтнера—Дудорова и фосфокетолазу (бифидобактериальный шунт). Они имеют полный набор ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), включая обходные пути для некоторых реакций цикла, а также механизмы для восполнения C<sub>4</sub> интермедиатов (Fu et al., 2017; Khmelénina et al., 2019). Чрезвычайная гибкость метаболизма гаммапротеобактериальных метанотрофов предоставляет широкие возможности для управления потоками углерода на синтез нужных метаболитов. Представитель этого класса термотолерантный метанотроф *Methylococcus capsulatus* дополнительно ассимилирует CO<sub>2</sub> через цикл Кальвина, служит модельным организмом при изучении метанотрофии как способа питания микроорганизмов и используется для разработки процессов культивирования в промышленном масштабе (Overland et al., 2010). В 2013 году впервые

на примере галотолерантного *Methylovivimicrobium alcaliphilum* 20Z показана способность метанотрофов к ферментации формальдегида в условиях лимитирования роста кислородом и, как следствие, к накоплению в среде органических метаболитов (Kalyuzhnaya et al., 2013). Данная работа изменила представления о “токсичности” низкомолекулярных соединений для метанотрофов (Eccleston, Kelly, 1973) и послужила стимулом к более углубленному изучению метаболических путей трансформации метана. Поскольку галоалкалофильные метанотрофы демонстрируют устойчивый рост в широком диапазоне pH, солености, концентраций метанола, при низком парциальном давлении кислорода, а также проявляют повышенную устойчивость к загрязнению, они стали не только перспективными катализаторами биоконверсии метана, но и удобными объектами фундаментальных исследований. Метанотрофы с сериновым путем, будучи представлены как облигатными, так и факультативными формами по отношению к источнику углерода, имеют ряд преимуществ в качестве агентов биоремедиации и промышленной биотехнологии с использованием природного газа (Crombie, Murrell, 2011; Dunfield, Dedysh, 2014; Bordel et al., 2020).

## СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ МЕТАНОТРОФОВ

**Спонтанный мутагенез.** По сравнению с традиционными объектами работ по геномному редактированию, такими, например, как *Escherichia coli* или *Corynebacterium*, манипуляции с метанотрофами существенно более длительны и трудоемки вследствие сложности культивирования этих бактерий. Первые работы по получению устойчивых к антибиотикам мутантов *Methylococcus* и *Methylo-tonas* основывались на использовании ультрафиолета или химических агентов (например, нитрозогуанидина, этилметансульфоната) (Harwood et al., 1972; Williams et al., 1977). Однако применение подхода спонтанного мутагенеза оказалось неэффективным, что объяснялось функционированием у метанотрофов высокоточных систем репарации ДНК. Однако впоследствии путем адаптивной лабораторной эволюции были получены штаммы, устойчивые к дихлорметану (Nicolaidis, Sargent, 1987) и рифамицину (Puri et al., 2015). Эти эксперименты продемонстрировали необходимость отработки подходящих методов скрининга и закрепления вносимых мутаций. Достаточно успешными оказались попытки транспозонного мутагенеза метанотрофов, которые завершились получением мутантов с делециями генов фиксации азота (Toukdarian, Lidstrom, 1984) или штаммов-продуцентов каротиноидов (Sharpe et al., 2007).

**Двойная гомологичная рекомбинация.** На сегодняшний день наиболее распространенным мето-

дом инактивации генов у метанотрофов является двойная гомологичная рекомбинация, сопровождаемая инсерцией кассеты устойчивости к антибиотикам, которая замещает ген-мишень (рис. 2а). Такая методология успешно применялась для *Mm. alcaliphilum* 20Z (Mustakhimov et al., 2010; Бут и соавт., 2013; Henard et al., 2018; But et al., 2020), *Ms. capsulatus* (Csaki et al., 2003; Henard et al., 2021), *Methylosinus trichosporium* OV3b (Stafford et al., 2003). Фрагменты ДНК, фланкирующие гены-мишени (“плечи” гена), клонируются в суицидальные (т.е. не реплицирующиеся в клетках реципиента) векторы рСМ184 или рК18mob, по этим фрагментам происходит рекомбинация.

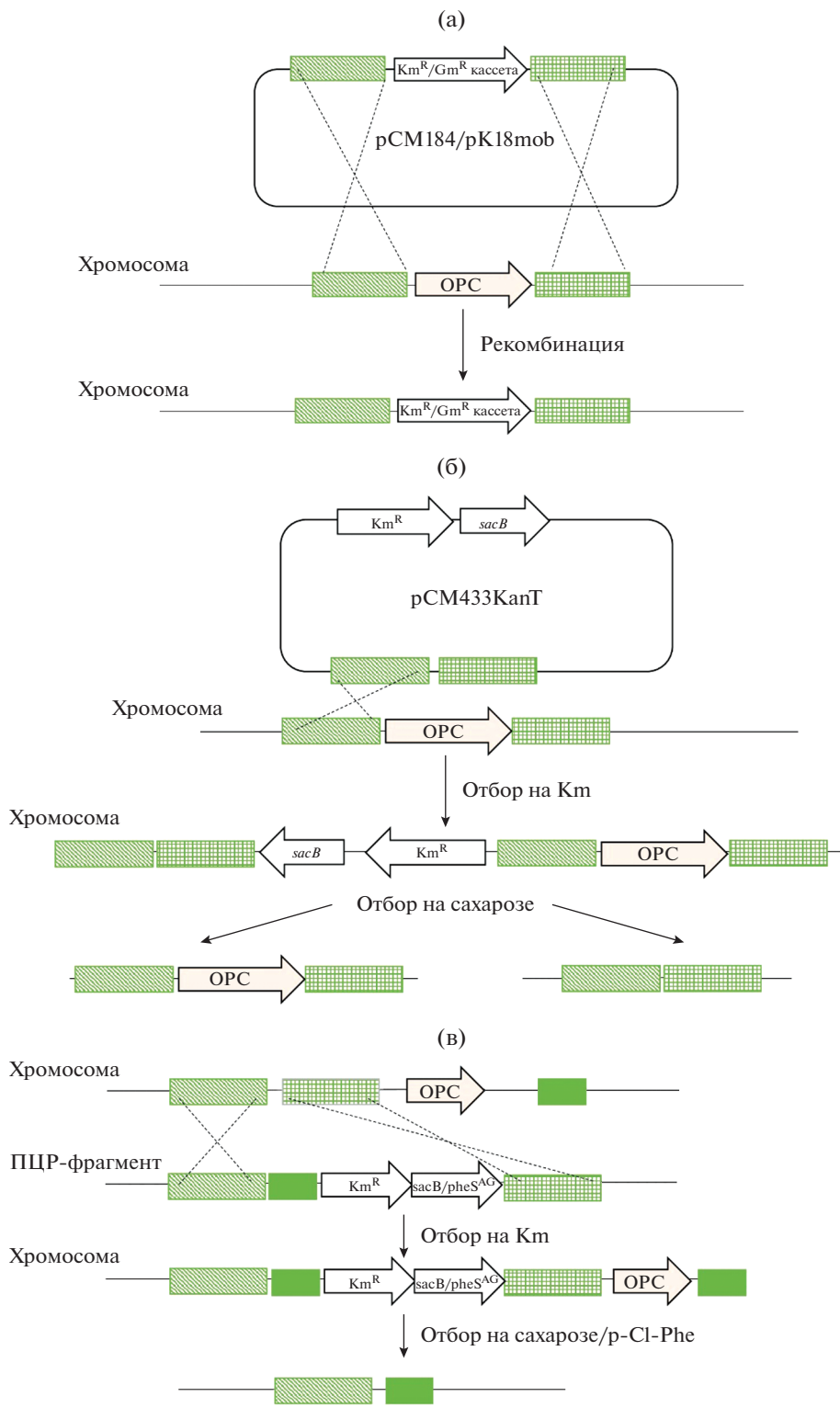
**Методы трансформации.** Для доставки плазмид в клетки метанотрофов используются два основных метода – трансформация на основе конъюгации и трансформация на основе электропорации (Crombie, Murrell, 2011; Yan et al., 2016; Ro, Rosenzweig, 2018). Трансформацию с помощью конъюгации проводят посредством двухродительского скрещивания со штаммом *E. coli* S-17-1. Большое значение для генетических манипуляций имеет разработка эффективных методов электропорации с целью замены трудоемких методов конъюгации. Для повышения эффективности электропорации у метанотрофов, имеющих одновременно рММО и sММО, их выращивают на минеральной среде с пониженным содержанием  $\text{CuSO}_4$  (<10 мкМ), определяющей пониженный уровень ВЦМ (Ro, Rosenzweig, 2018; Nguyen et al., 2019). В недавних исследованиях эффективность электропорации была повышена посредством оптимизации нескольких ключевых параметров, таких как подготовка компетентных клеток, условия электропорации, время восстановления и концентрация антибиотика (Hu et al., 2021). Основываясь на гомологичной рекомбинации и эффективной трансформации, делеция гена и экспрессия гетерологичного гена достигнуты одновременно путем прямой электропорации линейных фрагментов ДНК, полученных с помощью ПЦР. Использование этого подхода позволило сконструировать продуцент изобутиральдегида на основе *Mm. buryatense* 5GB1 путем замены эндогенного гена *fadE*, кодирующего ацил-КоА-дегидрогеназу, участвующую в расщеплении жирных кислот, гетерологичным геном декарбоксилазы 2-кетоионолериата *kivD* (Hu et al., 2021).

Направленный мутагенез может быть достигнут не только с помощью плазмид, но и линейных ПЦР-фрагментов, содержащих “плечи” гена-мишени и кассету устойчивости к антибиотику. Это позволяет сократить время создания конструкций для генетического редактирования (Puri et al., 2015, 2016; Yan et al., 2016; Ro, Rosenzweig, 2018). В двухэтапной процедуре делетируемый из хромосомы ген сначала заменяется кассетой устойчивости к антибиотикам, которая затем удаляется с

помощью Cre рекомбиназы бактериофага P1 (Sternberg and Hamilton, 1981), выщепляющей маркерный ген, клонированный между сайтами связывания *loxP* (Marx, Lidstrom, 2002; Crombie, Murrell, 2011). Этим методом был получен мутант *Methylocella silvestris* BL2 по изоцитратлиаза, неспособный расти на  $\text{C}_1$ -соединениях. Данная методика была также успешно применена для *Methylomonas* sp. ДН-1, при этом при высеве на агаризованную среду без антибиотика для оптимальной работы Cre рекомбиназы вносили 4 мМ  $\text{NiCl}_2$  (Lee et al., 2021b).

**Система безмаркерного аллельного обмена.** Разработка протоколов контрселекции, не предполагающих повторного введения антибиотических маркеров, упрощает процесс получения множественных мутаций. Одним из эффективных методов редактирования геномов является использование гена *sacB* в качестве контрселектируемого маркера. Кодируемая геном *sacB* левансахараза превращает сахарозу в леван, приводя к лизису клеток в присутствии определенной концентрации сахарозы (Recorbet et al., 1993). Метод успешно применялся для получения безмаркерных мутаций у метилотрофов (Marx, 2008). При этом редактирование проводится в два этапа. Сначала происходит встраивание плазмиды в хромосому по одному из гомологичных плечей, а затем при селекции на сахарозе может восстановиться аллель дикого типа или выщепиться целевой ген (рис. 2б). Этим методом с использованием плазмид, несущих ген *sacB*, у *Mm. buryatense* 5GB1 были инактивированы гены синтеза гликогена (Puri et al., 2015), а у *Mm. alcaliphilum* 20Z – нокаутированы одновременно два кластера генов синтеза и распада гликогена и ген *sps*, кодирующий сахарозофосфатсинтазу (Бут и соавт., 2020). Подавление синтеза гликогена у метанотрофов имеет практическое значение, поскольку они способны накапливать гликоген до 30% сухой массы клеток в условиях лимитирования роста азотом (Khmelenina et al., 1999; Ешинимаев и соавт., 2002), снижая эффективность преобразования углерода. Интересно, что при инактивации путей синтеза сахарозы и гликогена в клетках *Mm. alcaliphilum* увеличилось относительное содержание белка, но несколько снизилась скорость роста на метане. Таким образом, была показана принципиальная возможность относительно стабильного роста метанотрофа в отсутствие синтеза запасных соединений углерода.

Маркер *SacB* применялся при получении штаммов *Mm. alcaliphilum*, способных синтезировать 2,3-бутандиол, рассматриваемый в качестве биотоплива будущего (Nguyen et al., 2018), и пуртресцин (1,4-диаминобутана), используемый в фармацевтике и агрохимии (Nguyen, Lee, 2019), а также при конструировании пути биосинтеза



**Рис. 2.** Способы генетического редактирования метанотрофов (схемы внесения модификаций в хромосому метанотрофов): а – двойная гомологичная рекомбинация с использованием суицидальной плазмиды; б – использование плазмиды с геном контрелекции *sacB* для получения безмаркерных мутаций; в – использование ПЦР-фрагментов с генами контрелекции *sacB* или *pheSAG* для получения безмаркерных мутаций.

пигмента астаксантина у *Methylomonas* sp. 16a (Ye et al., 2007) и для скрининга двойных рекомбинантов у *Ms. trichosporium* OB3b при получении сайт-направленных мутаций в sMMO (Borodina et al., 2007). С использованием этого метода была изучена функция пентациклических тритерпеноидных липидов у метанотрофов. Было установлено, что 3-метилгопаноидметилаза участвует в стабилизации ВЦМ у *Ms. capsulatus* Bath (Welander, Summons, 2012).

В качестве маркера контрелекции используется также ген *pheS*, кодирующий  $\alpha$ -субъединицу фенилаланил-тРНК-синтетазы. Введением двух точечных мутаций в ген *pheS* из *Ms. capsulatus* Bath получен вариант PheS<sup>AG</sup>, который может включать в белки *p*-хлорфенилаланин, вызывая гибель клеток. Посредством отбора с помощью *p*-хлорфенилаланина был получен безмаркерный мутант *hoxF* с гораздо большей эффективностью, чем контрелекцией на основе SacB (Ishikawa et al., 2018). Варианты *pheS* использовались в метанотрофных штаммах-хозяевах, включая *Mm. buryatense* 5GB1C, *Mm. alcaliphilum* 20Z и *Methylomonas* sp. LW13 (Liu et al., 2020, 2021). Путем объединения PheS<sup>AG</sup> и гена устойчивости к зеоцину была сконструирована позитивно-контрелективная кассета PZ (Liu et al., 2020). Стратегия, основанная на PZ и ПЦР (рис. 2б), была успешно использована при создании немаркированной делеции *glgA1* или всего оперона, кодирующего sMMO, в *Mm. buryatense* 5GB1C и *Mm. alcaliphilum* 20Z.

**Система генетического редактирования CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats).** В исследованиях последних лет высоко востребована система генетического редактирования, основанная на использовании эндонуклеазы Cas9, являющейся частью иммунной системы прокариот. Эта система позволяет с высокой специфичностью редактировать геномы как про-, так и эукариотических организмов. Эндонуклеаза Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в нить ДНК, при этом таргетирование осуществляется с помощью так называемой “single guide” РНК (gRNA), содержащей протоспейсер из 20 п.н., комплементарный целевой последовательности, прилегающей к PAM (protospacer-adjacent motif) мотиву 5'-NGG-3'. Двухцепочечный разрыв может быть восстановлен с помощью специально выбранной “заплатки”, что позволяет ввести желаемые генетические модификации (Garneau et al., 2010; Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012). К настоящему времени, однако, выполнена лишь одна работа по редактированию геномов метанотрофов с помощью системы CRISPR/Cas9 (Tapscott et al., 2019). У *Ms. capsulatus* Bath была успешно внесена точечная мутация в ген гидроксилазного компонента sMMO на плазмиде, ген *tmoX* инактивирован в хромосоме введением в открытую

рамку считывания стоп-кодона, что нарушило функцию sMMO. При этом стоит отметить низкую эффективность модификации (2%), что, вероятно, обуславливает непопулярность данного подхода в отношении метанотрофов.

**Плазмиды** – ценный генетический инструмент, который можно применять для экспрессии нескольких копий гена и быстрого тестирования генетических конструкций. Репликоны широкого круга хозяев, которые были успешно использованы у метанотрофов, включают репликон RP4/RK2, определяющий группу несовместимости P (IncP) (Ali, Murrell, 2009), а также репликоны RSF1010 (IncQ) (Lloyd et al., 1999) и pBBR1 (Welander et al., 2012). На основе этих репликонов были сконструированы плазмиды pAWP78, pAWP79 и pAWP89, примененные для экспрессии гетерологичных белков и репортерных генов в *Ms. capsulatus* Bath (Ali, Murrell, 2009), *Methylomonas* sp. 16a, DH-1 (Sharpe et al., 2007), *Ms. trichosporium* OB3b (Lloyd et al., 1999), *Mm. buryatense* 5GB1C (Puri et al., 2015) и *Mm. alcaliphilum* 20Z (Pham et al., 2022). При этом векторы pAWP79 и pAWP89 получили широкое распространение и стали универсальными для различных групп метанотрофов (табл. 1; Nguyen et al., 2019, 2020a, 2020b), а pAWP78 стал основой для создания вектора pCAN01, используемого для контролируемой экспрессии генов (Henard et al., 2016). Экспрессируемый ген в pCAN01 находится под контролем тетрациклинового репрессора/оператора. Репрессия гена снимается при добавлении ангидротетрациклина – аналога тетрациклина, не обладающего антибиотической активностью (Henard et al., 2010).

Недавно у *Methylomonas* sp. DH-1 была обнаружена цитозинметилтрансфераза, которая помогает чужеродным плазмидам обходить систему рестрикции–модификации (PM) (Ren et al., 2020), что приводит к более высокой эффективности трансформации. Цитозинметилтрансфераза распознает последовательность GGCC для метилирования. Ген, кодирующий цитозинметилтрансферазу *Methylomonas* sp. DH-1, был введен в *E. coli* JM110 с дефицитом генов метилазы *dam* и *dcm*, тем самым была создана синтетическая система PM. Кишечная палочка, экспрессирующая цитозинметилтрансферазу, метилировала чужеродные плазмиды, которые после выделения из *E. coli* JM110 показали повышенную эффективность трансформации в *Methylomonas* sp. DH-1 по сравнению с неметилированными плазмидами. С использованием этого подхода в клетках *Methylomonas* sp. DH-1, трансформированных плазмидами, несущими гены синтеза каротиноидов, продукция пигмента была увеличена на 26% (Ren et al., 2020).

В бактериальной биотехнологии для генетических манипуляций или физиологических модификаций возможно доставлять функциональные

Таблица 1. Примеры применения методов редактирования геномов для метанотрофных бактерий и достигнутые результаты

| Генетические инструменты  | Метанотроф  | Цель манипуляций   | Результат  | Ссылка                  |
|---|---|--|--|-------------------------|
| CRISPR/Cas9   | <i>Methylococcus capsulatus</i>   | Введение стоп-кодона в открытую рамку считывания гена <i>mmoX</i>  | Инактивация растворимой метанмонооксигеназы (sMMO)   | Tarpscott et al., 2019  |
| <b>Безмаркерный мутагенез</b>   |   |  |  |                         |
| <i>pheS<sup>ΔG</sup></i>  | <i>Ms. capsulatus</i> (Bath)  | Делеция гена <i>hoxF</i><br>Инактивация $La^{2+}$ -зависимой метанолдегидрогеназы <i>Hox</i>   | Создание нового метода контрселекции для <i>Ms. capsulatus</i> с использованием <i>pheS<sup>ΔG</sup></i>   | Ishikawa et al., 2018   |
|   | <i>Mm. burgatense</i> 5GB1C<br><i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z  | Делеция 10-т.п.н. <i>ymto</i> оперона, кодирующего sMMO. Выключение гена гликогенсинтазы<br>Выключение гена гликогенсинтазы  | Создание нового метода контрселекции для <i>Mm. burgatense</i> и <i>Mm. alcaliphilum</i> с использованием <i>pheS<sup>ΔG</sup></i>                                 | Liu et al., 2020        |
| <i>sacB</i>   | <i>Ms. capsulatus</i> Bath  | Делеция гена <i>hpnR</i> , кодирующего метилазу гопаиноидов  | Выяснение роли метилгопаиноидов в стабилизации мембран   | Welander, Summons, 2012 |
|   | <i>Mm. burgatense</i> 5GB1C   | Инсерция <i>PmxaF</i> -хуIE в хромосому  | Доказательство репрессии гена <i>mxaF</i> редкодземельными металлами   | Chu, Lidstrom, 2016     |
| <i>Mm. burgatense</i> 5GB1C<br><i>Methylomonas</i> sp. LW13<br><i>Methylobacter tundripaludum</i> 21/22 |   | $\Delta$ glgA1, $\Delta$ mmoD, $\Delta$ sMMO<br>Делеция генов гликогенсинтазы ( <i>glgA1</i> ), регулятора экспрессии rMMO ( <i>mmoD</i> ) и локуса, кодирующего гена rMMO (~10 т.п.н.)  | Разработка протоколов метаболической инженерии метанотрофов типа I на основе электропорации, контрселекции <i>sacB</i> или сайт-специфической рекомбинации FLP-FRT | Yan et al., 2016        |
|   | <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z   | $\Delta$ spsAglg<br>Делеция кластера генов синтеза и распада гликогена и сахаразы  | Получение штамма, не синтезирующего гликоген и сахарозу  | Бут с соавт., 2020      |
| <i>Mm. burgatense</i> 5GB1C<br><i>Methylomonas</i> sp. LW13<br><i>Methylobacter tundripaludum</i> 21/22 |   | $\Delta$ ldh $\Delta$ ack $\Delta$ spreE1::argDJ<br>Выключение генов <i>ldh</i> лактатдегидрогеназы и ацетаткиназы <i>ack</i> , замена гена спермидинсинтазы <i>spe</i> на ацетилорнитин-аминотрансферазу <i>argD</i> и орнитинацилтрансферазу <i>argJ</i> | Создание штамма, способного к синтезу путресцина   | Nguyen, Lee, 2019       |
|   | <i>Mm. burgatense</i> 5GB1C<br><i>Methylomonas</i> sp. LW13<br><i>Methylobacter tundripaludum</i> 21/22 | $\Delta$ ldh $\Delta$ mdh $\Delta$ ack<br>Тройной мутант по генам лактатдегидрогеназы, ацетаткиназы и малатдегидрогеназы   | Повышение уровня биосинтеза 2,3-бутандиола   | Nguyen et al., 2018     |

Таблица 1. Продолжение

| Генетические инструменты     | Метанотроф                                   | Цель манипуляций   | Результат   | Ссылка              |
|------------------------------|--|--|---|---------------------|
| Flp-рекомбиназа              | <i>Mm. buryatense</i> 5GB1C                  | Делеция генов <i>хохF</i> , <i>тхаF</i> , <i>тхаI</i> с помощью ПЦР-фрагмента с зондиновой кассетой с последующим выщеплением последней с помощью Flp-рекомбиназы  | Показана преобладающая функция $La^{3+}$ -зависимой ХохF-МДГ по сравнению с $Ca^{2+}$ -зависимой МхаF-МДГ у <i>Mm. buryatense</i> | Chu, Lidstrom, 2016 |
|                              |  | $\Delta mxaY$  | Установлена функция гистидкиназы MxaY в качестве регулятора транскрипции генов метанодегидрогеназы MxaFI                          | Chu et al., 2016    |
| <b>Маркерные модификации</b> |  |  |   |                     |
| pCM184 (Km)                  | <i>Methylothermus</i> sp. ДН-1               | Делеция гена сукцинатадегидрогеназы <i>sdh</i>   | Получение штамма, синтезирующего сукцинат   | Nguyen et al., 2019 |
| pCM184 (Gm)                  | <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z                  | $\Delta rhd::Gm^R$ . Делеция пируватдегидрогеназы  | Получение штамма, синтезирующего лактат   | Henard et al., 2016 |
|                              | <i>Ms. capsulatus</i> Bath                   | $\Delta ruc$ , $\Delta sga$ , $\Delta gcv$<br>Делеция пируваткарбоксылазы, серингли-оксилатаминотрансферазы, фермента расщепления глицина  | Новые знания о роли цикла Кальвина в метаболизме метанотрофов X типа  | Henard et al., 2021 |
| pAWP89                       | <i>Methylothermus</i> sp. DS( $\Delta sdh$ ) | Внесение генов глиоксилатного шунта из <i>E. coli</i> MG1655 под контролем P <sub>mxaF</sub> промотора   | Увеличение продукции сукцината из метана  | Nguyen et al., 2019 |
|                              | <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z                  | P <sub>tet</sub> :: <i>asbF-aroY-catA</i><br>внесение на плазмиде дегидрошикиматдегидратазы ( <i>asbF</i> ) из <i>Bacillus thuringensis</i> , протокатазуатдекарбоксылазу ( <i>aroY</i> ) из <i>Enterobacter cloacae</i> и катехолиоксигеназы ( <i>catA</i> ) из <i>Acinetobacter baylyi</i> | Получение штамма, синтезирующего муконовую кислоту  | Henard et al., 2019 |
|                              |  | P <sub>tac</sub> :: <i>glpFKDgspA</i><br>Экспрессия НАД-зависимой глицеролдегидрогеназы ( <i>glpA</i> ), дигидроксиацетонкиназы ( <i>glpK</i> ), транспортера глицерина ( <i>glpF</i> ) из <i>E. coli</i> и гомологичной глицерол-3-фосфатдегидрогеназы ( <i>gpsA</i> )                      | Получение штамма, растущего на глицерине  | Le et al., 2021     |

Таблица 1. Продолжение

| Генетические инструменты | Метанотроф                      | Цель манипуляций  | Результат                  | Ссылка               |
|--------------------------|---------------------------------|---|----------------------------|----------------------|
| pAWP89                   | <i>Mt. alcaliphilum</i> 20Z     | Внесение единым опероном генов триптофаназы ( <i>tna</i> ) из <i>E. coli</i> и флавиносодержащей монооксигеназы ( <i>fmo</i> ) из <i>Methylobacillus aminisulfidivorans</i> , <i>AroG</i> <sup>fbt(D146N)</sup> и <i>TrpE</i> <sup>fbt(S40F)</sup> из <i>E. coli</i>                              | Синтез красителя индиго    | Pham et al., 2022    |
|                          |                                 | Внесение единым опероном генов <i>afs</i> , <i>ispA</i> и оптимизированного <i>pDXP</i> пути ( <i>pIB-DSAG-dxr</i> )  | Синтез $\alpha$ -фарнезина |                      |
|                          | <i>Mt. alcaliphilum</i> 20Z XYL | <i>P<sub>tac</sub>::zss1-ispA-dxs-ispG-zwf-pgd</i>  | Синтез $\alpha$ -гумулена  | Nguyen et al., 2020b |
|                          |                                 | Внесение на плазмиде гумуленсинтазы ( <i>zss1</i> ), фарнезилпирофосфатасинтазы ( <i>ispA</i> ), 1-дезоксисилулозо-5-фосфатасинтазы ( <i>dxs</i> ), гидроксиметилбутенилдифосфатасинтазы ( <i>ispG</i> ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ( <i>zwf</i> ), фосфоглюконатдегидрогеназы ( <i>pgd</i> ) |                            |                      |
|                          | <i>Mt. alcaliphilum</i> 20Z XYL | Внесение на плазмиде кластера <i>bvdABC</i> из <i>Klebsiella pneumoniae</i> , кодирующего ацетолактадекарбокксилазу, ацетолактагсиназу и ацетоинредуктазу, под контролем <i>P<sub>tac</sub></i> промотора в штамм метанотрофа, растущий на ксилозе  | Синтез 2,3-бутандиола      | Nguyen et al., 2021  |
|                          |                                 | Внесение на плазмиде 2-диметил-4-деоксигалузолсинтазы, O-метилтрансферазы, АТФ-лигазы, аланин-аланин лигазы и транскетаолы из <i>Nostoc punctiforme</i> под контролем <i>P<sub>tac</sub></i> промотора в штамм метанотрофа, растущий на ксилозе   | Синтез шинорина            |                      |



Таблица 1. Продолжение

| Генетические инструменты | Метанотроф  | Цель манипуляций  | Результат                                       | Ссылка                  |
|--------------------------|---|---|---|-------------------------|
| pAWP89                   | <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z XYU   | Ptac::phdphaABtesB<br>Внесение на плазмиде генов тиолазы ( <i>phaA</i> ), ацетоацетил КоА редуктазы ( <i>phaB</i> ) из <i>Ralstonia eutropha</i> H16, тиоэстеразы ( <i>tesB</i> ) из <i>E. coli</i> и нативной пируватдегидрогеназы <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z под контролем P <sub>tas</sub> промотора в штамм, растущий на ксилозе | Синтез 3-гидроксибутирата                       | Nguyen et al., 2021     |
|                          | <i>Mm. alcaliphilum</i> 20ZE4A ( $\Delta$ ldh $\Delta$ ack $\Delta$ speE1::argDJ) | Внесение на плазмиде pAWP89 под контролем P <sub>tas</sub> промотора гена орнитиндекарбоксилазы <i>speF</i> из <i>Ms. trichosporium</i> OB3b  | Усиление синтеза путресцина                     | Nguyen, Lee, 2019       |
|                          | <i>Mm. alcaliphilum</i> 20ZM3 ( $\Delta$ ldh $\Delta$ mdh $\Delta$ ack)           | Внесение на плазмиде гена <i>budA</i> из <i>Klebsiella pneumoniae</i> и <i>budB</i> из <i>Bacillus subtilis</i> под контролем P <sub>tas</sub> промотора  | Синтез 2,3-бутандиола                           | Nguyen et al., 2018     |
|                          | <i>Ms. trichosporium</i> OB3b   | P <sub>tas</sub> ::mcs-mms-перс<br>Внесение на плазмиде малонил-КоА редуктазы ( <i>mcr</i> ) из <i>Chloroflexus aurantiacus</i> , метил-малонил-КоА карбоксилтрансферазы ( <i>mms</i> ) из <i>Propionibacterium freudenreichii</i> и гомологичной ФЕП карбоксилазы ( <i>perc</i> )  | Синтез 3-гидроксипропионовой кислоты            | Nguyen et al., 2020a    |
| pCAN01                   | <i>Mm. buryatense</i> 5GB1C   | Внесение гена лактатдегидрогеназы ( <i>ldh</i> ) из <i>Lactobacillus helveticus</i> под контролем тетрациклинового промотора  | Индукцируемый синтез лактата                    | Henard, Guarnieri, 2016 |
| pAWP87                   | <i>M. buryatense</i> 5GB1C  | P <sub>mxaF</sub> ::synthetic RBS::atoB-hbd-сгt-ydiI<br>Внесение на плазмиде генов тиолазы ( <i>atoB</i> ), 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы ( <i>hdb</i> ), тиоэстеразы ( <i>ydiI</i> ) из <i>E. coli</i> , еноил-КоА гидратаза из <i>Clostridium acetobutylicum</i>   | Синтез кротоновой кислоты                       | Garg et al., 2018       |
| pK18mobSacB              | <i>Ms. trichosporium</i> OB3b   | p <sub>mxaF</sub> ::Gm <sup>r</sup>   | Изучение регуляции экспрессии Хох-МДГ и Мха-МДГ | Haque et al., 2016      |

Таблица 1. Окончание

| Генетические инструменты | Метанотроф                     | Цель манипуляций   | Результат  | Ссылка              |
|--------------------------|--------------------------------|--|--|---------------------|
| ПРЦ-фрагмент             | <i>Mm. burgatense</i> 5GB1C    | <p><math>\Delta</math>glgA1::Km<sup>R</sup>, <math>\Delta</math>mmoD::Km<sup>R</sup>, <math>\Delta</math>sMMO::Km<sup>R</sup></p> <p>Замена генов гликогенсинтазы (<i>glgA1</i>), регулятора экспрессии sMMO (<i>mmoD</i>) или локуса, кодирующего ген рММО (~10 т.п.н.) на кананициновую кассету</p> <p><math>\Delta</math>sga, <math>\Delta</math>fumA, <math>\Delta</math>fumC, <math>\Delta</math>lprD, <math>\Delta</math>lactC, <math>\Delta</math>koq, <math>\Delta</math>lprD<math>\Delta</math>lactC</p> <p>Делеция серин-глиоксилатаминотрансферазы (<i>sga</i>), фумараз (<i>fumA</i>, <i>fumC</i>), 2-альфа-кетоглутаратдегидрогеназы (<i>lprD</i>), альфа-кетоглутаратдекарбоксилазы (<i>akdc</i>), альфа-кетоглутаратферридоксиноксидоредуктазы (<i>kor</i>)</p> | Создание метода контрселекции                                  | Yan et al., 2016    |
|                          |                                |  | Изучение функции генов   | Fu et al., 2017     |
|                          | <i>Methylothermus</i> sp. LW13 | <p><math>\Delta</math>хоxF::Km<sup>R</sup>, <math>\Delta</math>хоxG::Km<sup>R</sup>, <math>\Delta</math>мхaF::Km<sup>R</sup>, <math>\Delta</math>хоxG::Km<sup>R</sup></p> <p>Делеция структурных генов метанолдегидрогеназ ХоxF и МхaF и цитохрома ХоxG(4)</p>   | Выявление функции цитохрома ХоxG(4) в метаболизме метанотропоф | Zheng et al., 2018  |
| pCM351-glgA (Gm)         | <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z    | <p>Ptac::xylAVpre</p> <p>Ведение генов утилизации ксилозы в <i>glgA</i> локус хромосомы: ксилоизомеразы (<i>xyIA</i>) и ксилозокиназы (<i>xyIB</i>), а также рибулозо-фосфат-3-эпимеразы из <i>E. coli</i> (<i>rpe</i>) под контролем P<sub>tac</sub> промотора</p>  | Получение штамма метанотропофа, растущего на ксилозе           | Nguyen et al., 2021 |
|                          | <i>Mm. alcaliphilum</i> 20Z    | Замена <i>glgA1</i> кластером <i>bioAABC</i> из <i>Klebsiella pneumoniae</i> под контролем P <sub>tac</sub> промотора в штамм, растущий на глищине за счет экспрессии кластера P <sub>tac</sub> ::glpFKDgsrA   | Синтез 2,3-бутандиола  | Le et al., 2021     |

белки в клетки с использованием пептидов в качестве переносчиков. Библиотеку проникающих в клетку пептидов и метод доставки белков, конъюгированных с пептидами, тестировали, вырезая маркерный ген в *Methylobionas* sp. DH-1 (Lie et al., 2021). Предложенная библиотека проверена на отсутствие значительной цитотоксичности проникающих пептидов в отношении *E. coli*.

**Элиминация нативной плазмиды у *Mm. buryatense* 5GB1.** Системы экспрессии генов на основе плазмид позволяют быстро тестировать несколько генетических конструкций. Ранее для манипулирования штаммами метанотрофных метилотрофов была разработана система с использованием плазмиды широкого круга хозяев pCM66 на основе IncP размером 7.6 т.п.н. (Marx, Lidstrom, 2001). Однако исходный штамм *Mm. buryatense* 5GB1 содержит плазмиду размером 80 т.п.н., несущую функции стабильности и поддержания, которые приводят к несовместимости между плазмидами. Элиминация нативной плазмиды была проведена путем введения IncP-плазмиды pVK100 и последующим избавлением от нее с помощью пересевов без антибиотика (Puru et al., 2015). Как результат, получены штаммы *Mm. buryatense* 5GB1S и 5GB1C, которые способны конъюгировать с малыми векторами и поддаются современным методам клонирования.

**Библиотеки промоторов для экспрессии генов метанотрофов и репортерные гены.** В метаболической инженерии сверхэкспрессия генов может не привести к увеличению выхода продукции, поскольку клеточные ресурсы расходуются чрезмерно на синтез белка, что приводит к снижению ростовых параметров. Кроме того, неоптимизированная экспрессия генов может способствовать накоплению токсичных промежуточных метаболитов, что снизит выход продукции. Для тонкой настройки уровней экспрессии генов используются промоторы различной силы.

Для поиска подходящих промоторов, обеспечивающих конститутивную или регулируемую экспрессию целевых генов, используются репортерные белки. Применение канонических флуоресцирующих белков (таких как GFP, dTomato) считалось неэффективным способом оценки силы промоторов у метанотрофов вследствие наличия у них обширной сети ВЦМ и/или S-слоев на поверхности клеток. Трудоемкость оценки флуоресценции в клеточных экстрактах сводит на нет преимущество в использовании репортерных генов (Ali, Murrell, 2009; Puru et al., 2015). Для определения силы промоторов у *Methylobionas* sp. DH-1 тандем промотор-*gfp* был интегрирован в некодирующую область генома, а флуоресценцию тестировали методом проточной цитометрии (Lee et al., 2021a). У *Mm. buryatense* 5GB1S эндогенные промоторы, управляющие экспрессией гена метанолдегидро-

геназы *mxaF* и сигма-факторов *rpoD*, были протестированы с помощью красного флуоресцентного белка dTomato в качестве репортера (Shaner et al., 2004). Обнаружено, что промотор гена *mxaF* неактивен в *E. coli*, хотя это был самый сильный из протестированных промоторов в *Mm. buryatense*. Наряду с генами флуоресцирующих белков, с этой целью применяются гены катехол-2,3-диоксигеназы *xylE* и  $\beta$ -галактозидазы *lacZ* (Ali, Murrell, 2009). Силу промоторов ключевых генов у *Mm. alcaliphilum* 20Z тестировали в штамме метанотрофа, дефектном по глюкокиназе (Мустахимов и соавт., 2016). Ген, кодирующий глюкокиназу, вносили на плазмиде под контролем тестируемых промоторов, индикатором уровня экспрессии с промотора служила активность глюкокиназы в бесклеточных экстрактах. Это исследование подтвердило высокую активность промотора гена метанолдегидрогеназы *mxaF* в метанотрофных бактериях.

Оценка уровней экспрессии генов у *Mm. buryatense* 5GB1 недавно была проведена с помощью наборов данных RNA-seq (Wilson, 2021). Штамм культивировали в различных условиях и анализировали данные секвенирования РНК. Была идентифицирована группа генов с высокой экспрессией и выявлены соответствующие промоторные области-кандидаты. Проверку предполагаемых промоторов проводили с использованием репортера XylE.

Другой подход применяли при выборе оптимальных промоторов для производства кадаверина в *Methylobionas* sp. DH-1 (Lee et al., 2021). Были проанализированы участки 100 п.н. выше сайта начала транскрипции всех генов, кроме гипотетических белков. Параллельно у *Methylobionas* sp. DH-1 идентифицировали высоко экспрессируемые белки с помощью 2D-гель-электрофореза и MALDI-TOF. В результате была получена библиотека из 38 промоторов и проверена с использованием *gfp*. Основываясь на полученных данных, была проведена гетерологичная экспрессия генов *cadA* и *cadB* в *Methylobionas* sp. DH-1. Титр кадаверина достиг наивысшего значения 18.12 мг/л в штамме, экспрессирующем гены *cadA* и *cadB* под промотором, соответственно, рибосомного белка RpmB (L28) и белка-инициатора репликации DnaA.

**Модификация метаболизма с целью получения целевого продукта.** Внесением на плазмиде pCAN01 гена лактатдегидрогеназы из *Lactobacillus helveticus* в клетки *Mm. buryatense* был получен штамм, который выделял в среду лактат в концентрации 800 мг/л (Henard et al., 2016). Существенный вклад в выход целевого продукта вносит также настройка трансляции генов, т.е. подбор наилучших рибосом-связывающих последовательностей (RBS). Следует отметить, что

использование определенного RBS может быть удачным в одном окружении (т.е. с определенным протомотором и геном) и неэффективным в другом. Оптимальный дизайн RBS разрабатывали с помощью программы RBS калькулятор 2.0 (Salis et al., 2009; Espah Borujeni et al., 2014), что позволило значительно увеличить выход лактата у *Mm. buryatense* 5GB1C (Garg et al., 2018), а также шинорина у *Mm. alcaliphilum* 20Z (Nguyen et al., 2021). Примечательно, что выход шинорина при использовании сконструированного метанотрофного биокатализатора был сопоставим с таковыми у промышленных продуцентов.

Протестирована способность *Mm. buryatense* синтезировать кротоновую кислоту (выход 50 мг/л) путем внесения генов обратного пути  $\beta$ -окисления из *E. coli* MG1655 с помощью плазмидного вектора (Garg et al., 2018). Для успешного результата при модификации метанотрофов часто используют кодон-оптимизированные гены (Pham et al., 2022b). Для модификации *Mm. alcaliphilum* с целью получения путресцина, в штамм с делецией генов лактатдегидрогеназы, ацетаткиназы и спермидинсинтазы на плазмиде pAWP89 под *tac* промотором были внесены кодон-оптимизированные гены ацетилорнитинаминотрансферазы *argD* и орнитинацилтрансферазы *argJ* из *Ms. trichosporium* OB3b, а также ген орнитиндекарбоксилазы *speC*. В результате удалось достичь концентрации путресцина 98.08 мг/л (Nguyen et al., 2019). Благодаря использованию кодон-оптимизированных генов триптофаназы *tna* из *E. coli* и флавинодержающей монооксигеназы *fmo* из *Methylophaga aminisulfidivorans*, на основе *Mm. alcaliphilum* был получен продуцент пигмента индиго (3.9 мкг/л). После внесения генов ксилосоизомеразы (*xylA*) и ксилулокиназы (*xylB*) из *E. coli* стал возможен миксотрофный рост *Mm. alcaliphilum* в среде с добавлением 2 г/л ксилозы, что увеличило выход красителя до 6.3 мкг/л (Pham et al., 2022b).

Среди нейтрофильных негалофильных метанотрофов наиболее податливыми к модификациям оказались представители рода *Methylomonas*. Так, замена гена сукцинатдегидрогеназы (*sdh*) у *Methylomonas* sp. DH-1 на канамициновую кассету привела к накоплению в среде сукцината, а введение на плазмиде pAWP89 генов гликоксилатного шунта позволило увеличить выход сукцината до 134 мг/л (Nguyen et al., 2019). Попытки перенаправить поток углерода посредством выключения генов ацетаткиназы (*ack*) и фосфоацетилтрансферазы (*pta*) или пируват-форматлиазы (*pfl*) не привели к увеличению выхода сукцината.

**Метаболическое моделирование.** Еще одним современным подходом, активно используемым в исследованиях молекулярных основ метано- и метилотрофии, является метаболическое моделирование. Моделирование метаболических пу-

тей позволяет прогнозировать направление потока углерода при генетической модификации, конструировать новые пути, ведущие к синтезу нужного продукта, а также предсказывать влияние окружающей среды или генетических манипуляций на поведение системы. На сегодняшний день метаболические модели разработаны для *Mm. buryatense* 5GB1 (de la Torre et al., 2015), *Ms. capsulatus* Bath (Lieven et al., 2018), *Mm. alcaliphilum* 20Z (Akberdin et al., 2018) и *Ms. trichosporium* OB3b (Naizabekov, Lee, 2020). Интересно, что модели для *Methylotheobacterium* и *Methylococcus* предполагают значительные различия в механизмах переноса электронов. Метаболическое моделирование необходимо для прогнозирования фенотипов *in silico*, что может определять стратегии биоинженерии.

**Совместное выращивание на метане и полиуглеродных субстратах.** Большинство метанотрофов не могут использовать полиуглеродные субстраты и имеют относительно низкую скорость роста на метане ввиду низкой растворимости  $\text{CH}_4$ . Кроме того, для монооксигенирования инертной молекулы метана нужны восстановительные эквиваленты. Использование полиуглеродного соединения в качестве ко-субстрата представляется многообещающей стратегией при производстве целевых продуктов. Первая попытка демонстрации способности гаммапротеобактериального метанотрофа к использованию для роста сахаров была осуществлена введением в *Mm. alcaliphilum* 20Z ксилосоизомеразы (*xylA*) и ксилулокиназы (*xylB*) из *E. coli* наряду со сверхэкспрессией собственной рибулозофосфат-3-эпимеразы (*rpe*) (Nguyen et al., 2021). Сконструированный штамм мог расти на ксилозе как на единственном источнике углерода, но с довольно продолжительной лаг-фазой. Скорость роста модифицированного штамма на метане с ксилозой была в 1.5 раза выше по сравнению со скоростью роста только на метане, а продукция шинорина (производное седогептулозо-7-фосфата) возросла в 2.3 раза. Кроме того, синтез 2,3-бутандиола, ацетоина и 3-гидроксимасляной кислоты значительно усиливался при росте в среде, содержащей метан и ксилозу.

В *Mm. alcaliphilum* 20Z были введены гены, ответственные за утилизацию глицерина, включая транспортер глицерина (*glpF*), глицеролкиназу (*glpK*) и эндогенную глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (*gpsA*) (Lee et al., 2021). Сконструированный штамм рос на глицерине при низкой концентрации 0.1%, но эта способность была улучшена адаптивной эволюцией. Глицерин, как дополнительный к метану источник углерода, в 2 раза увеличивал скорость роста и в 3.9 раза продукцию 2,3-бутандиола. Поскольку метаболизм глицерина обеспечивает синтез дополнительного НАДН, метанотроф при миксотрофном росте может конвертировать метан в метанол без добавления фор-

миата в качестве донора электронов. Биокатализатор для превращения метана в метанол, работающий без ингибиторов метанолдегидрогеназы (хлорида аммония, этилендиаминтетраацетатного или фосфатного буфера) можно создать на основе мутанта с дефицитом метанолдегидрогеназы (Hur et al., 2017; Patel et al., 2020). Новая концепция одностадийной биоконверсии метана в метанол в метанотрофных бактериях с использованием глицерина в качестве восстановительной силы может быть расширена для превращения других алканов в соответствующие им первичные спирты.

#### Применение метанотрофов в агротехнологиях.

Одним из примеров в этой области исследований является сконструированный штамм *Methylomonas* sp. LW13, способный разлагать широко используемый гербицид бенсульфурон-метил (БСМ) (Liu et al., 2021). Для этого в *Methylomonas* sp. LW13 была экспрессирована гидролаза SulE из *Hansschlegelia zihuaiae* S113 под промотором P<sub>tac</sub> с помощью стратегии безмаркерного гена на основе p-CI-Phe. Фермент дезэтерифицирует БСМ до бенсульфурановой кислоты и метанола. Сконструированный штамм полностью конвертировал 40 мг/л БСМ в бенсульфурановую кислоту через 96 ч.

Метанотрофы в природе не синтезируют фитогормоны. Тем не менее, связь между растениями и метанотрофами подтверждена многочисленными наблюдениями (Hanson, Hanson, 1996; Bosse, Frenzel, 1997; Davamani et al., 2020). В частности, интродукция метанотрофных бактерий была успешно использована для снижения выбросов метана в атмосферу из затопляемых рисовых чеков (Davamani et al., 2020). Задача создания метанотрофных бактерий, обладающих способностью синтезировать фитогормоны для стимуляции роста растений и для снижения эмиссии метана, была реализована на примере *Mm. alcaliphilum* 20Z (Pham et al., 2022c). L-триптофан, незаменимая для живых организмов аминокислота, синтезируется из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата — центральных интермедиатов гликолиза — доминирующего пути распада фосфосахаров у метанотрофов с РМФ циклом ассимиляции углерода. Триптофан также является предшественником ауксина (индолил-3-уксусной кислоты, ИУК). Гетерологичной экспрессией в *Mm. alcaliphilum* 20Z ферментов синтеза триптофана из *E. coli*, устойчивых к ингибированию по принципу обратной связи, получен штамм-продуцент триптофана. Дополнительным введением генов, кодирующих ферменты синтеза ИУК, сконструирован рекомбинантный штамм, синтезирующий ауксин и способный стимулировать прорастание семян, длину побегов и длину корней пшеницы на ранней стадии роста в засоленных щелочных условиях (Pham et al., 2022b). Таким образом,

предложен подход для создания метанотрофов, способных повысить продуктивность и рост растений и одновременно сократить выбросы метана, образующегося в результате сельскохозяйственной деятельности.

## ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Последнее десятилетие продемонстрировало быстрое развитие генетических инструментов и их адаптацию для применения в работе с метанотрофными бактериями. Секвенирование геномов, многочисленные примеры успешной геномной инженерии в сочетании с быстро растущим пониманием фундаментального метаболизма метанотрофов дают надежду на реализацию, по крайней мере, ряда рациональных стратегий направленной модификации этих уникальных бактерий. Это относительно новая область исследований для метанотрофных бактерий; все еще существует потребность в более глубоких исследованиях, нацеленных на устранение таких ограничений, как низкий поток углерода к целевым продуктам, эффективность окисления метана и уровни экспрессии ключевых ферментов. В данном обзоре не были представлены примеры работ по синтетической биологии — преобразование метана неметанотрофными микроорганизмами, что также может внести значительный вклад в повышение эффективности производства и выхода целевых продуктов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Обзор подготовлен в рамках выполнения проекта “Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий” № 075-15-2021-1071, финансируемого Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит сведений о результатах исследований с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бут С.Ю., Дедыш С.Н., Попов В.О., Пименов Н.В., Хмеленина В.Н. Конструирование метанотрофа I типа с пониженной способностью аккумулировать гликоген и сахарозу // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. С. 465–471.

- But S.Yu., Dedysh S.N., Popov V.O., Pimenov N.V., Khmelena V.N. Construction of a Type-I methanotroph with reduced capacity for glycogen and sucrose accumulation // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. P. 538–543.
- Бут С.Ю., Егорова С.В., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Биохимические свойства и филогения гидроксипироватредуктаз метанотрофных бактерий, реализующих различные пути C1 ассимиляции // Биохимия. 2017. Т. 82. С. 1647–1656.
- But S.Y., Egorova S.V., Khmelena V.N., Trotsenko Y.A. Biochemical properties and phylogeny of hydroxypyruvate reductases from methanotrophic bacteria with different C1-assimilation pathways // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 1295–1303.
- Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500 с.
- Григорян А.Н., Горская Л. Использование природного газа для микробиологического синтеза. М.: ОНТИ Микробиопром, 1970. 90 с.
- Егоров И., Купина Л., Аксюк И., Муртазаева Р. Гаприн – источник белка // Птицеводство. 1990. Т. 8. С. 25–27.
- Ешинимавев Б.И., Хмеленина В.Н., Сахаровский В.Г., Сузина Н.Е., Троценко Ю.А. Физиолого-биохимические и цитологические особенности галоалкалолентантного метанотрофа при росте на метаноле // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 690–700.
- Eshinimaev B.T., Khmelena V.N., Sakharovskii V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A. Physiological, biochemical, and cytological characteristics of a haloalkaliphilic methanotroph grown on methanol // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 512–518.
- Лалов В.В. Анализ и синтез энерготехнологических систем производства кормового белка из природного газа. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Москва, 1991.
- Мустахимов И.И., Бут С.Ю., Решетников А.С., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Использование гомо- и гетерологичных репортерных белков для оценки активности промоторов у *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. С. 279–286.
- Mustakhimov I.I., But S.Y., Reshetnikov A.S., Khmelena V.N., Trotsenko Y.A. Homo- and heterologous reporter proteins for evaluation of promoter activity in *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. P. 279–286.
- Akberdin I.R., Thompson M., Hamilton R., Desai N., Alexander D., Henard C.A., Guarnieri M.T., Kalyuzhnaya M.G. Methane utilization in *Methylomicrobium alcaliphilum* 20ZR: a systems approach // Sci. Rep. 2018. V. 8. Art. 2512.
- Ali H., Murrell J.C. Development and validation of promoter-probe vectors for the study of methane monooxygenase gene expression in *Methylococcus capsulatus* Bath // Microbiology (SGM. Reading, Engl.). 2009. V. 155. P. 761–771.
- Bordel S., Crombie A.T., Muñoz R., Murrell J.C. Genome Scale Metabolic Model of the versatile methanotroph *Methylocella silvestris* // Microb. Cell Fact. 2020. V. 19. P. 144.
- Borodina E., Nichol T., Dumont M.G., Smith T.J., Murrell J.C. Mutagenesis of the “leucine gate” to explore the basis of catalytic versatility in soluble methane monooxygenase // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 6460–6467.
- Bosse U., Frenzel P. Activity and distribution of methane-oxidizing bacteria in flooded rice soil microcosms and in rice plants (*Oryza sativa*) // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 1199–1207.
- Bothe H., Moller Jensen K., Mergel A., Larsen J., Jorgensen C., Bothe H., Jorgensen L. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 33–39.
- But S.Y., Egorova S.V., Khmelena V.N., Mustakhimov I.I. Malyl-CoA lyase provides glycine/glyoxylate synthesis in type I methanotrophs // FEMS Microbiol. Lett. 2020. V. 367. fnaa207.
- Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
- Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Aerobic methylotrophic prokaryotes // The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry. 2013. P. 267–285.
- Chu F., Beck D.C., Lidstrom M.E. MxaY regulates the lanthanide-mediated methanol dehydrogenase switch in *Methylomicrobium buryatense* // PeerJ. 2016. V. 4. Art. e2435.
- Chu F., Lidstrom M.E. XoxF acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense* // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 1317–1325.
- Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved // Environ. Microbiol. Rep. 2009. V. 1. P. 285–292.
- Crombie A., Murrell J.C. Development of a system for genetic manipulation of the facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2 // Methods Enzymol. 2011. V. 495. P. 119–133.
- Csaki R., Bodrossy L., Klem J., Murrell J.C., Kovacs K.L. Genes involved in the copper-dependent regulation of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath): cloning, sequencing and mutational analysis // Microbiology (SGM). 2003. V. 149. P. 1785–1795.
- Davamani V., Parameswari E., Arulmani S. Mitigation of methane gas emissions in flooded paddy soil through the utilization of methanotrophs // Sci. Total Environ. 2020. V. 726. Art. 138570.
- De la Torre A., Metivier A., Chu F., Laurens L.M., Beck D.A., Pienkos P.T., Lidsrom M.E., Kalyuzhnaya M.G. Genome-scale metabolic reconstructions and theoretical investigation of methane conversion in *Methylomicrobium buryatense* strain 5G(B1) // Microb. Cell Factories. 2015. V. 14. P. 188.
- Dedysh S.N., Dunfield P.F. Facultative methane oxidizers // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. Timmis K.N. Berlin: Springer-Verlag, 2010. P. 1967–1976.
- Dedysh S.N., Knief C. Diversity and phylogeny of described aerobic methanotrophs // Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability. 2018. P. 17–42.
- Dunfield P.F., Dedysh S.N. *Methylocella*: a gourmand among methanotrophs // Trends Microbiol. 2014. V. 22. P. 368–369.
- Eccleston M., Kelly D.P. Assimilation and toxicity of some exogenous C1 compounds, alcohols, sugars and acetate in the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 75. P. 211–221.
- Espah Borujeni A., Channarasappa A.S., Salis H.M. Translation rate is controlled by coupled trade-offs between site accessibility, selective RNA unfolding and sliding at up-

- stream standby sites // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 2646–2659.
- Fu Y., He L., Reeve J., Beck D.A.C., Lidstrom M.E. Core metabolism shifts during growth on methanol versus methane in the methanotroph *Methylobacterium buryatense* 5GB1 // *MBio.* 2019. V. 10. P. e00406–19.
- Fu Y., Li Y., Lidstrom M. The oxidative TCA cycle operates during methanotrophic growth of the Type I methanotroph *Methylobacterium buryatense* 5GB1 // *Metab. Eng.* 2017. V. 42. P. 43–51.
- Garg S., Wu H., Clomburg J.M., Bennett G.N. Bioconversion of methane to C-4 carboxylic acids using carbon flux through acetyl-CoA in engineered *Methylobacterium buryatense* 5GB1C // *Metab. Eng.* 2018. P. 48. P. 175–183.
- Garneau J.E., Dupuis M.-È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // *Nature* 2010. V. 468. P. 67–71.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. E2579–E2586.
- Haque M.F.U., Gu W., DiSpirito A.A., Semrau J.D. Marker exchange mutagenesis of *mxhA*, encoding the large subunit of the Mxa methanol dehydrogenase, in *Methylobacterium trichosporium* OB3b // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. V. 82. P. 1549–1555.
- Hamer G., Harrison D.E.F. Single cell protein: the technology, economics and future potential // *Hydrocarbons in Biotechnology* / Eds. Harrison D.E.F., Higgins I.J., London W.R. London: Heyden Institute of Petroleum, 1980. P. 59–73.
- Hanson R.S., Hanson T.E. Methanotrophic bacteria // *Microbiol. Rev.* 1996. V. 60. P. 439–471.
- Harwood J.H., Williams E., Bainbridge B.W. Mutation of the methane oxidizing bacterium *Methylobacterium capsulatus* // *J. Appl. Bacteriol.* 1972. V. 35. P. 99–108.
- Henard C.A., Franklin T.G., Youhenna B., But S., Alexander D., Kalyuzhnaya M.G., Guarneri M.T. Biogas biocatalysis: methanotrophic bacterial cultivation, metabolite profiling, and bioconversion to lactic acid // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 2610.
- Henard C.A., Smith H., Dowe N., Kalyuzhnaya M.G., Pienkos P.T., Guarneri M.T. Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 21585.
- Henard C.A., Wu C., Xiong W., Henard J.M., Davidheiser-Kroll B., Orata F.D., Guarneri M.T. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) is essential for growth of the methanotroph *Methylobacterium capsulatus* strain Bath // *Appl. Environ. Microbiol.* 2021. V. 87. P. e00881–21.
- Henard C.A., Bourret T.J., Song M., Vázquez-Torres A. Control of redox balance by the stringent response regulatory protein promotes antioxidant defenses of *Salmonella* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 36785–36793.
- Henard C.A., Akberdin I.R., Kalyuzhnaya M.G., Guarneri M.T. Muonic acid production from methane using rationally-engineered methanotrophic biocatalysts // *Green Chem.* 2019. V. 21. P. 6731–6737.
- Hu L., Guo S., Yan X., Zhang T., Xiang J., Fei Q. Exploration of an efficient electroporation system for heterologous gene expression in the genome of methanotroph // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 717033.
- Ishikawa M., Yokoe S., Kato S., Hori K. Efficient counterselection for *Methylobacterium capsulatus* (Bath) by using a mutated *pheS* gene // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. P. e01875–18.
- Jiang D., Kim C.S., Hanson R.S., Wood T.K. Optimization of trichloroethylene degradation using soluble methane monooxygenase of *Methylobacterium trichosporium* OB3b expressed in recombinant bacteria // *Biotechnol. Bioeng.* 1996. V. 51. P. 349–359.
- Jiang H., Chen Y., Jiang P., Zhang C., Smith T.J., Murrell J.C., Xing X.H. Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering // *Biochem. Eng. J.* 2010. V. 49. P. 277–288.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science* 2012. V. 337. P. 816–821.
- Kalyuzhnaya M.G., Kumaresan D., Heimann K., Caetano N.S., Visvanathan C., Parthiba Karthikeyan O. Editorial: Methane: a bioresource for fuel and biomolecules // *Front. Environ. Sci.* 2020. V. 8. Art. 9.
- Kalyuzhnaya M.G., Puri A.W., Lidstrom M.E. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria // *Metab. Engin.* 2015. V. 29. P. 142–152.
- Kalyuzhnaya M.G., Yang S., Rozova O.N., Smalley N.E., Clubb J., Lamb A., Gowda G.N., Raftery D., Fu Y., Bringel F. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2785.
- Khadem A.F., Pol A., Wieczorek A., Mohammadi S.S., Francoijs K.J., Stunnenberg H.G., Jetten M.S.M., Op den Camp H.J.M. Autotrophic methanotrophy in verrucomicrobia: *Methylobacterium fumariolicum* SolV uses the Calvin–Benson–Bassham cycle for carbon dioxide fixation // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 4438–4446.
- Khider M.L.K., Brautaset T., Irla M. Methane monooxygenases: central enzymes in methanotrophy with promising biotechnological applications // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 37. P. 72.
- Khmelenina V.N., But S.Y., Rozova O.N., Trotsenko Y.A. Metabolic features of aerobic methanotrophs: news and views // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2019. V. 33. P. 85–100.
- Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Sakharovsky V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Gottschalk G. Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs // *Arch. Microbiol.* 1999. V. 172. P. 321–329.
- Knief C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 1346.
- Le H.T.Q., Nguyen A.D., Park Y.R., Lee E.Y. Sustainable biosynthesis of chemicals from methane and glycerol via reconstruction of multi-carbon utilizing pathway in obligate methanotrophic bacteria // *Microb. Biotechnol.* 2021. V. 14. P. 2552–2565.
- Lee H.M., Ren J., Tran K.M., Jeon B.M., Park W.U., Kim H., Lee K.E., Oh Y., Choi M., Kim D.S., Na D. Identification of efficient prokaryotic cell-penetrating peptides with applications in bacterial biotechnology // *Commun. Biol.* 2021a. V. 4. P. 205.
- Lee H.M., Ren J., Yu M.S., Kim H., Kim W.Y., Shen J., Yoo S.M., Eyun S.I., Na D. Construction of a tunable pro-

- moter library to optimize gene expression in *Methylomonas* sp. DH-1, a methanotroph, and its application to cadaverine production // *Biotechnol. Biofuels*. 2021b. V. 14. P. 228.
- Lee J.K., Kim S., Kim W., Kim S., Cha S., Moon H., Hur D.H., Kim S.Y., Na J.G., Lee J.W., Lee E.Y., Hahn J.S. Efficient production of d-lactate from methane in a lactate-tolerant strain of *Methylomonas* sp. DH-1 generated by adaptive laboratory evolution // *Biotechnol. Biofuels*. 2019. V. 12. P. 234.
- Lieven C., Petersen L.A.H., Jørgensen S.B., Gernaey K.V., Herrgard M.J., Sonnenschein N. A genome-scale metabolic model for *Methylococcus capsulatus* (Bath) suggests reduced efficiency electron transfer to the particulate methane monooxygenase // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 2947.
- Liu Y., He X., Zhu P., Cheng M., Hong Q., Yan X. phe<sup>SAG</sup> based rapid and efficient markerless mutagenesis in *Methylovinumicrobium* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 441.
- Liu Y., Zhang H., He X., Liu J. Genetically engineered methanotroph as a platform for bioaugmentation of chemical pesticide contaminated soil // *ACS Synth. Biol.* 2021. V. 10. P. 487–494.
- Lloyd J.S., Finch R., Dalton H., Murrell J.C. Homologous expression of soluble methane monooxygenase genes in *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Microbiology* (SGM. Reading). 1999. V. 145. P. 461–470.
- Marx C.J., Lidstrom M.E. Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria // *Biotechniques*. 2002. V. 33. P. 1062–1067.
- Marx C.J., Lidstrom M.E. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria // *Microbiology*. 2001. V. 147. P. 2065–2075.
- Marx C.J. Development of a broad-host-range sacB-based vector for unmarked allelic exchange // *BMC Res. Notes*. 2008. V. 1. Art. 1.  
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-1>
- Murrell J.C., Gilbert B., McDonald I.R. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase // *Arch. Microbiol.* 2000. V. 173. P. 325–332.
- Murrell J.C., Smith T.J. Biochemistry and Molecular Biology of Methane Monooxygenase. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin–Heidelberg: Springer, 2010. P. 1045–1055.
- Mustakhimov I.I., Reshetnikov A.S., Glukhov A.S., Khmeleina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.A. Identification and characterization of EctR1, a new transcriptional regulator of the ectoine biosynthesis genes in the halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. P. 410–417.
- Naizabekov S., Lee E.Y. Genome-scale metabolic model reconstruction and *in silico* investigations of methane metabolism in *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Microorganisms*. 2020. V. 8. P. 437.
- Nguyen A.D., Chau T.H.T., Lee E.Y. Methanotrophic microbial cell factory platform for simultaneous conversion of methane and xylose to value-added chemicals // *Chem. Eng. J.* 2021. V. 420. P. 127632.
- Nguyen A.D., Hwang I.Y., Lee O.K., Kim D., Kalyuzhnaya M.G., Mariyana R., Hadiyati S., Kim M.S., Lee E.Y. Systematic metabolic engineering of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z for 2,3-butanediol production from methane // *Metab. Engin.* 2018. V. 47. P. 323–333.
- Nguyen D., Lee O.K., Lim C., Lee J., Na J.-G., Lee E.Y. Metabolic engineering of type II methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b, for production of 3-hydroxypropionic acid from methane via a malonyl-CoA reductase-dependent pathway // *Metab. Engin.* 2020a. V. 59. P. 142–150.
- Nguyen D.T.N., Lee O.K., Hadiyati S., Affifah A.N., Kim M.S., Lee E.Y. Metabolic engineering of the type I methanotroph *Methylomonas* sp. DH-1 for production of succinate from methane // *Metab. Engin.* 2019. V. 54. P. 170–179.
- Nguyen L.T., Lee E.Y. Biological conversion of methane to putrescine using genome-scale model-guided metabolic engineering of a methanotrophic bacterium *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z // *Biotechnol. Biofuels*. 2019. V. 12. P. 147.
- Nguyen A.D., Kim D., Lee E.Y. Unlocking the biosynthesis of sesquiterpenoids from methane via the methylerythritol phosphate pathway in methanotrophic bacteria, using  $\alpha$ -humulene as a model compound // *Metab. Engin.* 2020b. V. 61. P. 69–78.
- Op den Camp H.J.M., Islam T., Stott M.B., Harhangi H.R., Hynes A., Schouten S., Jetten M.S.M., Birkeland N.K., Pol A., Dunfield P.F. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia* // *Environ. Microbiol. Rep.* 2009. V. 1. P. 293–306.
- Överland M., Tauson A.H., Shearer K., Skrede A. Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals // *Arch. Anim. Nutr.* 2010. V. 64. P. 171–189.
- Parks D.H., Chuvochina M., Rinke C., Mussig A.J., Chauveil P.-A., Hugenholtz P. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. P. D785–D794.
- Pham D.N., Nguyen A.D., Lee E.Y. Outlook on engineering methylotrophs for one-carbon-based industrial biotechnology // *Chem. Engin. J.* 2022a. V. 449. P. 137769.
- Pham D.N., Nguyen A.D., Oh S.H., Lee E.Y. Bypassing the bottlenecks in the shikimate and methylerythritol phosphate pathways for enhancing the production of natural products from methane in *Methylovinumicrobium alcaliphilum* 20Z // *Green Chem.* 2022b. V. 24. P. 2893–2903.
- Pham D.N., Mai D.H.A., Nguyen A.D., Chau T.H.T., Lee E.Y. Development of an engineered methanotroph-based microbial platform for biocatalytic conversion of methane to phytohormone for sustainable agriculture // *Chem. Engin. J.* 2022c. V. 429. Art. 132522.
- Pieja A.J., Morse M.C., Cal A.J. Methane to bioproducts: the future of the bioeconomy? // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017. V. 41. P. 123–131.
- Puri A.W., Owen S., Chu F., Chavkin T., Beck D.A.C., Kalyuzhnaya M.G. Genetic tools for the industrially promising methanotroph *Methylomicrobium buryatense* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 1775–1781.
- Recorbet G., Robert C., Givaudan A., Kudla B., Normand P., Faurie G. Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis* sacB gene // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 1356–1365.
- Ren J., Lee H.-M., Thai T.D., Na D. Identification of a cytosine methyltransferase that improves transformation efficiency in *Methylomonas* sp. DH-1 // *Biotechnol. Biofuels*. 2020. V. 13. P. 200.



- Ro S.Y., Rosenzweig A.C. Recent advances in the genetic manipulation of *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Methods Enzymol.* 2018. V. 605. P. 335–349.
- Salis H.M., Mirsky E.A., Voigt C.A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 946–950.
- Schmitz R.A., Peeters S.H., Versantvoort W., Picone N., Pol A., Jetten M.S.M., Op Den Camp H.J.M. Verrucomicrobial methanotrophs: ecophysiology of metabolically versatile acidophiles // *FEMS Microbiol. Rev.* 2021. V. 45. fuab007.
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N.G., Palmer A.E., Tsien R.Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1567–1572.
- Stafford G.P., Scanlan J., McDonald I.R., Murrell J.C. *rpoN*, *mmoR* and *mmoG*, genes involved in regulating the expression of soluble methane monooxygenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b // *Microbiology (SGM)*. 2003. V. 149. P. 1771–1784.
- Sternberg N., Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 150. P. 467–486.
- Strong P.J., Xie S., Clarke W.P. Methane as a resource: can the methanotrophs add value? // *Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 49. P. 4001–4018.
- Tapscott T., Guarnieri M.T., Henard C.A. Development of a CRISPR/Cas9 system for *Methylococcus capsulatus* in vivo gene editing // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. V. 85. e00340-19.
- Trotsenko Y.A., Murrell J.C. Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy // *Adv. Appl. Microbiol.* 2008. V. 63. P. 183–229.
- Welander P.V., Summons R.E. Discovery, taxonomic distribution, and phenotypic characterization of a gene required for 3-methylhopanoid production // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 12905–12910.
- Williams E., Shimmin M.S., Bainbridge B.W. Mutation in the obligate methylotrophs *Methylococcus capsulatus* and *Methylomonas albus* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1977. V. 2. P. 293–296.
- Wilson E.H., Groom J.D., Sarfatis M.C., Ford S.M., Lidstrom M.E., Beck D.A. A computational framework for identifying promoter sequences in nonmodel organisms using RNA-seq data sets // *ACS Synth. Biol.* 2021. V. 10. P. 1394–1405.
- Yan X., Chu F., Puri A.W., Fu Y., Lidstrom M.E. Electroporation-based genetic manipulation in type I methanotrophs // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. V. 82. P. 2062–2069.
- Ye R.W., Yao H., Stead K., Wang T., Tao L., Cheng Q., Sharpe P.L., Suh W., Nagel E., Arcilla D., Dragotta D., Miller E.S. Construction of the astaxanthin biosynthetic pathway in a methanotrophic bacterium *Methylomonas* sp. strain 16a // *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 34. P. 289–299.
- Zheng Y., Huang J., Zhao F., Chistoserdova L. Physiological effect of XoxG(4) on lanthanide-dependent methanotrophy // *mBio.* 2018. V. 9. e02430-17.

## Genome Editing in Methanotrophic Bacteria: Potential Targets and Available Tools

V. N. Khmelenina<sup>1</sup>, S. Yu. But<sup>1,2</sup>, O. N. Rozova<sup>1,2</sup>, I. Yu. Oshkin<sup>2</sup>, N. V. Pimenov<sup>2</sup>, and S. N. Dedysh<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Moscow region, Pushchino, 142290 Russia*

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

\*e-mail: dedysh@mail.ru

Received July 17, 2022; revised July 26, 2022; accepted July 26, 2022

**Abstract**—Aerobic methanotrophic bacteria are prokaryotic microorganisms possessing methane monooxygenases, unique enzymes that determine their ability to utilize methane (CH<sub>4</sub>) as a growth substrate. This metabolic capability makes methanotrophs attractive objects for biotechnological applications aimed at utilizing methane for production of microbial cell protein and various target metabolites. The current raise of interest to these biotechnologies is driven by high availability of methane, which is a major component of natural gas, as well as of the biogas produced in anaerobic fermentation processes. Since aerobic methanotrophs oxidize methane at the ambient temperature and pressure, they represent natural cell factories for converting CH<sub>4</sub> into various value-added products. Further development of biotechnologies based on methane utilization requires application of genome editing techniques to obtain producer strains with improved characteristics. For a long time, the progress in metabolic engineering of methanotrophs was hampered by their specific metabolic properties and the difficulties of handling these bacteria. Here, we present an overview of the latest achievements in the field of metabolic engineering of methanotrophic bacteria and identify the potential targets as well as the currently available tools for genome editing of these microorganisms. These techniques open up the possibility of constructing strains with biotechnologically relevant characteristics and conducting in-depth research of the metabolic features of aerobic methanotrophs.

**Keywords:** methanotrophic bacteria, methanotroph diversity, metabolic peculiarities of methanotrophs, bio-conversion of methane, genome editing, metabolic engineering

## НА КРАЮ РАДУГИ: ДЛИННОВОЛНОВЫЕ ХЛОРОФИЛЛЫ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ К ДАЛЬНЕМУ КРАСНОМУ СВЕТУ

© 2022 г. А. В. Пиневиц<sup>а</sup>, \*, С. Г. Аверина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: Pinevich.A@mail.ru

Поступила в редакцию 25.05.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 12.07.2022 г.

Феномен фотосинтетической адаптации цианобактерий к дальнему красному свету (ДКС; 700–750 нм) тесно связан с такими фундаментальными вопросами, как фототрофия, микробная экология и разнообразие бактерий. В практическом плане данная биоэнергетическая стратегия важна для биотехнологии фотосинтеза, с перспективой получить доступ к дополнительному ресурсу световой энергии. Как известно, большинство цианобактерий использует свет длиной волны 400–700 нм; возбужденное состояние поступает от светособирающего комплекса к хлорофиллу *a* (Хл *a*) реакционных центров двух фотосистем с красными максимумами поглощения ~700 нм. После выделения первых штаммов с хлорофиллами *d* и *f* выяснилось, что цианобактерии могут использовать и ДКС. В настоящее время получен значительный объем данных о цианобактериях, конститутивно образующих Хл *d*, а также о тех, которые синтезируют Хл *f* или Хл *f*/Хл *d* при фотоакклиматизации к ДКС (англ. far-red light photoacclimation; FaRLiP). Включение этих пигментов в состав фотосинтетического аппарата, в частности с использованием механизма FaRLiP, повышает адаптационный потенциал и расширяет границы распространения цианобактерий. В обзоре приводятся сведения о фотосинтетическом аппарате с Хл *d* или Хл *d*/Хл *f*, о геномном кластере FaRLiP, о разнообразии и филогении цианобактерий с конститутивным или индуцированным синтезом длинноволновых хлорофиллов, об использовании хлорофиллов в качестве хемотаксономического признака и отражении этого признака в номенклатуре цианобактерий.

**Ключевые слова:** дальний красный свет, кластер FaRLiP, реакционный центр, светособирающий комплекс, фикобилисома, фотоадаптация, фотосинтетический аппарат, хлорофилл *d*, хлорофилл *f*, цианобактерии

DOI: 10.31857/S0026365622600444

Свет – разнообразный источник энергии для фототрофии, по аналогии с разнородными субстратами, используемыми при хемотрофии. В этом отношении квантоспецифичные пигмент-белковые комплексы и хромопротеины аналогичны субстратспецифичным ферментам. Неслучайно термины “апопротеин” и “апофермент” сходны не только по звучанию, но и по смыслу (греч. *аро-в данном случае*: быть в основе; соответственно, белковый компонент фоторецептора и ферментный белок).

Подобно разным химическим субстратам, кванты в разных участках световой шкалы неравноценны в физиологическом отношении. Ультрафиолетовые кванты ( $\lambda < 400$  нм) относительно богаты энергией, однако она не только не ассимилируется, но и вызывает разрушение (выцветание) фотосинтетических пигментов. Инфракрасные кванты ( $\lambda > 750$ ), напротив, относительно бедны

энергией; тем не менее, некоторые аноксигенные бактерии способны ее ассимилировать. Использовать всю радуку от фиолетового ( $\lambda \sim 400$  нм) до красного ( $\lambda \sim 700$  нм) края могут цианобактерии так называемой Crown группы и архаичного класса *Gloeobacteria* (Pinevich, Averina, 2021). Некоторым цианобактериям доступен и дальний красный свет (ДКС; 700–750 нм). Как следствие, цианобактерии могут заселять световые ниши в интервале 400–750 нм, используя механизмы фотосинтетической адаптации.

Фотосинтетической адаптацией (англ. photoadaptation) называется приспособляемость к режимам светового излучения разной интенсивности (количественные стратегии) или разного спектрального состава (качественные стратегии). Первые стратегии объединяет установление обратной зависимости между эффективной площадью светособирающей антенны и потоком светового из-

лучения: физиологический оптимум достигается за счет изменения протяженности фотосинтетических мембран, а также плотности упаковки фотосинтетических единиц и их размера (Drews, Niederman, 2002). К качественным стратегиям относятся: переход Состояние 1 ↔ Состояние 2 (Allen, 1992), комплементарная хроматическая адаптация (Grossman et al., 1993) и фотосинтетическая адаптация к ДКС (Averina et al., 2019).

Хотя кванты длиной волны >700 нм относительно бедны энергией, некоторые бактерии способны образовывать “длинноволновые” (англ. red-shifted) металлопорфирины – хлорофиллы (Хл) и бактериохлорофиллы – и так модифицировать фотосинтетический аппарат, что адаптация к нишам, где много ДКС, становится выгодной метаболической стратегией (Kühl et al., 2005).

Инфракрасный свет используют пурпурные бактерии, образующие бактериохлорофиллы *a* или *b*, длинноволновые максимумы которых находятся, соответственно, при 800–900 и 980–1050 нм (Deisenhofer et al., 1985). Максимумы ≤800 нм имеют бактериохлорофилл *g* у гелиобактерий (Neerken, Amesz, 2001) и бактериохлорофиллы *c*, *d*, *e* и *fu* зеленых бактерий и хлорацидобактерий (Amesz, Neerken, 2002; Bryant et al., 2007).

Светособирающий комплекс (ССК) у большинства цианобактерий поглощает видимый свет, и возбужденное состояние мигрирует к Хл *a* в реакционных центрах (РЦ) двух фотосистем (ФС) – ФС I и ФС II с максимумами поглощения, соответственно, при 700 и 680 нм. Возможность фотосинтетической адаптации к ДКС у цианобактерий не предполагалась до тех пор, пока у них не были обнаружены длинноволновые Хл *d* и Хл *f* (Miyashita et al., 1996; Chen et al., 2010). Данная биоэнергетическая стратегия быстро стала темой многих исследований, результаты которых обобщены в обзорах литературы, публиковавшихся почти ежегодно с начала 2010-х годов (Loughlin et al., 2013; Gan, Bryant, 2015; Gan et al., 2015; Li, Chen, 2015; Allakhverdiev et al., 2016; Badshah et al., 2017; Averina et al., 2018, 2019; Sawicki, Chen, 2020; Friedrich, Schmitt, 2021). Настоящее сообщение продолжает эту серию, по-новому обобщая и реструктурируя материал, с учетом последних данных.

## ДЛИННОВОЛНОВЫЕ ХЛОРОФИЛЛЫ

Хлорофиллы, или магниевые хелаты двойного эфира хлорофиллиновой кислоты с фитолом и метанолом, интенсивно поглощают синий свет (т.н. полоса Soret) и красный свет (Q-полоса, или Q<sub>y</sub>-вектор энергетического перехода); длинноволновые хлорофиллы интенсивно поглощают синий свет и ДКС (рис. 1). Положение максимумов на спектрах поглощения *in situ* или у изолированных пигмент-белковых комплексов иное, чем

у препаратов соответствующих хлорофиллов (French, 1960): в частности, красный максимум перемещается к большей длине волны. В очередности их описания хлорофиллы обозначают буквами от *a* до *f* (кроме буквы *e*, которая была вынужденно пропущена после доказательства ошибочной идентификации “Хл *e*” у красных водорослей; см.: Larkum et al., 2018).

В функциональном отношении хлорофиллы подразделяют на главные и вспомогательные: первые входят в реакционные центры, вторые в – ССК. Посредником между вспомогательными и главными хлорофиллами служат малые кор-антенные реакционных центров. Как автономно действующие, они неэффективны: даже при максимальном солнечном освещении (на экваториальном высокогорье в летний полдень) частота их перехода в возбужденное состояние уступила бы скорости транспорта электронов в реакционных центрах, что затормозило бы фотосинтез (Hunter et al., 1989). Это не происходит благодаря присутствию ССК – фотосинтетической антенны с намного большей эффективной площадью (Blankenship, Chen, 2013).

Как правило, цианобактерии образуют только один хлорофилл – Хл *a*, который входит в состав кор-антенн и реакционных центров; функцию ССК выполняет высокоупорядоченный агрегат фикобилипротеинов – фикобилисома (ФБС) (Grossman et al., 1993). Небольшая группа цианобактерий-прохлорофитов (Пиневиц и соавт., 2010) использует вместо ФБС хлорофилл-белковый комплекс, содержащий либо Хл *a*/Хл *b*, либо Хл *a*<sub>2</sub>/Хл *b*<sub>2</sub> (3,8-дивинильные производные Хл *a* и Хл *b*). В число порфиринов ССК цианобактерий также может входить минорный Хл *c*-подобный пигмент (Mg-3,8-дивинил протохлорофиллид, Mg-ДВП), обнаруженный у некоторых прохлорофитов и Хл *d*-содержащей цианобактерии *Acaryochloris marina* (Averina et al., 2019). Что касается длинноволновых Хл *d* и Хл *f*, то первый из них входит в состав не только в ССК, но и реакционных центров, а второй – в ССК и, возможно, реакционные центры.

У земной поверхности поток солнечной радиации примерно одинаков в диапазонах 600–700 и 700–800 нм. Но, поскольку длинноволновые кванты беднее энергией, чем коротковолновые, фотосинтез при >700 нм менее выгоден, чем в видимой части спектра, и цианобактерии обычно не используют ДКС. Тем не менее, некоторые из них образуют длинноволновые Хл *d* и Хл *f*, и зона фотосинтетически активной радиации (ФАР) распространяется на длинноволновую часть спектра (Kühl et al., 2005). Однако в водоемах глубина проникновения света обратно пропорциональна длине волны; инфракрасный свет полностью поглощается в нескольких сантиметрах от поверхности. Соотношение красного света и ДКС в

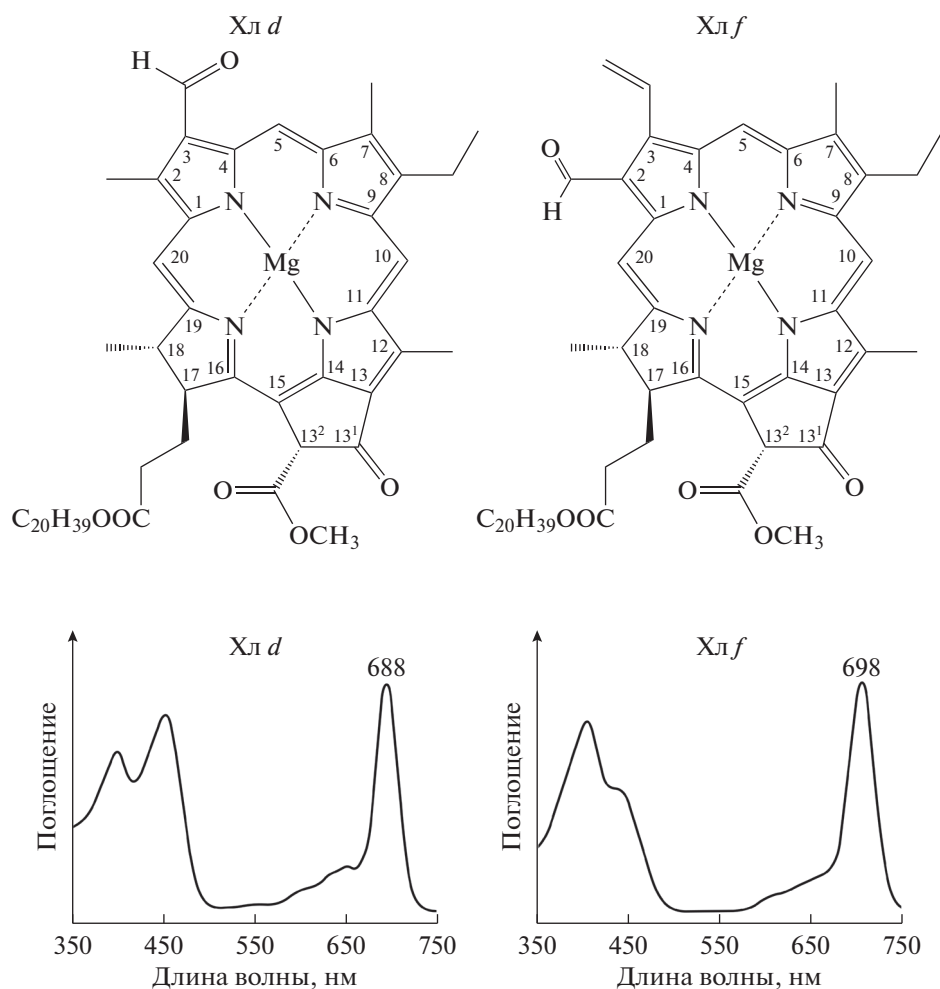


Рис. 1. Структурные формулы длинноволновых хлорофиллов (верхний ряд) и спектры поглощения в 100%-ном ацетоне (нижний ряд; см. Averina et al., 2019).

морской или чистой озерной воде линейно возрастает с глубиной (Kirk, 1994), причем ДКС проникает не дальше 10 м (Gan et al., 2014). Поэтому адаптированные к ДКС цианобактерии, как правило, не заселяют верхние этажи эуфотической зоны морей и континентальных водоемов, а образуют биопленки на (суб)литорали, на почве и на каменистых субстратах.

#### Хлорофилл *d*

**Структура и оптические свойства.** В молекуле Хл *d* положение С3 занимает формильная, а не винильная группа, как в молекуле Хл *a* (рис. 1). Соответственно, Q-полоса смещена в длинноволновую область (665 → 688 нм, в 100%-ном ацетоне; см. Averina et al., 2019).

Открытие Хл *d* часто связывают с анализом пигментов *Rhodophyceae* (Manning, Strain, 1943). Позднее оказалось (Holt, 1961), что опубликованный спектр поглощения совпадает со спектром

поглощения 3-девинил-3-формил Хл *a*, по-видимому, образовавшегося из-за погрешности методики фракционирования образца. С другой стороны, “загадку” открытия Хл *d* объясняют присутствием данного пигмента у бактериальных симбионтов *Rhodophyceae* (Wood, 2012; Kiang et al., 2022). Так или иначе, впервые аутентичный Хл *d* был обнаружен у *A. marina* (Miyashita et al., 1996).

Хл *d* и не содержащие магния производные — феофитин *d* и пиррофеофитин *d*, находят в морских илах Японских островов, на пелагиали Берингова моря, в соленых озерах Антарктиды и некоторых пресных озерах, в частности, в крупнейшем озере Японии Бива (Kashiyama et al., 2008). Если специфические производные Хл *d* можно получить в лаборатории, то в природе такая химическая реакция маловероятна, особенно для пиррофеофитина; скорее всего, эти порфирины являются побочными продуктами микробного катаболизма Хл *d* и/или Хл *a*. В противном случае эти данные можно ин-

терпретировать как косвенное свидетельство широкого распространения Хл *d*.

**Биосинтез.** Индивидуальные представители молекулярного семейства (бактерио)хлорофиллов образуются на завершающих этапах глобального пути биосинтеза металлопорфиринов (Bauer et al., 1993). Для Хл *d* теоретически возможны два способа: 1) посредством прямого превращения Хл *a* → Хл *d*, поскольку эти молекулы различаются только одним боковым заместителем; 2) на ответвлении магистрального пути (Loughlin et al., 2013). Первый механизм более реален (рис. 2): в опытах с культурами *Acaryochloris marina*, выращенными на среде с добавлением  $^{18}\text{O}_2$  или  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , установлено, что кислородный атом формильной группы происходит из молекулярного кислорода, а не из воды (Schlier et al., 2010). Поскольку синтеза Хл *d* не обнаружена, есть предположение, что оксидазную реакцию неспецифически катализирует либо цитохром P450-типа (обычный участник монооксигеназных реакций), либо специальная оксигеназа для феофорбида *a* (Chen, Blankenship, 2011; Yoneda et al., 2016). В опытах *in vitro* показано, что в образовании Хл *d* участвуют ферменты со свободной тиольной группой, например, цистеиновая протеаза папаин (Koizumi et al., 2005) или низкомолекулярные тиосоединения (Fukusumi et al., 2012). То, что данное превращение связано с тиолсодержащими белками или с малыми молекулами с HS-группой, подтверждается транскриптомным анализом штамма дикого типа *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 и мутантов по генам регуляторных белков RfpA, RfpB и RfpC (Ho, Bryant, 2019). В частности, в образовании затравки Хл *d* для сборки ФС II могут участвовать богатые остатками Cys субъединицы фикобилипротеинов (Bryant et al., 2020).

#### Фотосинтетический аппарат цианобактерий с конститутивным образованием хлорофилла *d*

Цианобактерии образуют длинноволновые хлорофиллы и включают их в состав фотосинтетического аппарата согласно альтернативным стратегиям: конститутивному синтезу Хл *d* и индуцированному синтезу Хл *f* или Хл *f*/Хл *d*.

Соотношение Хл *a* : Хл *d* в клетках *A. marina* (в среднем 0.05) тем выше, чем ярче свет и меньше парциальное давление кислорода (Mimuro et al., 2004; Lin et al., 2013). Феофитинизация и дефицитирование Хл *d* усиливаются в темноте и при аноксии (Tsuzuki et al., 2022). Таким образом, метаболизм Хл *d* находится, как минимум, под двойным экологическим контролем.

Каротиноиды представлены преимущественно зеаксантином, а также  $\alpha$ -каротином, который образуется вместо обычного у цианобактерий  $\beta$ -каротина (Miyashita et al., 1997).

Состав гидрофильных пигментов штаммоспецифичен. Вначале было показано, что у *A. marina* MBIC 11017 имеются фикоцианин (ФЦ) и аллофикоцианин (АФЦ) (Hu et al., 1999), и что гены субъединиц СрсА–G находятся на плазмиде pREV3, а гены субъединиц АрсА и АрсВ – на хромосоме (Swingley et al., 2008). Новые исследования показали, что у данного штамма АФЦ присутствует в следовом количестве, и поэтому роль терминального переносчика энергии может выполнять ФЦ (Bar-Zvi et al., 2018). Кроме того, показано, что ходе эволюции анцестральные гены ФЦ были утрачены, а затем их отдаленные гомологи были приобретены путем горизонтального переноса. Гены *apcA* и *apcB*, в свою очередь, являются отдаленными гомологами генов собственно АФЦ, однако их происхождение неизвестно (Ulrich et al., 2021).

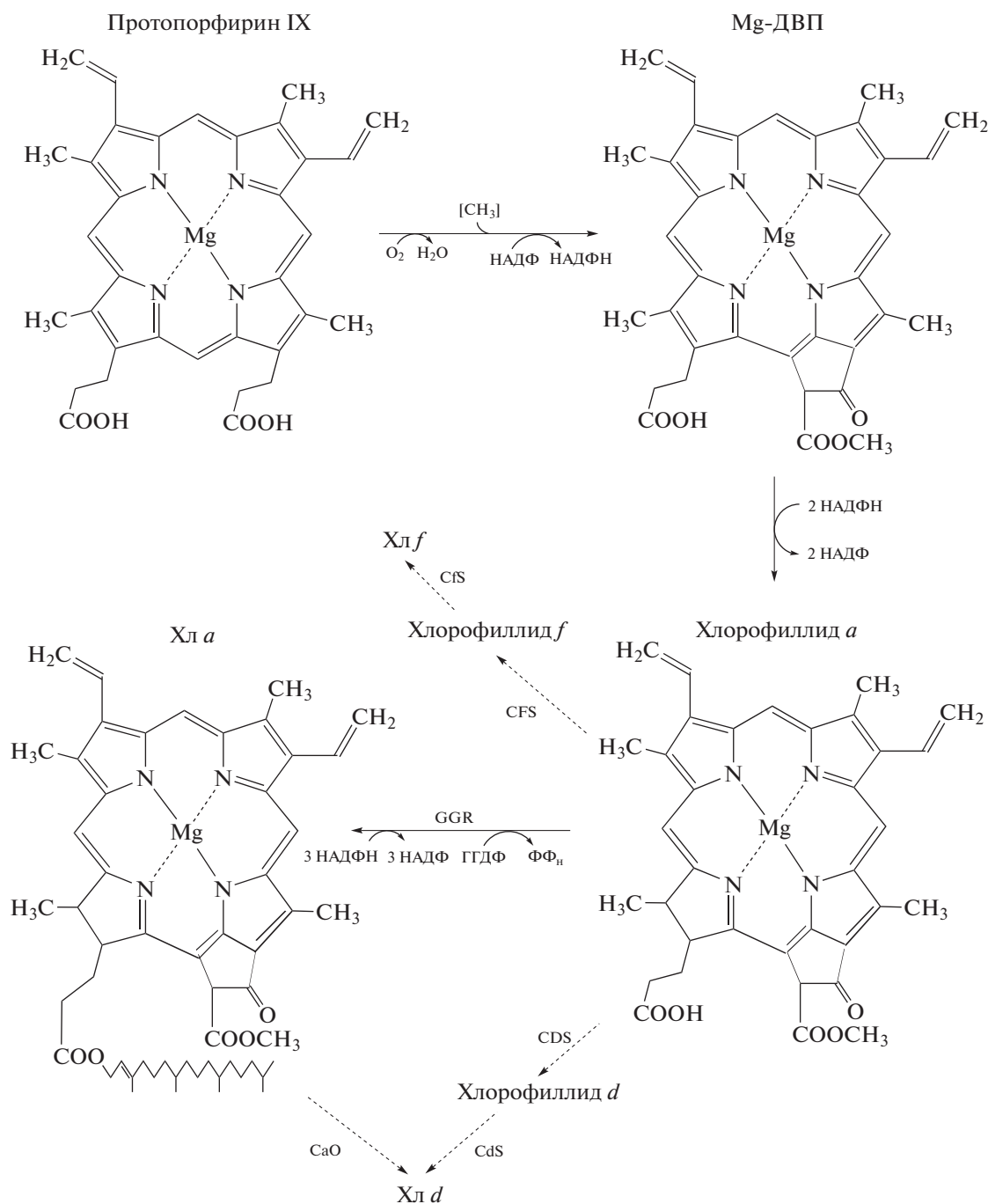
В отличие от штамма MBIC 11017, у штаммов ССМEE5410 и Н1СR111А отсутствуют ФЦ и АФЦ (Chen et al., 2009; Mohr et al., 2010; Miller et al., 2011).

**Светособирающий комплекс.** В фотосинтетическом аппарате *Acaryochloris* spp. молекулы Хл *d* выполняют двоякую роль: хлорофилла ССК и хлорофилла реакционных центров РЦ I и РЦ II (Itoh et al., 2007). В состав ССК, общего для ФС I и ФС II (Schiller et al., 1997; Chen et al., 2005c, 2005d), входят белки суперсемейства СВР (сокр. англ. Chlorophyll Binding Protein). Эти шестидоменные белки могут связывать Хл *a*, Хл *a*<sub>2</sub>, Хл *b*, Хл *b*<sub>2</sub> или Хл *d* (Chen et al., 2008; Пиневиц и соавт., 2010). Они сходны с белками семейства Ср43/IsiA (СР43, или PsbC, входит в антенну РЦ II; IsiA, или СР43' – это индуцированная железным стрессом субъединица ФС II). Важно, что белки СВР отличаются от трехдоменных белков суперсемейства САВ (сокр. англ. chlorophyll *a/b* protein) в хлоропластах (La Roche et al., 1996).

Группа из 18 молекул белка СВР окружает тройной комплекс ФС I, а 8 молекул фланкируют 4 комплекса ФС II (Chen et al., 2005a, 2005b). При железном стрессе вместо белка СВР-А синтезируется белок СВР-С; транскрипция его гена индуцируется и при ослаблении освещения (Chen et al., 2005a; Swingley et al., 2005).

Как отмечалось в начале раздела, в состав порфиринов ССК *A. marina* может входить и Mg-ДВП. Однако вопрос о функционировании этого Хл *c*-подобного пигмента в фотофизических процессах остается открытым (Schlier et al., 2008); более реальной видится его роль как ключевого интермедиата биосинтеза хлорофиллов (рис. 2).

У штаммов *A. marina*, наряду с Хл *d*-содержащим ССК, имеется фикобилипротеиновый ССК (Chen et al., 2009). В то время как т.н. “стандартная ФБС” (MacColl, 1998) имеет форму половины диска, этот ССК – цилиндрический и образован



**Рис. 2.** Схема конечных этапов биосинтеза длинноволновых хлорофиллов. Предполагаемые реакции выделены пунктиром. Обозначения: Mg-ДВП – Mg-3,8-дивинил протохлорофиллид; CaO – хлорофилл *a* оксигеназа; CDS – хлорофиллид *d* синтаза; CdS – хлорофилл *d* синтаза; CFS – хлорофиллид *f* синтаза; CFS – хлорофилл *f* синтаза; GGR – геранилгеранил редуктаза; ГДФ – геранилгеранилдифосфат; НАДФ(Н) – окисленный и восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат; ФФ<sub>н</sub> – неорганический дифосфат (по: Averina et al., 2019; с изменениями).

стержнями, состоящими из тримеров ФЦ (Niedzwiedzki et al., 2019). Ввиду отсутствия окрашенного “анкерного” линкера АрсЕ неясно, каким образом такая уникальная ФБС прикреплена к тилакоиду; тем не менее, она эффективно передает энергию РЦ II (Hu et al., 1999). Кроме того,

тримеры ФЦ должны быть спектрально гетерогенными, чтобы перенос энергии к основаниям стержней стал однонаправленным. По-видимому, это достигается за счет синтеза изоформных мономеров ФЦ, а также вследствие разнообразия линкерных полипептидов (Bar-Zvi et al., 2018;

Niedzwiedzki et al., 2019). Так или иначе, располагая сразу двумя светособирающими комплексами, *A. marina* имеет существенное преимущество перед другими ДКС-адаптированными цианобактериями (Loughlin et al., 2013).

**Реакционные центры.** Каркас РЦ I *A. marina*, гетеродимер PsaA/PsaB на 86% сходен с типовым. Первичным донором (P740) служит специальная пара (англ. special pair) – димер Хл *d*/Хл *d'* (Хл *d'* это C13<sup>2</sup> алломер Хл *d*). Согласно консенсусной модели (рис. 3), первичный донор взаимодействует с первичным акцептором (одной из двух молекул Хл *a*) и вторичными акцепторами, а также с Хл *d* в кор-антенне; редокс-потенциал возбужденного первичного донора (P740\*) равен – 439 мВ (Hu et al., 1998), т.е. он примерно такой же, как у возбужденного первичного донора (P700\*) в РЦ I большинства цианобактерий (Tomo et al., 2008). В свете последних данных консенсусная модель может быть частично пересмотрена. По-видимому, РЦ I уникален: первичным акцептором (A<sub>0</sub>) вместо Хл *a* служит феофитин *a*. Кроме того, ФС I существует как тример; каждый мономер содержит дополнительную субъединицу Psa27, 70–77 молекул Хл *d*, одну молекулу Хл *a*, две молекулы феофитина *d*, 12–13 молекул α-каротина, две молекулы филлохинона, три Fe-S кластера, две молекулы фосфатидилглицерола и одну молекулу моногалактозилдиглицерина (Hamaguchi et al., 2021; Xu et al., 2021; Kimura et al., 2022).

Строение РЦ II до конца не ясно. В отношении первичного донора были выдвинуты две гипотезы. Согласно первой из них, это специальная пара молекул Хл *d* (Itoh et al., 2007). Сильный контраргумент основан на термодинамических расчетах (Allakhverdiev et al., 2016): энергии, поглощенной ССК, недостаточно для работы четырехтактного механизма фотоокисления воды (т.н. Cock's clock). Согласно второй гипотезе, это – как обычно у цианобактерий – специальная пара молекул Хл *a* (P680) (Mimuro et al., 1999). Однако в данном случае пришлось бы допустить, что энергия мигрирует против термодинамического потенциала: ССК содержит Хл *d*, а тот по сравнению с Хл *a* поглощает кванты меньшей частоты. В доказательство второй гипотезы были использованы данные измерения флуоресценции клеток при 77 К (Mimuro et al., 1999, 2004), а также результаты биохимического анализа, согласно которым соотношение Хл *a* : феофитин *a* (1 : 1) не изменялось при разных режимах освещения (Mimuro et al., 1999, 2000; Akiyama et al., 2002; Mimuro et al., 2004). Следует отметить, что обе гипотезы были предложены до начала опытов с мембранными препаратами *A. marina*. Полученные в них результаты, в частности, с помощью метода инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR), указывали на возможность существования P713 – специальной пары

молекул Хл *d* (Tomo et al., 2007); результаты анализа очищенных препаратов ФС II подтверждали это (Itoh et al., 2007). Из термодинамических расчетов, напротив, следовало, что первичный донор – гетеродимер Хл *a*/Хл *d* (Renger, Schlodder, 2008). В настоящее время утвердилась консенсусная модель (Allakhverdiev et al., 2016), согласно которой (рис. 3) в РЦ II содержатся две молекулы феофитина *a* и 6 молекул хлорофилла, в том числе, не менее четырех молекул Хл *d*. Первичным акцептором, скорее всего, служит молекула Хл *d* (*d*<sub>D1</sub>) на действующей ветви; квазисимметричная ей молекула Хл *d* (*d*<sub>D2</sub>) находится на недействующей ветви. Оставшиеся две молекулы Хл *d* (*d*<sub>Z</sub>) выполняют антенную функцию. Вторичным акцептором, скорее всего, является феофитин *a*. Подводя итог, отметим, что неоднозначность выводов о строении РЦ II у *Acaryochloris* spp., безусловно, будет устранена по мере расширения круга модельных штаммов и использования более совершенных аналитических методов.

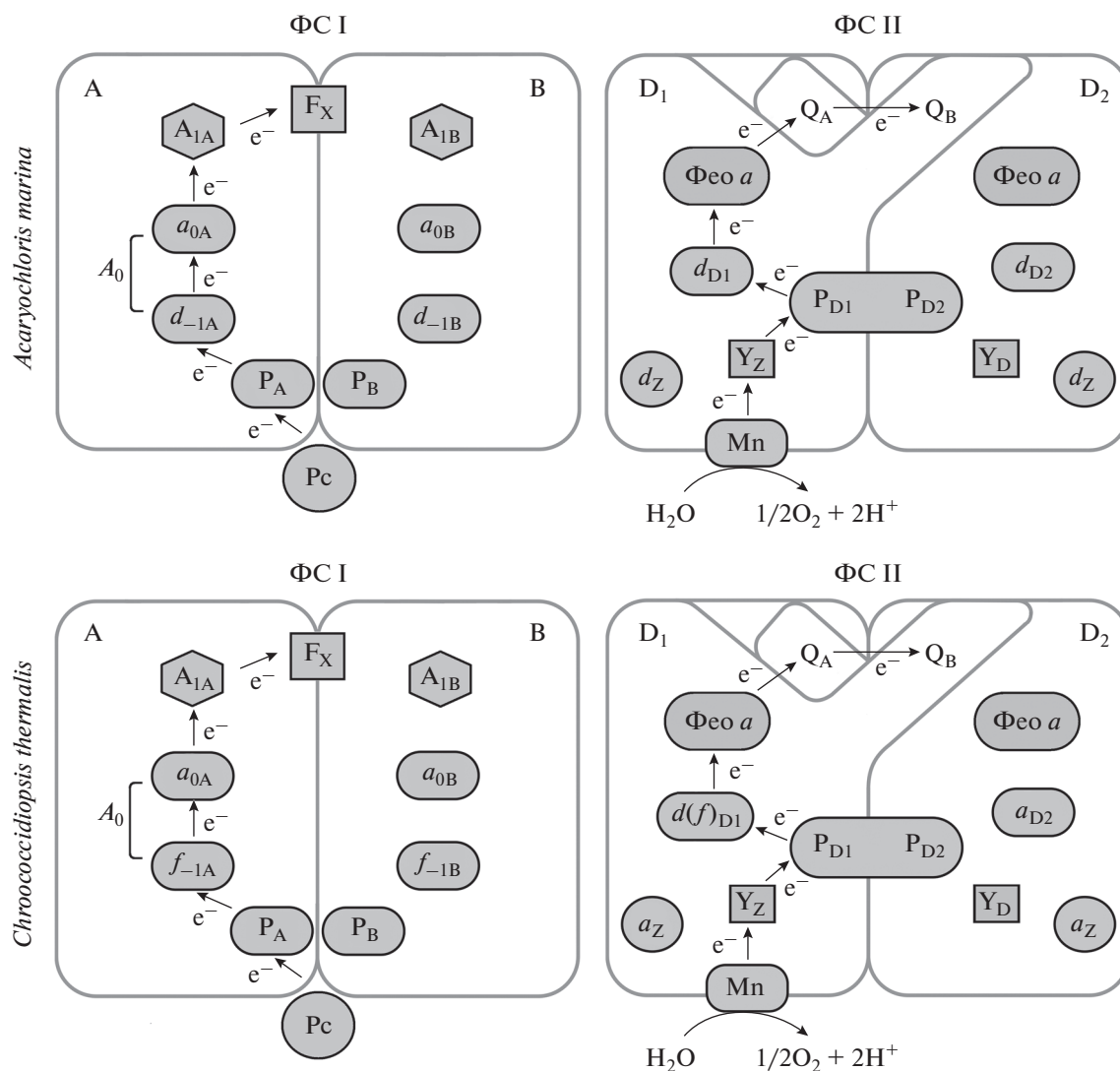
## ХЛОРОФИЛЛ *f*

Chl *f* – это минорный хлорофилл (~10% содержания Хл *a*) у ряда одноклеточных цианобактерий, в частности, *Aphanocapsa* sp. KC1 (Miyashita et al., 2014), штамма NSW (Behrendt et al., 2015), *Synechococcus* sp. PCC 7335 (Gan et al., 2015) и *Altericista variichlora* CALU 1173 (Averina et al., 2021). Он также обнаружен у некоторых нитчатых цианобактерий, например, *Halomicronema hongdechloris* C2206 (Chen et al., 2012), *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 (Airs et al., 2014), *Leptolyngbya* sp. JSC-1 (Gan et al., 2014), *Chlorogloeopsis* sp. PCC 9212 (Gan et al., 2015) и *Ch. fritschii* CALU 759 (Averina et al., 2018).

**Структура и оптические свойства.** При относительно небольшом структурном различии Хл *f* и Хл *a* (2-формил вместо 2-метила; рис. 1), Q-полоса сильно смещена в длинноволновую область (665 → 698 нм, в 100%-ном ацетоне; см. Averina et al., 2019). Таким образом, Хл *f* – наименее энергоемкий среди известных хлорофиллов (Chen et al., 2010).

**Биосинтез.** Хл *f* – регионально более окисленная молекула, чем Хл *a*. Теоретически, он может образовываться альтернативными способами (рис. 2). В первом случае окисляется метильная группа в молекуле Хл *a*; во втором случае окислению подвергается хлорофиллид *a* (Chen et al., 2010; Miyashita et al., 2014; Ho et al., 2016). Методами обратной генетики и гетерологической экспрессии показано, что Хл *f* синтазу кодирует ген *psbA4*, который имеется у всех адаптирующихся к ДКС цианобактерий (Ho et al., 2016). Этот ген – паралог генов семейства *psbA* (гены ФС II), и хотя в его продукте, белке PsaA4, нет домена для связывания марганцевого кластера H<sub>2</sub>O-окисляю-





**Рис. 3.** Схема фотосистем у цианобактерий с длинноволновыми хлорофиллами. Объяснение в тексте. Вверху слева: ФС I у *Acaryochloris marina*. Обозначения: А, В – каркасный гетеродимер субъединиц, действующая и недействующая ветви соответственно; P<sub>c</sub> – пластоцианин; P<sub>A</sub>, P<sub>B</sub> – первичный донор (димер Хл *d*); A<sub>0</sub> (*d*<sub>-1A</sub>, *d*<sub>-1B</sub> – Хл *d*; *a*<sub>0A</sub>, *a*<sub>0B</sub> – Хл *a*) – первичный акцептор; A<sub>1A</sub>, A<sub>1B</sub> – промежуточный акцептор; F<sub>X</sub> – вторичные акцепторы (FeS-кластеры). Внизу слева: ФС I у *Chroococcidiopsis thermalis*. Обозначения: как указано выше, за исключением P<sub>A</sub>, P<sub>B</sub> (в данном случае это димер Хл *a*) и A<sub>0</sub> (в данном случае *d*<sub>-1A</sub> это Хл *f* вместо Хл *d*). Вверху справа: ФС II у *A. marina* (по: Averina et al., 2018; с изменениями). Обозначения: D1, D2 – каркасный димер субъединиц, действующая и недействующая ветви соответственно; P<sub>D1</sub>, P<sub>D2</sub> – первичный донор (гетеродимер Chl *a*/Chl *d*); *d*<sub>D1</sub>, *d*<sub>D2</sub> – первичный акцептор (Хл *d*); Фео *a* – вторичный акцептор (феофитин *a*); Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> – вторичные акцепторы (хиноны); *d*<sub>Z</sub> – Хл *d* антенны реакционного центра; Y<sub>Z</sub>, Y<sub>D</sub> – остатки Туг; Mn – марганцевый кластер H<sub>2</sub>O-окисляющего комплекса. Внизу справа: ФС II у *Ch. thermalis*. Обозначения: как указано выше, за исключением P<sub>D1</sub>, P<sub>D2</sub> (в данном случае это димер Chl *a*) и *d*<sub>D1</sub> (в данном случае вместо Хл *d* это может быть Хл *f*). *a*<sub>Z</sub> – Хл *a* антенны реакционного центра.

шего комплекса, в нем присутствуют лиганды для Хл *a* и консервативный остаток Туг (Y<sub>Z</sub>) (Gan et al., 2015). Хотя Хл *f* в следовом количестве образуется даже на белом свете, для адаптивного биосинтеза требуется ДКС, т.е. белок P<sub>sbA4</sub> – это фотооксидоредуктаза (Ho et al., 2017b; Shen et al., 2019). Во избежание путаницы, чтобы не смешивать ген Хл *f* синтазы с геном-паралогом, который кодирует субъединицу P<sub>sbA1</sub> (другое обозначение –

субъединица D1) в составе РЦ II, было предложено переименовать ген *psbA4* в *chlF*, а белок P<sub>sbA4</sub> – в ChlF (Ho et al., 2016). По-видимому, ген *chlF* является анцестральным геном, и остальные *psbA*-гены произошли от него путем дупликации и дивергенции (Murray, 2012; Cardona et al., 2015). Иными словами, Хл *f* – более архаичный признак, чем ФС II (Ho et al., 2016).



*Фотосинтетический аппарат цианобактерий  
с индуцированным образованием  
длинноволновых хлорофиллов*

**Проблема энергетического сопряжения между длинноволновыми хлорофиллами и Хл *a*.** На возможность миграции энергии от длинноволновых хлорофиллов к Хл *a* указывает то, что на перифериях ФС I и ФС II обнаружены пулы молекул Хл *f* (Itoh et al., 2015). Однако перенос энергии от Хл *f* к Хл *a* проблематичен из общетеоретических соображений. Действительно, Хл *a* получает энергию от пигментов, интенсивно поглощающих видимый свет (Хл *b*, каротиноидов и фикобилипротеинов), тогда как Хл *f* не только слабо поглощает свет в этой области, но и усиленно флуоресцирует. К тому же Chl *f* должен подчиняться правилу Стокса (возбужденное состояние передается пигменту с максимумом поглощения при большей длине волны).

Тем не менее, перенос энергии от Хл *f* к Хл *a* — это не работа против термодинамического потенциала (англ. uphill): второе начало термодинамики, скорее всего, соблюдается благодаря сочетанию специфических факторов. К ним относятся: а) долгое пребывание Хл *f* в возбужденном состоянии; б) низкая энтропия, по статистике Больцмана, системы молекул Хл *f*; в) близкое соседство молекул Хл *f* и Хл *a*; г) особая связь между длинноволновыми хлорофиллами и апопротеинами (Niedzwiadzki et al., 2014; Itoh et al., 2015; Allakhverdiev et al., 2016; Larkum et al., 2018). Функционирование Хл *f* в качестве переносчика энергии подтверждается результатами спектроскопии *H. hongdechloris* (Tomo et al., 2014; Akimoto et al., 2015) и теоретическими расчетами с применением методов математического моделирования (Schmitt et al., 2019).

**Светособирающий комплекс.** По априорным представлениям, Хл *f* прежде всего антенный пигмент (Chen, Blankenship, 2011; Allakhverdiev et al., 2016; Nürnberg et al., 2018), хотя конкретные данные о составе хлорофиллсодержащего ССК у цианобактерий, индуцированно образующих Хл *f* или Хл *f*/Хл *d*, в настоящее время отсутствуют. Зато известно, как при адаптации к ДКС изменяется структура ФБС. В частности, у *Leptolyngbya* sp. JSC-1 количество цилиндрических суперкомплексов кора уменьшается с трех до двух (Gan et al., 2014). Из-за изменения состава хромофоров максимум поглощения кора смещается на 40 нм в длинноволновую сторону (обычно он при ~650 нм; Glazer, Bryant, 1975). При адаптации к ДКС у *H. hongdechloris* вместо пятицилиндрового кора образуется двухцилиндровый кор из субъединиц АФЦ с максимумами поглощения при 653 и 712 нм (Li et al., 2016). У адаптированного к ДКС штамма *Synechococcus* sp. PCC 7335 имеются “стандартная ФБС” (трехцилиндровый кор; периферические стержни из ФЦ и АФЦ) и “мини-ФБС” (двухци-

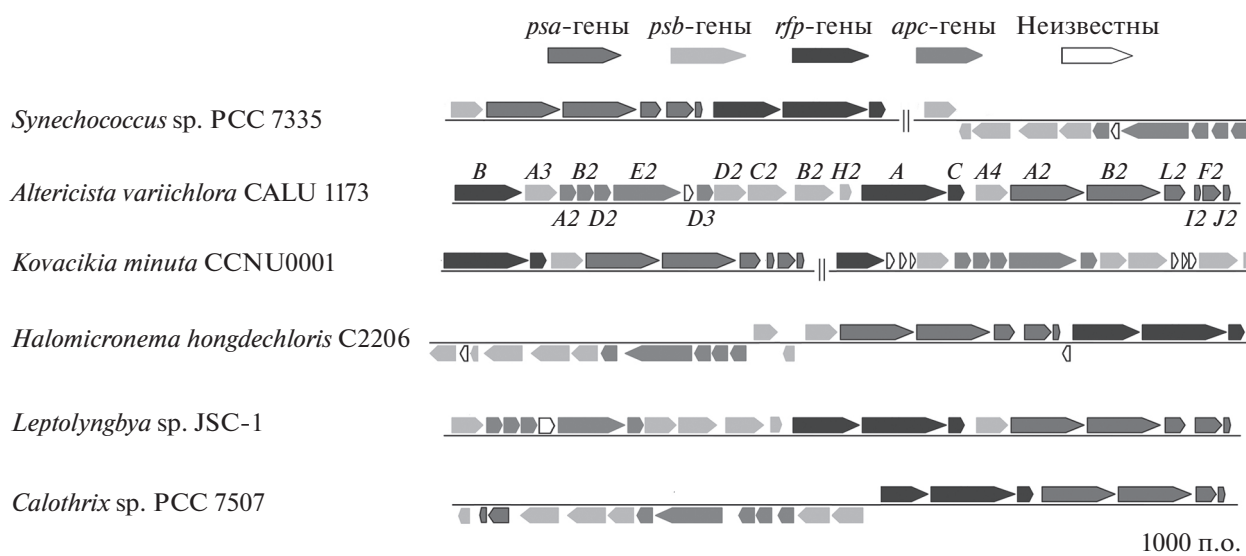
линдровый кор из аллофикоцианинов ArcB2, ArcD2/D3/D5, ArcE2 и ArcF). Максимум поглощения “мини-ФБС” расположен при большей длине волны (711 нм вместо 650 нм), и пик низкотемпературной флуоресценции при 730 нм (Ho et al., 2017a).

Длинноволновые сдвиги “стандартной ФБС” и образование “мини-ФБС” обеспечивают миграцию энергии в направлении АФЦ → Хл *f*. Кроме того, установлено, что разделение зарядов в РЦ II ускоряется при наличии АФЦ-содержащих длинноволновых антенн, тогда как у остальных известных типов фотосистем увеличение эффективной площади ССК, напротив, замедляет разделение зарядов (Mascoli et al., 2022).

**Реакционные центры.** Неизвестно, участвует ли Хл *f* в первичной фотохимии (Allakhverdiev et al., 2016). Результаты опытов с выращенными на ДКС клетками *Chroococcidiopsis thermalis* теоретически допускают, что Хл *f* участвует в разделении зарядов в РЦ I и РЦ II (Nürnberg et al., 2018) (рис. 3). Очевидно, что фотохимическая активность специальной пары Хл *f*/Хл *f* (или Хл *f*/Хл *d*) зависит от того, будет ли редокс-потенциал возбужденного состояния выше по абсолютной величине, чем у P700\* и P680\* (Nürnberg et al., 2018).

ФС I, как следует из анализа клеток *Ch. thermalis*, выращенных на ДКС, содержит 7–8 молекул Хл *f*, причем большинство из них входит в кор-антенну (Shen et al., 2019; Gisriel et al., 2020). Недавний анализ ФС I *Fischerella thermalis* с помощью фемтосекундной спектроскопии (FTIR) показывает, что у этой цианобактерии длинноволновые хлорофиллы — исключительно антенные пигменты (Cherepanov et al., 2020). Однако предыдущее изучение *F. thermalis* и *Ch. thermalis* этим же методом (Nürnberg et al., 2018; Hastings et al., 2019) позволило считать, что, хотя длинноволновые хлорофиллы и не выполняют функцию первичного донора (P<sub>A</sub>/P<sub>B</sub>), первичным акцептором ( $f_{-1A}$  и/или  $f_{-1B}$ ) все же может быть Хл *f* (рис. 3).

ФС II в клетках *Ch. thermalis*, выращенных на ДКС, содержит в основном Хл *a* (до 30 молекул), а также 4 молекулы Хл *f* и одну молекулу Хл *d*. Только одна молекула длинноволнового хлорофилла участвует в переносе электронов; она, видимо, входит в специальную пару (Nürnberg et al., 2018). По уточненным данным, такая молекула находится в положении-D1 (Nürnberg et al., 2018; Judd et al., 2020), а не в положении-P<sub>D1</sub>, как считали ранее (см. Gorke et al., 2021). Альтернативным членом специальной пары может быть длинноволновый хлорофилл в положении-P<sub>D2</sub> (рис. 3). Иными словами, специальной парой в ФС II считается, хотя и не окончательно, гетеродимер Хл *a*/Хл *f* или гетеродимер Хл *a*/Хл *d* (Judd et al., 2020). Недавно проведенное крио-ЭМ моделирование ФС II для ДКС-адаптированных клеток



**Рис. 4.** Схематическое изображение генного кластера FaRLiP у представителей разных родов цианобактерий. Обозначения генов из отдельных групп приведены только для ранее описанного вида *A. variichlora* (Averina et al., 2021).

*Synechococcus* sp. PCC 7335 позволило идентифицировать одну молекулу Хл *d* в положении-Р<sub>D1</sub> и четыре молекулы Хл *f* в кор-антенне (Gisriel et al., 2021). Согласно филогенетической реконструкции, адаптированная к ДКС анцестральная ФС II содержала в цепи переносчиков одну молекулу Хл *d*, а также две молекулы Хл *f* и три молекулы Хл *a* в составе антенных субъединиц, причем современная структура могла сформироваться разными способами (Gisriel et al., 2022).

Благодаря внедрению в сердцевину ФС II отдельных молекул длинноволнового хлорофилла ДКС-адаптирующиеся цианобактерии эффективнее реагируют на изменение спектрального состава света, чем *A. marina* (Mascoli et al., 2022).

#### КЛАСТЕР ФОТОАДАПТАЦИИ К ДАЛЬНЕМУ КРАСНОМУ СВЕТУ (FaRLiP)

Генный кластер FaRLiP (сокр. англ. Far-Red Light Photoacclimation) ответствен за комплекс изменений при фотосинтетической “акклиматизации” к световому режиму, при котором ДКС преобладает над видимым светом (Gan et al., 2014, 2015; Gan, Bryant, 2015). В процессе фотоакклиматизации индуцируется образование Хл *f* или Хл *f*/Хл *d* и перестраиваются ФС I, ФС II и ФБС (Gan et al., 2014; Gan, Bryant, 2015; Gan et al., 2015). По результатам протеомного анализа, несмотря на переход на качественно новый световой режим, паттерн метаболизма в целом сохраняется. Изменение белкового состава избирательно затрагивает фотосинтетический аппарат: образуются апопротеины Хл *f*-содержащих фотосистем и вместо

“стандартной ФБС” – субъединицы длинноволновой (red-shifted) ФБС (Chen et al., 2019).

По данным в свободном доступе, кластер FaRLiP присутствует у 20 штаммов цианобактерий (Gan et al., 2014, 2015; Trampe, Kühl, 2016; Antonagu et al., 2020). В частности, к ним относятся одноклеточные цианобактерии *Ch. thermalis* PCC 7203 и *Synechococcus* sp. PCC 7335, а также нитчатые цианобактерии *Calothrix* sp. PCC 7507, *Chlorogloeopsis* sp. PCC 9212 и *F. thermalis* PCC 7521.

В кластер FaRLiP входит 21 ген. Это, в первую очередь, гены *rfpA*, *rfpB* и *rfpC*, кодирующие белки двухкомпонентной фосфорелейной системы (Zhao et al., 2015). Продукт гена *rfpA* – фоторецептор RfpA – принадлежит к группе т.н. “knotless” (не имеющих сенсорного PAS-домена) фитохромов. Проводником сигнала служит CheY-подобный белок RfpC, регулятором ответа – белок RfpB, который содержит два CheY-подобных домена, фланкирующих ДНК-связывающий домен. Белок RfpB действует как позитивный регулятор генов кластера FaRLiP (Zhao et al., 2015; Но et al., 2017b). Мутанты *Ch. fritschii* PCC 9212, *Ch. thermalis* PCC 7203 и *Synechococcus* sp. PCC 7335 по генам *rfpA*, *rfpB* и *rfpC* не образуют Хл *f*, тогда как Хл *d* образуется и на белом свете, и на ДКС (Zhao et al., 2015). Регуляторные гены кластера FaRLiP обычно расположены на хромосоме в порядке *rfpB*–*rfpA*–*rfpC* (Gan et al., 2015); исключение составляют новые виды *A. variichlora* (Averina et al., 2021) и *Kovacikia minuta* (Shen et al., 2022), у которых ген *rfpB* обособлен от генов *rfpA* и *rfpC* (рис. 4).

К числу нерегуляторных генов кластера FaRLiP принадлежат паралоги генов субъединиц ФС I – *psaA2/B2/F2/I2/J2/L2*, а также паралоги

генов субъединиц ФС II – *psbA3/A4/B2/C2/D2*. Продукты этих генов связывают не только Хл *a*, но и оба длинноволновых хлорофилла (Gan, Bryant, 2015). По результатам протеомного анализа штамма *Leptolyngbya* sp. JSC-1, каркас РЦ II образуют продукты генов-паралогов – белки PsbA3 и PsbA4 (Gan et al., 2014). Белок PsbA3 содержит полный набор сайтов для лигандирования марганцевого кластера и других фотохимически активных компонентов ФС II (Murray, 2012; Cardona et al., 2015; Gan et al., 2015). По сравнению с ним белок PsbA4 (другое обозначение – srPsbA; сокр. англ. super rogue – “особо резко отличающаяся форма белка PsbA”) настолько модифицирован, что в нем отсутствует сайт для связывания марганцевого кластера (Murray, 2012; Cardona et al., 2015; Gan et al., 2015). Как отмечено, белок PsbA4 дополнительно выполняет функцию Хл *f* синтазы: при гетерологической экспрессии в клетках *Synechococcus* sp. PCC 7002 генов *psbA4 Ch. fritschii* PCC 9212 и *F. thermalis* PCC 7521 начинается синтез Хл *f* (Ho et al., 2016; Shen et al., 2019). Иными словами, адаптированная к ДКС фотосистема с гомодимером белка PsbA4 или гетеродимером белков PsbA4/PsbA1 (D1) не только выполняет роль универсального донора электронов, но и напрямую участвует в одной из реакций конструктивного метаболизма (Shen et al., 2019; Trinugroho et al., 2020).

В кластер FaRLiP также входят паралогии генов *arcA2/B2/D2/D3/E2*, кодирующих аллофиикоцианинные субъединицы кора ФБС (Gan et al., 2014; Zhao et al., 2015). При адаптации к ДКС приостанавливается синтез фикоэритрина и фикоэритроцианина – фикобилипротеинов с зеленым (~550 нм) максимумом поглощения (Gan et al., 2015; Soulier et al., 2020). На белом свете эти пигменты расположены на дистальном конце стержней ФБС; теперь же стержни укорачиваются, обогащаясь ФЦ – рецептором ближнего красного света (~650 нм). В отличие от аллофиикоцианина ArcA1, образующегося на белом свете, аллофиикоцианины ArcA2, ArcD2 и ArcD3 содержат дополнительные остатки Cys, которые не связывают хромофоров и не образуют дисульфидных мостиков (Gan et al., 2015; Herrera-Salgado et al., 2018; Bryant et al., 2020). Поскольку у выращенных на ДКС мутантов *Synechococcus* sp. PCC 7335 по генам *arc* резко уменьшается содержание Хл *d*, дополнительные остатки Cys, видимо, участвуют в образовании этого хлорофилла (Bryant et al., 2020). Продукт еще одного гена-паралога, белок ArcE1 (другое обозначение – LCM; сокр. англ. Linker Core-Membrane) прикрепляет кор ФБС к мембране тилакоида; аминокислотная последовательность его N-концевого участка сходна с аминокислотной последовательностью  $\alpha$ -субъединицы аллофиикоцианина ArcA1. Наконец, хотя белок ArcE2 содержит “карман” для хромофора (а.о.

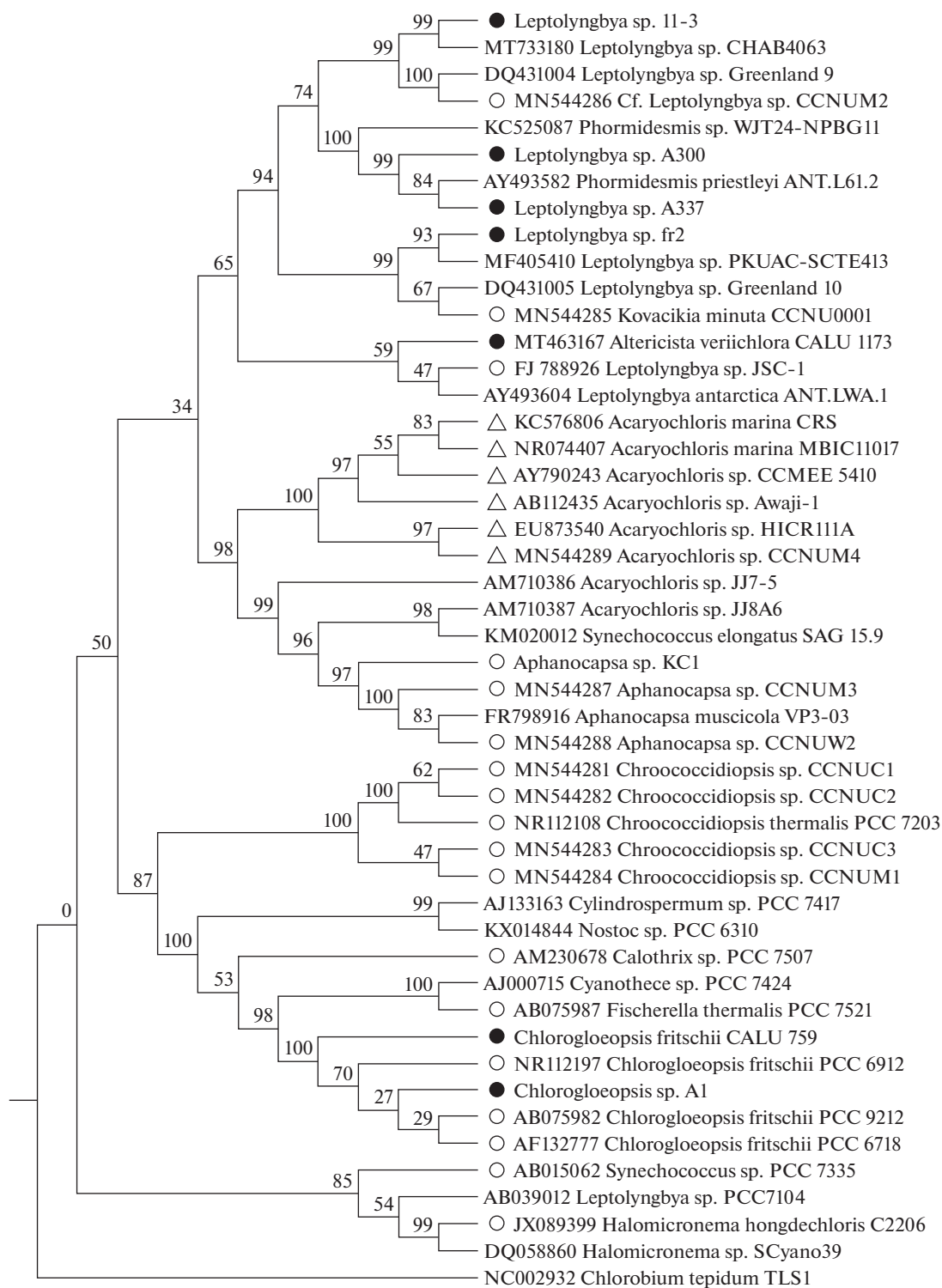
номеров 180–230), фикоцианобилин связывается нековалентно, и максимум поглощения перемещается в длинноволновую область (Gan et al., 2015; Miao et al., 2016; Ho et al., 2017a).

### ЦИАНОБАКТЕРИИ С КОНСТИТУТИВНЫМ ОБРАЗОВАНИЕМ ХЛОРОФИЛЛА *d*

Штамм *A. marina* MBIC 11017, первый из обнаруженных Хл *d*-содержащих организмов, был выделен из колонии асцидий *Lissoclinum patella* в западной части Тихого океана (Miyashita et al., 1996). В данном случае этот тип хлорофилла составлял большинство молекул хлорофилла: на Хл *a* в зависимости от светового режима приходилось только 1–10% (Miyashita et al., 1997; Mimuro et al., 2004; Lin et al., 2013). Штаммы, образующие Хл *d*, также выделены из симбиотических ассоциаций *A. marina* с другими асцидиями – *Diplosoma* spp. (Kühl et al., 2005), *L. fragile* (López-Legentil et al., 2011) и *Cystodytes dellechiaiei* (Martinez-Garcia et al., 2011). Наряду с типовым штаммом MBIC 110017, вид *A. marina* и родственные виды представлены эпифитными, эпизойными и эндозойными штаммами из низких широт Мирового океана: Awaji-1 (Murakami et al., 2004), CCME 5410 (Miller et al., 2005), MBIC 10697 (Swingley et al., 2005), HICR 111A (Mohr et al., 2010), MPGRS1 (Larkum et al., 2012), CRS (Behrendt et al., 2013) и Sball 1 (Lin et al., 2013), а также эпилитными и эндолитными штаммами разного географического происхождения (см. ниже).

#### Морфология и ультраструктура цианобактерий рода *Acaryochloris*

Штаммы *Acaryochloris* spp. совместно кластеризуются на дендрограмме (рис. 5). Их морфологическое разнообразие невысоко: например, в отличие от одиночных клеток типового штамма *A. marina* MBIC 11017 (Miyashita et al., 1996), клетки *Acaryochloris* sp. HICR111A образуют неупорядоченные агрегаты (Mohr et al., 2010). Ультраструктура ламеллярной системы однообразна: в частности, тилакоиды *Acaryochloris* sp. CCME 5410 и *Acaryochloris* sp. MPGRS1 лежат параллельными рядами вдоль цитоплазматической мембраны (Miller et al., 2005; Larkum et al., 2012). Исключением служит вид-кандидат *Candidatus Acaryochloris bahamensis*, у которого зона флуоресценции фикобилипротеинов (при 640–670 нм) не совпадает с зоной флуоресценции Хл *d* (при ~750 нм) (Lopez-Legentil et al., 2011). По-видимому, наблюдаемая анизотропия объясняется неравномерным распределением “мини-ФБС” по ламеллярной системе, что, в свою очередь, может быть следствием векторной ориентации симбионта в теле асцидии *L. fragile*.



**Рис. 5.** Филогенетическое древо цианобактерий, образующих длинноволновые хлорофиллы, основанное на сравнении (методом Maximum Likelihood) последовательностей гена 16S рРНК. В узлах ветвления – достоверность (bootstrap) для 1000 альтернативных деревьев; значения <50% не показаны. Обозначения: белые треугольники – штаммы с конститутивным образованием Хл *d*; белые круги – штаммы с индуцированным образованием Хл *f* или Хл *f*/Хл *d*; черные круги – полученные авторами штаммы с индуцированным образованием Хл *f*/Хл *d* (не опубликованы за исключением *A. veriichlora* CALU 1173; см.: Averina et al., 2021).

*Эколого-географическое разнообразие штаммов Acaryochloris spp.*

Эти цианобактерии приурочены к бедным видимым светом морским местообитаниям и континентальным водоемам. Они образуют биопленки и микробные маты (в том числе, строматолиты) или участвуют в симбиотических ассоциациях с водорослями и беспозвоночными (Murakami et al., 2004; Kühn et al., 2005; Miller et al., 2005; Ohkubo et al., 2006; Mohr et al., 2010; Behrendt et al., 2011; Martinez-Garcia et al., 2011; Li et al., 2013).

**Обитатели коралловых рифов.** По данным метагеномного анализа, штаммы р. *Acaryochloris* часто встречаются в биопленках на коралловых рифах. В таких местообитаниях филоотипы, включающие последовательности 16S рДНК *Acaryochloris* spp., насчитывают 5% цианобактериальных и 1.8% суммы бактериальных последовательностей (Behrendt et al., 2011). Специфической нишей для *Acaryochloris* spp., в частности, для штамма HICR111A, служат останки кораллов на Большом Барьерном рифе, о чем свидетельствуют морфологические, спектроскопические и молекулярно-генетические данные (Mohr et al., 2010; Behrendt et al., 2011, 2013).

**Симбионты асцидий.** Большинство Хл *d*-содержащих симбионтов асцидий принадлежат к числу некультивируемых бактерий (Ohkubo, Miyashita, 2012). По результатам ПЦР с использованием праймеров для амплификации гена 16S рРНК представителей р. *Acaryochloris*, симбионты асцидий *Didemnum* spp., *Lissoclinum patella*, *L. punctatum* и *L. timorense* образуют 14 филоотипов (Ohkubo, Miyashita, 2012). Хл *d*-содержащие симбионты колонизуют асцидий *Diplosoma similis* и *D. virens* скапливаются в базальном отделе тела хозяина (Kühn et al., 2005). Микроколонии цианобактерий с такими же спектральными характеристиками, как у штаммов р. *Acaryochloris*, прикрепляются к тунике средиземноморской асцидии *Cystodytes dellechiaiei* (Martinez-Garcia et al., 2011). Хл *d*-содержащие штаммы размножаются в тунике взрослых асцидий *L. fragile* и личинок, что указывает на вертикальный путь наследования микросимбионта. С учетом <5%-ного сходства последовательностей 16S рДНК этих цианобактерий и *A. marina* MBIC 11017 они отнесены к виду-кандидату *Candidatus Acaryochloris bahamiensis* (López-Legentil et al., 2011).

**Эпифиты.** Хл *d*-содержащие эпифиты обнаружены с помощью спектроскопии и флуоресцентного анализа у морских красных водорослей *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, *Callophyllis japonica* и *Carpopeltis prolifera* (Murakami et al., 2004). По результатам секвенирования 16S рДНК, сходные с *A. marina* штаммы ассоциированы с красными водорослями *Caulacanthus ustulatus*, *Chondria crassicaulis*, *Ch. ocellatus*, *Gloiopeltis furcata* и *Grateloupia lanceolata*, а также с зеленой водорослью *Ulva pertusa* и бурой водорос-

лью *Undaria pinatifida* (Ohkubo et al., 2006). Штамм MPGRS1 выделен в Юго-Восточной Австралии с таллома красной водоросли *Gelidium caulacanthum*, растущей на пневматофоре мангрового дерева *Avicennia marina*. Желтоватая взвесь в воде сильно поглощает видимый свет, что способствует избирательному росту цианобактерий, образующих Хл *d* (Larkum et al., 2012). Отдельный экотип выявлен в субтропических лесах Центрального Китая; наряду со штаммом *Acaryochloris* sp. CCNUM4, в него входят штаммы, имеющие близких родственников среди морских цианобактерий (Zhang et al., 2019). Упомянутые штаммы ассоциированы со мхами на известняковых породах и макрофитами в прудах и ручьях; в таких затененных нишах обычно много ДКС на фоне остаточного белого света. По последним данным, у штаммов *Acaryochloris* sp., выделенных в калифорнийской приливно-отливной зоне с талломов красных водорослей *Chondracanthus* sp. и *Neogastroclonium* sp. и бурой водоросли *Desmarestia* sp., содержание Хл *d* составляет 99% всего хлорофилла (Kiang et al., 2022). По результатам спектрометрического анализа *in situ*, это самый коротковолновый из хлорофиллов, известных у р. *Acaryochloris* (Q-полоса при 704–705 нм).

**Эпилиты и эндолиты.** Штамм ССМЕЕ 5410 выделен из донного микробного мата в умеренно галофильном оз. Солт-Лейк в Южной Калифорнии (Miller et al., 2005). Последовательности 16S рДНК у представителей р. *Acaryochloris* встречаются в ампликонных библиотеках материала с каменного дна водоемов умеренных и высоких широт. По данным метагеномного анализа, цианобактерии, сходные со штаммами р. *Acaryochloris*, участвуют в микробных сообществах на пирамидах Майя (McNamara et al., 2006), на гранитных скалах Антарктиды (de los Rios et al., 2007) и на ископаемых строматолитах Боливийских Анд (Fleming, Prufert-Bebout, 2010).

Эндолиты, близкие штаммам р. *Acaryochloris*, ассоциированы с известковыми кораллиновыми водорослями. Они охарактеризованы с помощью ТаqMan-ПЦР в материале из Красного моря и с Большого Барьерного рифа, а также собранного на морском побережье в Испании и Хорватии; численность этих цианобактерий варьирует от 40 клеток до  $1.51 \times 10^3$  клеток на 1 мг образца (Behrendt et al., 2011, 2014).

### ЦИАНОБАКТЕРИИ С ИНДУЦИРОВАННЫМ ОБРАЗОВАНИЕМ ДЛИННОВОЛНОВЫХ ХЛОРОФИЛЛОВ

Как указано, в отличие от штаммов р. *Acaryochloris*, у которых Хл *d* присутствует конститутивно, некоторые цианобактерии способны индуцированно образовывать либо один Хл *f*, либо Хл *f* одновременно с Хл *d* (штаммы с индуцированным синтезом одного Хл *d* неизвестны).

Такие объекты встречаются в морских и пресноводных местообитаниях (Akutsu et al., 2011; Averina et al., 2018) и термальных источниках (Gan et al., 2014, 2015), на заболоченной почве (Airs et al., 2014; Gan et al., 2015) и в карстовых пещерах (Behrendt et al., 2015). В основном они образуют биопленки и микробные маты, в том числе строматолиты (Chen et al., 2010; Trampe, Kühl, 2016).

#### *Штаммы с индуцированным синтезом хлорофилла f*

Культивируемые представители этой группы немногочисленны. Первый из них, штамм С2206, был выделен из строматолита в австралийском заливе Шарк-Бей (Chen et al., 2010). Клетки размером 0.6–0.8 × 1.0–1.3 мкм (близко к минимуму для цианобактерий; см.: Chisholm et al., 1992) образуют неветвящиеся трихомы с чехлом толщиной 100–200 нм. На белом свете Хл *f* не образуется; в адаптированных к ДКС клетках он составляет 12.5% количества Хл *a*. С помощью полифазного подхода эта цианобактерия описана как новый вид – *H. hongdechloris* (Chen et al., 2012).

Клетки штамма *Aphanocapsa* sp. КС1 из озера Бива (Akutsu et al., 2011), размер которых 1.3–2.0 × 1.3–3.0 мкм, образуют неупорядоченные скопления; при двухнедельном росте на ДКС содержание Хл *f* равно 8% Хл *a* (Miyashita et al., 2014). Образующие Хл *f* штаммы *Aphanocapsa muscicola* VP3-03 и 5N-04, а также штаммы *Acaryochloris* sp. JJ8A6 и JJ7-5, кластеризуются вместе с Хл *d*-содержащими штаммами, однако они не синтезируют этот пигмент (Miyashita et al., 2014). Штаммы, сходные с КС1, выделены из биопленок в австралийских карстовых пещерах Дженолан (Behrendt et al., 2015).

При проведении скрининга во влажных субтропических лесах Центрального Китая были обнаружены образующие Хл *f* одноклеточные цианобактерии из родов *Aphanocapsa* и *Chroococcidiopsis*, а также нитчатые цианобактерии, принадлежащие к двум ранее неизвестным родам сем. *Leptolyngbyaceae* (Zhang et al., 2019).

#### *Штаммы с индуцированным образованием хлорофиллов f и d*

Такие штаммы, в частности, одноклеточные цианобактерии *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 и *Synechococcus* sp. PCC 7335, выделены из образцов почвы около немецкого г. Грайфсвальда и с раковины моллюска в приливно-отливной зоне у мексиканского курортного города Пуэрто-Пеньяско (Gan et al., 2015). Нитчатая цианобактерия *Calothrix* sp. PCC 7507 изолирована из сфагнового болота в окрестностях швейцарского г. Кастаниенбаума (Gan et al., 2015). Два штамма нитчатых цианобактерий р. *Chlorogloeopsis* – *Ch. fritschii*

PCC 6912 и *Chlorogloeopsis* sp. PCC 9212 – выделены из образцов воды на рисовом поле в районе индийского города Аллахабада и из термального источника близ испанского города Оренсе (Airs et al., 2014; Gan et al., 2015). Еще два нитчатых штамма – *Leptolyngbya* sp. JSC-1 и *F. thermalis* PCC 7521 – выделены из плавучего микробного мата в термальном источнике на территории кемпинга Ладьюк и из термального источника в карстовой воронке Мамонт II, оба на территории Йеллоустонского национального парка США (Gan et al., 2014, 2015). Шестой нитчатый штамм, *Leptolyngbya* sp. ССМ<sub>4</sub>, выделен из строматолита около мексиканского г. Куатросьенегас (Gómez-Lojago et al., 2018). Наконец, путем ретроспективного скрининга у штамма *Synechocystis* sp. CALU 1173 из коллекции СПбГУ обнаружена способность к индуцированному образованию Хл *d* и Хл *f*, и на основе полифазного подхода он диагностирован как типовой штамм нового вида *A. variichlora* (Averina et al., 2021).

### ФИЛОГЕНИЯ И ТАКСОНОМИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С ДЛИННОВОЛНОВЫМИ ХЛОРОФИЛЛАМИ

**Филогенетические взаимоотношения штаммов, образующих длинноволновые хлорофиллы.** Штаммы *Acaryochloris* spp. объединяются в компактный филогенетический кластер (рис. 5). Из этого следует, что конститутивный синтез Хл *d* можно рассматривать как позднее эволюционное приобретение (Li, Chen, 2015). Однако высокое сходство с 16S рДНК типового штамма *A. marina* MBIC 11017 не всегда коррелирует со способностью синтезировать Хл *d*. В частности, штамм RCC1774 не образует Хл *d*, но у него имеется Хл *b*; в частности, это позволило в рамках полифазного подхода описать новый вид – *A. thomasi* (Partensky et al., 2018). Штаммы-деструкторы нефти KUAC 3056 и KUAC 3106, выделенные из Персидского залива, также не образуют Хл *d* (Al-Bader et al., 2013). С учетом степени сходства по 16S рДНК с *A. marina* MBIC 11017, эти штаммы можно было бы отнести к новому виду р. *Acaryochloris*.

В отличие от компактно кластеризующихся штаммов с конститутивным образованием Хл *d* (рис. 5), штаммы с индуцированным синтезом длинноволновых хлорофиллов сильно дивергируют (Chen et al., 2012; Airs et al., 2014; Gan et al., 2014; Miyashita et al., 2014; Behrendt et al., 2015; Gan et al., 2015). Соответственно, данную стратегию можно считать более архаичной, хотя и не исключается часто происходивший горизонтальный перенос всего кластера FaRLiP (Gan et al., 2015).

**Хлорофиллы как таксономический признак.** Примеры, когда тип хлорофилла используется как таксономический признак, особенно когда этот признак отражен в номенклатуре, довольно



редки. Хлорофиллам Хл *b* или Хл *b*<sub>2</sub> придавалось центральное значение в диагнозах цианобактерий-прохлорофитов *Prochloron* (Lewin, 1976), *Prochlorothrix* (Burger-Wiersma et al., 1989) и *Prochlorococcus* (Chisholm et al., 1992). Повторяющийся элемент родовых имен “-chloro-” вначале указывал на присутствие хлорофилла *b*, а также на гипотетическую роль предка (элемент “Pro-”) зеленых водорослей *Chlorophyceae* (см.: Lewin, 1976), впоследствии опровергнутую (см.: Пиневиц и соавт., 2010).

Конститутивное образование Хл *d* – признак р. *Acaryochloris*, в котором три вида – типовой *A. marina* (Miyashita et al., 2003), вид-кандидат *Candidatus A. bahamiensis* (Lopez-Legentil et al., 2011) и описанный по правилам Ботанического Кодекса новый вид *A. thomasi* (Partensky et al., 2018). На наш взгляд, родовое имя выбрано неудачно: так можно назвать любую бактерию (“Acaryo-”), обладающую хлорофиллом (“-chloris”).

Цианобактерии с индуцированным образованием длинноволновых хлорофиллов распределены по морфологическим Субсекциям I–V, или условным эквивалентам ботанических порядков, описанным в руководстве Берги (см.: Castenholz, 2015). В частности, вид *H. hongdechloris* принадлежит к Субсекции III. В данном случае видовой эпитет буквально означает “с красным хлорофиллом” (кит. *hong-de* – красного цвета), хотя имеется в виду Хл *f* с максимумом поглощения в ДКС (Chen et al., 2012). Наконец, видовой эпитет цианобактерии *A. variichlora* (Субсекция I) указывает на образование разных (“vari-”) хлорофиллов (“-chlora”), в данном случае – Хл *a*, Хл *f* и Хл *d* (Averina et al., 2021).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи в изучении длинноволновых хлорофиллов и фотосинтетической адаптации цианобактерий к ДКС достигнуты благодаря использованию комплекса современных аналитических методов (особенно биоинформатики) в сочетании с традиционными поисками и описанием ранее неизвестных объектов. Полученные данные дополняют представления о механизмах фототрофии, разнообразии, распространении и экологии фототрофных бактерий. На основе фундаментальных разработок появилась перспектива привлечь дополнительный ресурс световой энергии к технологиям промышленного фотосинтеза. При этом несколько важных задач решены лишь частично: 1) конкретика биосинтеза Хл *d* и Хл *f*; 2) структура реакционных центров и ССК, содержащих эти хлорофиллы; 3) распространение и вариабельность кластера FaRLiP; 4) филогения цианобактерий с длинноволновыми хлорофиллами. Растущий интерес к феномену фотосинтетической адаптации ци-

анобактерий к ДКС служит залогом новых открытий и обобщений.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.Л. Лapidус и А.И. Коробейникова (лаборатория “Центр биоинформатики и алгоритмической биотехнологии СПбГУ”) за содействие в реконструкции кластера FaRLiP у *A. variichlora* CALU 1173, а также ЦКП СПбГУ “Культивирование микроорганизмов”, “Молекулярные и клеточные технологии” и “Хромас” за хранение штаммов и техническую помощь при анализах. Глубокая признательность обоим рецензентам за их комментарии.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-04-00020.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В статье нет данных работ с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пиневиц А.В., Аверина С.Г., Величко Н.В. Очерки биологии прохлорофитов. С.-Петербург: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2010. 198 с.
- Airs R.L., Temperton B., Sambles C., Farnham G., Skill S.C., Llewellyn C.A. Chlorophyll *f* and chlorophyll *d* are produced in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* when cultured under natural light and near-infrared radiation // FEBS Lett. 2014. V. 588. P. 3770–3777.
- Akimoto S., Shinoda T., Chen M., Allakhverdiev S.I., Tomo T. Energy transfer in the chlorophyll *f*-containing cyanobacterium, *Halomicronema hongdechloris*, analyzed by time-resolved fluorescence spectroscopies // Photosynth. Res. 2015. V. 125. P. 115–122.
- Akiyama M., Miyashita H., Kise H., Watanabe T., Mimuro M., Miyachi S., Kobayashi, M. Quest for minor but key chlorophyll molecules in photosynthetic reaction centers – unusual pigment composition in the reaction centers of the chlorophyll *d* dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina* // Photosynth. Res. 2002. V. 74. P. 97–107.
- Akutsu S., Fujinuma D., Furukawa H., Watanabe T., Ohnishi-Kameyama M., Ono S., Ohkubo S., Miyashita H., Kobayashi M. Pigment analysis of a chlorophyll *f*-containing cyanobacterium strain KC1 isolated from Lake Biwa // Photomed. Photobiol. 2011. V. 33. P. 35–40.
- Al-Bader D., Elias M., Rayan R., Radwan S. Subsurface associations of *Acaryochloris*-related picocyanobacteria with oil-utilizing bacteria in the Arabian Gulf water body: promising consortia in oil sediment bioremediation // Microb. Ecol. 2013. V. 65. P. 555–565.

- Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Voloshin R.A., Korol'kova D.V., Tomo T., Shen J.R. Chlorophylls *d* and *f* and their role in primary photosynthetic processes of cyanobacteria // *Biochemistry (Moscow)*. 2016. V. 81. P. 201–212.
- Allen J.F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. V. 1098. P. 275–335.
- Amesz J., Neerken S. Excitation energy trapping in anoxygenic photosynthetic bacteria // *Photosynth. Res.* 2002. V. 73. P. 73–81.
- Antonaru L.A., Cardona T., Larkum A.W.D., Nürnberg D.J. Global distribution of a chlorophyll *f* cyanobacterial marker // *ISME J.* 2020. V. 14. P. 2275–2287. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0670-y>
- Averina S., Polyakova E., Senatskaya E., Pinevich A. A new cyanobacterial genus *Altericista* and three species *Altericista lacusladogae* sp. nov., *Altericista violacea* sp. nov., and *Altericista variichlora* sp. nov., described using a polyphasic approach // *J. Phycol.* 2021. V. 57. P. 1517–1529.
- Averina S.G., Velichko N.V., Pinevich A.A., Senatskaya E.V., Pinevich A.V. 2019. Non-*a* chlorophylls in cyanobacteria // *Photosynthetica*. 2019. V. 57. P. 1109–1118.
- Averina S., Velichko N., Senatskaya E., Pinevich A. Far-red photoadaptations in aquatic cyanobacteria // *Hydrobiologia*. 2018. V. 813. P. 1–17.
- Badshah S.L., Mabkhot Y., Al-Showiman S.S. Photosynthesis at the far-red region of the spectrum in *Acaryochloris marina* // *Badshah and Mabkhot Biol. Res.* 2017. V. 50. Art. 16. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0120-0>
- Bar-Zvi S., Lahav A., Harris D., Niedzwiedzki D.M., Blankenship R.E., Adir N. Structural heterogeneity leads to functional homogeneity in *A. marina* phycocyanin // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2018. V. 1859. P. 544–553.
- Bauer C.E., Bollivar D.W., Suzuki J.Y. Genetic analyses of photopigment biosynthesis in eubacteria: a guiding light for algae and plants // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 3919–3925.
- Behrendt L., Breyer A.S., Schliep M., Sørensen S.J., Larkum A.W.D., Kühl M. Chlorophyll *f*-driven photosynthesis in a cavernous cyanobacterium // *ISME J.* 2015. V. 9. P. 2108–2111.
- Behrendt L., Larkum A.W.D., Norman A., Qvortrup R., Chen M., Ralph P., Sørensen S.J., Trampe E., Kühl M. Endolithic chlorophyll *d*-containing phototrophs // *ISME J.* 2011. V. 5. P. 1072–1076.
- Behrendt L., Nielsen J.L., Sørensen S.J., Larkum A.W.D., Winther J.R., Kühl M. Rapid TaqMan-based quantification of chlorophyll *d*-containing cyanobacteria in the genus *Acaryochloris* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 3244–3249.
- Behrendt L., Staal M., Cristescu S.M., Harren F.J.M., Schliep M., Larkum A.W.D., Kühl M. Reactive oxygen production induced by near-infrared radiation in three strains of the Chl *d*-containing cyanobacterium *Acaryochloris marina* // *F1000Research*. 2013. V. 2. Art. 44. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-44.v.2>
- Blankenship R.E., Chen M. Spectral expansion and antenna reduction can enhance photosynthesis for energy production // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013. V. 17. P. 457–461.
- Bryant D.A., Garcia-Costas A.M., Maresca J.A., Chew A.G.M., Klatt C.G., Bateson M.M., Tallon L.J., Hostetler J., Nelson W.C., Heidelberg J.F., Ward D.W. *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic acidobacterium // *Science*. 2007. V. 317. P. 523–526.
- Bryant D.A., Shen G., Turner G.M., Soulier N., Laremore T.N., Ho M.-Y. Far-red light allophycocyanin subunits play a role in chlorophyll *d* accumulation in far-red light // *Photosynth. Res.* 2020. V. 143. P. 81–95.
- Burger-Wiersma T., Stal L., Mur L.R. *Prochlorothrix hollandica* gen. nov., sp. nov., a filamentous oxygenic phototrophic prokaryote containing chlorophylls *a* and *b*: assignment to *Prochlorothrixaceae* fam. nov. and order *Prochlorothrichales* Florenzano, Balloni, and Materassi 1986, with emendation of the ordinal description // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1989. V. 39. P. 250–257.
- Cardona T., Murray J.W., Rutherford A.W. Origin and evolution of water oxidation before the last common ancestor of the cyanobacteria // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. P. 1310–1328.
- Castenholz R.W. General characteristics of the cyanobacteria // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* / Eds. DeVos P. et al. Hoboken, NJ: Wiley and Sons, Inc., 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00019>
- Chen M., Bibby T.S., Nield J., Larkum A.W.D., Barber J. Iron deficiency induces a chlorophyll *d*-binding Pcb antenna system around photosystem I in *Acaryochloris marina* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005a. V. 1708. P. 367–374.
- Chen M., Bibby T.S., Nield J., Larkum A.W.D., Barber J. Structure of a large photosystem II supercomplex from *Acaryochloris marina* // *FEBS Letters*. 2005b. V. 579. P. 306–310.
- Chen M., Blankenship R.E. Expanding the solar spectrum used by photosynthesis // *Trends Plant Sci.* 2011. V. 16. P. 427–431.
- Chen M., Floetenmeyer M., Bibby T. Supramolecular organization of phycobiliproteins in the chlorophyll *d*-containing cyanobacterium *Acaryochloris marina* // *FEBS Lett.* 2009. V. 583. P. 2535–2539.
- Chen M., Hernandez-Prieto M.A., Loughlin P.C., Li Y., Willows R.D. Genome and proteome of the chlorophyll *f*-producing cyanobacterium *Halomicronema hongdechloris*: adaptive proteomic shifts under different light conditions // *Genomics*. 2019. V. 20. Art. 207. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5587-3>
- Chen M., Hiller R.G., Howe C.J., Larkum A.W.D. Unique origin and lateral transfer of prokaryotic chlorophyll-*b* and chlorophyll-*d* light-harvesting systems // *Mol. Biol. Evol.* 2005c. V. 22. P. 21–28.
- Chen M., Li Y., Birch D., Willows R.D. A cyanobacterium that contains chlorophyll *f*—a red-absorbing photopigment // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. P. 3249–3254.
- Chen M., Schliep M., Willows R.D., Cai Z.L., Neilan B.A., Scheer H. A red-shifted chlorophyll // *Science*. 2010. V. 329. P. 1318–1319.
- Chen M., Telfer A., Lin S., Pascal A., Larkum A.W.D., Barber J., Blankenship R.E. The nature of the photosystem II reaction centre in the chlorophyll *d*-containing prokaryote, *Acaryochloris marina* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005d. V. 4. P. 1060–1064.
- Chen M., Zhang Y., Blankenship R.E. Nomenclature for membrane bound light harvesting complexes of cyanobacteria // *Photosynth. Res.* 2008. V. 95. P. 147–154.
- Cherepanov D.A., Shelaev I.V., Gostev F.E., Aybush A.V., Mamedov M.D., Shen G., Nadochenko V.A., Bryant D.A., Semenov A.Y., Golbeck J.H. Evidence that chlorophyll *f* functions solely as an antenna pigment in far-red-light pho-



- tosystem I from *Fischerella thermalis* PCC 7521 // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2020. V. 1861. Art. 148184. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148184>
- Chisholm S.W., Frankel S.L., Goericke R., Olson J.R., Palenik B., Waterbury J.B., West-Johnsrud L., Zettler E.R. *Prochlorococcus marinus* nov. gen., nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b* // Arch. Microbiol. 1992. V. 157. P. 297–300.
- Deisenhofer J., Michel H., Huber R. The structural basis of photosynthetic light reactions in bacteria // Trends Biochem. Sci. 1985. V. 10. P. 243–248.
- Drews G., Niederman R.A. Membrane biogenesis in anoxygenic photosynthetic prokaryotes // Photosynth. Res. 2002. V. 73. P. 87–94.
- Fleming E.D., Prufert-Bebout L. Characterization of cyanobacterial communities from high-elevation lakes in the Bolivian Andes // J. Geophys. Res. 2010. V. 115. Art. 00D07. <https://doi.org/10.1029/2008JG000817>
- French C.S. The chlorophyll *in vivo* and *in vitro* // Encyclopedia of Plant Physiology / Ed. Ruhland W. Berlin: Springer-Verlag. 1960. V. 5. Pt. 1. P. 252–297.
- Friedrich T., Schmitt E.J. Red-shifted and red chlorophylls in photosystems: entropy as a driving force for uphill energy transfer // Photosynthesis: Molecular Approaches to Solar Energy Conversion. Advances in Photosynthesis and Respiration / Eds. Shen J.R. et al. Cham: Springer. 2021. V. 47. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-67407-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-67407-6_9)
- Fukusumi T., Matsuda K., Mizoguchi T., Miyatake T., Ito S., Ikeda T., Tamiaki H., Oba T. Non-enzymatic conversion of chlorophyll-*a* into chlorophyll-*d in vitro*: a model oxidation pathway for chlorophyll-*d* biosynthesis // FEBS Lett. 2012. V. 586. P. 2338–2341.
- Gan F., Bryant D.A. Adaptive and acclimative responses of cyanobacteria to far-red light // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. P. 3450–3465.
- Gan F., Shen G., Bryant D. Occurrence of far-red light photoacclimation (FaRLiP) in diverse cyanobacteria // Life (Basel). 2015. V. 5. P. 4–24.
- Gan F., Zhang S., Rockwell N.C., Martin S.S., Lagarias J.C., Bryant D.A. Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light // Science. 2014. V. 345. P. 1312–1317.
- Gisriel C.J., Cardona T., Bryant D.A., Brudvig C.W. Molecular evolution of far-red light-acclimated photosystem II // Microorganisms. 2022. V. 10. Art. 1270. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071270>
- Gisriel C.J., Shen G., Ho M.-Y., Kurashov V., Flesher D.A., Wang J., Armstrong W.H., Golbeck J.H., Gunner M.R., Vinyard D.J., Debus R.J., Brudvig G.W., Bryant D.A. Structure of a monomeric photosystem II core complex from a cyanobacterium acclimated to far-red-light reveals the functions of chlorophylls *d* and *f* // J. Biol. Chem. 2021. V. 298. Art. 101424. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101424>
- Gisriel C., Shen G., Kurashov V., Ho M.-Y., Zhang S., Williams D., Golbeck J.H., Fromme P., Bryant D.A. The structure of Photosystem I acclimated to far-red light illuminates an ecologically important acclimation process in photosynthesis // Sci. Adv. 2020. V. 6. Art. aay6415. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay6415>
- Glazer A.N., Bryant D.A. Allophycocyanin B ( $\lambda_{\max}$  671, 618 nm) – a new cyanobacterial phycobiliprotein // Arch. Mikrobiol. 1975. V. 104. P. 15–22.
- Gómez-Lojero C., Leyva-Castillo L.E., Herrera-Salgado P., Barrera-Rojas J., Ríos-Castro E., Gutiérrez-Cirlos E.B. *Lep- tolyngbya* CCM 4, a cyanobacterium with far-red photoacclimation from Cuatro Ciénegas Basin, México // Photosynthetica. 2018. V. 56. P. 342–353.
- Gorka M., Baldansuren A., Malnati A., Gruszecki E., Golbeck J.H., Lakshmi K.V. Shedding light on primary donors in photosynthetic reaction centers // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 735666. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735666>
- Grossman A.R., Schaefer M.R., Chiang G.G., Collier J.L. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions // Microbiol. Rev. 1993. V. 57. P. 725–749.
- Hamaguchi T., Kawakami K., Shinzawa-Itoh K., Inoue-Kasino N., Itoh S., Ifuku K., Yamashita E., Maeda K., Yonekura K., Kasino Y. Structure of the far-red light utilizing photosystem I of *Acaryochloris marina* // Nat. Commun. 2021. V. 12. Art. 2333. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22502-8>
- Hastings H., Makita H., Agarwala N., Rohani L., Shen G., Bryant D.A. Fourier transform visible and infrared difference spectroscopy for the study of P700 in photosystem I from *Fischerella thermalis* PCC 7521 cells grown under white light and far-red light: Evidence that the A–1 cofactor is chlorophyll *f* // Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg. 2019. V. 1860. P. 452–460.
- Herrera-Salgado P., Leyva-Castillo L.E., Ríos-Castro E., Gómez-Lojero C. Complementary chromatic and far-red photoacclimations in *Synechococcus* ATCC 29403 (PCC 7335). I: The phycobilisomes, a proteomic approach // Photosynth. Res. 2018. V. 138. P. 39–56.
- Ho M.-Y., Bryant D.A. Global transcriptional profiling of the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 in far-red light: insights into the regulation of chlorophyll *d* synthesis // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00465>
- Ho M.-Y., Gan F., Shen G., Bryant D.A. Far-red light photoacclimation (FaRLiP) in *Synechococcus* sp. PCC 7335. II. Characterization of phycobiliproteins produced during acclimation to far-red light // Photosynth. Res. 2017a. V. 131. P. 187–202.
- Ho M.-Y., Gan F., Shen G., Zhao C., Bryant D.A. Far-red light photoacclimation (FaRLiP) in *Synechococcus* sp. PCC 7335. I. Regulation of FaRLiP gene expression // Photosynth. Res. 2017b. V. 131. P. 173–186.
- Ho M.-Y., Shen G., Canniffe D.P., Zhao C., Bryant D.A. Light-dependent chlorophyll *f* synthesis is a highly divergent paralog of PsbA of photosystem II // Science. 2016. V. 353. Art. aaf9178. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9178>
- Holt A.S. Further evidence of the relation between 2-desvinyl-2-formyl-chlorophyll *a* and *d* // Can. J. Bot. 1961. V. 39. P. 327–331.
- Hu Q., Marquardt J., Iwasaki I., Miyashita H., Kurano N., Mörschel E., Miyachi S. Molecular structure, localization and function of biliproteins in the chlorophyll *a/d* containing oxygenic photosynthetic prokaryote *Acaryochloris marina* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1412. P. 250–261.
- Hu Q., Miyashita H., Iwasaki I., Kurano N., Miyachi S., Iwaki M., Itoh S. A photosystem I reaction center driven by chlorophyll *d* in oxygenic photosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13319–13323.

- Hunter C.N., van Grondelle R., Olsen J.D. Photosynthetic antenna proteins: 100 ps before photochemistry starts // Trends Biochem. Sci. 1989. V. 14. P. 72–76.
- Itoh S., Mino H., Itoh K., Shigenaga T., Uzumaki T., Iwaki M. Function of chlorophyll *d* in reaction centers of photosystems I and II of the oxygenic photosynthesis of *Acaryochloris marina* // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 12473–12481.
- Itoh S., Ohno T., Noji T., Yamakawa H., Komatsu H., Wada K., Kobayashi M., Miyashita Y. Harvesting far-red light by chlorophyll *f* in photosystems I and II of unicellular cyanobacterium strain KC1 // Plant Cell Physiol. 2015. V. 56. P. 2024–2034.
- Judd M., Mortona J., Nürnberg D., Fantuzzi A., Rutherford A.W., Purchase R., Cox N., Krausz E. The primary donor of far-red photosystem II: ChlD1 or PD2? // Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg. 2020. V. 1861. Art. 1482. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148248>
- Kashiyama Y., Miyashita H., Ohkubo S., Ogawa N.O., Chikaraishi Y., Takano Y., Suga H., Toyofuku T., Nomaki H., Kitazato H., Nagata T., Ohkouchi K. Evidence for global chlorophyll *d* // Science. 2008. V. 321. P. 658.
- Kiang N.Y., Swingley W.D., Gautam D., Broddrick J.T., Repeta D.J., Stolz J.F., Blankenship R.E., Wolf B.M., Detweiler A.M., Miller K.A., Schladweiler J.J., Lindeman R., Parienteau M.N. Discovery of chlorophyll *d*: isolation and characterization of a far-red cyanobacterium from the original site of Manning and Strain (1943) at Moss Beach, California // Microorganisms. 2022. V. 10. Art. 819. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040819>
- Kimura A., Kitoh-Nishioka H., Aota T., Hamaguchi T., Yonekura K., Kawakami K., Shinzawa-Itoh K., Inoue-Kasino N., Ifuku K., Yamasita E., Kasino Y., Itoh S. Theoretical model of the far-red-light-adapted photosystem I reaction center of cyanobacterium *Acaryochloris marina* using chlorophyll *d* and the effect of chlorophyll exchange // J. Phys. Chem. 2022. V. 126. P. 4009–4021.
- Kirk J.T.O. Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems, 2nd ed. Cambridge e.a.: Cambridge Univ. Press, 1994. 509 p.
- Koizumi H., Itoh Y., Hosoda S., Akiyama M., Hoshino T., Shiraiwa Y., Kobayashi M. Serendipitous discovery of Chl *d* formation from Chl *a* with papain // Sci. Technol. Adv. Mater. 2005. V. 6. P. 551–557.
- Kühl M., Chen M., Ralph P.J., Schreiber U., Larkum A.W.D. A niche for cyanobacteria containing chlorophyll *d* // Nature. 2005. V. 433. P. 820.
- Larkum A.W.D., Chen M., Li Y., Schliep M., Trampe E., West J., Salih A., Kühl M. A novel epiphytic chlorophyll *d*-containing cyanobacterium isolated from mangrove-associated red alga // J. Phycol. 2012. V. 48. P. 1320–1327.
- Larkum A.W.D., Ritchie R.J., Raven J.A. Living off the Sun: chlorophylls, bacteriochlorophylls and rhodopsins // Photosynthetica. 2018. V. 56. P. 11–43.
- La Roche J., van der Staay G.W.M., Partensky F., Ducret A., Aebersold R., Li R., Golden S.S., Hiller R.G., Wrench P.M., Larkum A.W.D., Green B.R. Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll *a/b* light-harvesting proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 15244–15248.
- Lewin R.A. Prochlorophyta as a proposed new division of algae // Nature. 1976. V. 261. P. 697–698.
- Li Y., Chen M. Novel chlorophylls and new directions in photosynthesis research // Funct. Plant Biol. 2015. V. 42. P. 493–501.
- Li Y., Larkum A., Schliep M., Kühl M., Neilan B., Chen M. Newly isolated Chl *d*-containing cyanobacteria // Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future. Proc. 15th Int. Conf. on Photosynthesis / Eds. Kuang T., Lu C., Zhang L. Springer Science + Business Media B.V., 2013. P. 686–690.
- Li Y., Lin Y., Garvey C.J., Birch D., Corkery R.W., Loughlin P.C., Scheer H., Willows R.D., Chen M. Characterization of red-shifted phycobilisomes isolated from the chlorophyll *f*-containing cyanobacterium *Halomicronema hongdechloris* // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1857. P. 107–114.
- Lin Y., Crossett B., Chen M. Effects of anaerobic conditions on photosynthetic units of *Acaryochloris marina* // Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future: 15th Int. Conf. on Photosynthesis / Eds. Kuang T., Lu C., Zhang L. Springer Science + Business Media B.V., 2013. P. 121–124.
- López-Legentil S., Song B., Bosch M., Pawlik J.R., Turon X. Cyanobacterial diversity and a new *Acaryochloris*-like symbiont from Bahamian sea-squirrels // PLoS One. 2011. V. 6. Art. e23938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023938>
- Loughlin P., Lin Y., Chen M. Chlorophyll *d* and *Acaryochloris marina*: current status // Photosynth. Res. 2013. V. 116. P. 277–293.
- MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes // J. Struct. Biol. 1998. V. 124. P. 311–334.
- Manning W.M., Strain H.H. Chlorophyll *d*, a green pigment of red algae // J. Biol. Chem. 1943. V. 151. P. 1–19.
- Martinez-Garcia M., Koblizek M., Lopez-Legentil S., Anton J. Epibiosis of oxygenic phototrophs containing chlorophylls *a*, *b*, *c* and *d* on the colonial ascidian *Cystodytes dellechiaiei* // Microb. Ecol. 2011. V. 61. P. 13–19.
- Mascoli V., Bhatti A.F., Bersanini L., van Amerongen H., Croce R. The antenna of far-red absorbing cyanobacteria increases both absorption and quantum efficiency of Photosystem II // Nat. Commun. 2022. V. 13. Art. 3562. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31099-5>
- McNamara C.J., Perry-VI T.D., Bearce K.A., Hernandez-Duque G., Mitchell R. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Mayan archaeological site // Microb. Ecol. 2006. V. 51. P. 51–64.
- Miao D., Ding W.-L., Zhao B.-Q., Lu L., Xu Q.-Z., Scheer H., Zhao K.-H. Adapting photosynthesis to the near-infrared: non-covalent binding of phycocyanobilin provides an extreme spectral red-shift to phycobilisome core-membrane linker from *Synechococcus* sp. PCC 7335 // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1857. P. 688–694.
- Miller S.R., Augustine S., Olson T.L., Blankenship R.E., Selker J., Wood A.M. Discovery of a free-living chlorophyll *d*-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial cyanobacterial small-subunit rRNA gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 850–855.
- Miller S.R., Wood A.M., Blankenship R.E., Kim M.N., Ferrera S. Dynamics of gene duplication in the genomes of chlorophyll *d*-producing cyanobacteria: implications for the ecological niche // Genome Biol. Evol. 2011. V. 3. P. 601–613. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr060>
- Mimuro M., Akimoto S., Gotoh T., Yokono M., Akiyama M., Tsuchiya T., Miyashita H., Kobayashi M., Yamazaki I. Iden-

- tification of the primary electron donor in PS II of the Chl *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina* // FEBS Lett. 2004. V. 556. P. 95–98.
- Mimuro M., Akimoto S., Yamazaki I., Miyashita H., Miyachi S. Fluorescence properties of chlorophyll *d*-dominating prokaryotic alga, *Acaryochloris marina*: studies using time-resolved fluorescence spectroscopy on intact cells // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1412. P. 37–46.
- Mimuro M., Hirayama K., Uezono K., Miyashita H., Miyachi S. Uphill energy transfer in a chlorophyll *d*-dominating oxygenic photosynthetic prokaryote, *Acaryochloris marina* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1456. P. 27–34.
- Miyashita H., Adachi K., Kurano N., Ikemoto H., Chihara M., Miyachi S. Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll *d* as the major chlorophyll // Plant Cell Physiol. 1997. V. 38. P. 274–281.
- Miyashita H., Ikemoto H., Kurano N., Adachi K., Chihara M., Miyachi S. Chlorophyll *d* as a major pigment // Nature. 1996. V. 383. P. 402.
- Miyashita H., Ikemoto H., Kurano N., Miyachi S., Chihara M. *Acaryochloris marina* gen. et sp. nov. (Cyanobacteria), an oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll *d* as a major pigment // J. Phycol. 2003. V. 39. P. 1247–1253.
- Miyashita H., Ohkubo S., Komatsu H., Sorimachi Y., Fukayama D., Fujinuma D., Akitsu S., Kobayashi M. Discovery of chlorophyll *d* in *Acaryochloris marina* and chlorophyll *f* in a unicellular cyanobacterium, strain KC1, isolated from Lake Biwa // J. Phys. Chem. Biophys. 2014. V. 4. Art. 149. <https://doi.org/10.4172/2161-0348.1000149>
- Mohr R., Voß B., Schliep M., Kurz T., Maldener I., Adams D.G., Larkum A.W.D., Chen M., Hess W.R. A new chlorophyll *d*-containing cyanobacterium: evidence for niche adaptation in the genus *Acaryochloris* // ISME J. 2010. V. 4. P. 1456–1469.
- Murakami A., Miyashita H., Iseki M., Adachi K., Mimuro M. Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae // Science. 2004. V. 303. P. 1633.
- Murray J.W. Sequence variation at the oxygen evolving centre of photosystem II: a new class of 'rogue' cyanobacterial D1 proteins // Photosynth. Res. 2012. V. 110. P. 177–184.
- Neerken S., Amesz J. The antenna reaction center complex of heliobacteria: composition, energy conversion and electron transfer // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1507. P. 278–290.
- Niedzwiedzki D.M., Bar-Zvi S., Blankenship R.E., Adir N. Mapping the excitation energy migration pathways in phycobilisomes from the cyanobacterium *Acaryochloris marina* // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2019. V. 1860. P. 286–296.
- Niedzwiedzki D.M., Liu H., Chen M., Blankenship R.E. Excited state properties of chlorophyll *f* in organic solvents at ambient and cryogenic temperatures // Photosynth. Res. 2014. V. 121. P. 25–34.
- Nürnberg D.J., Morton J., Santabarbara S., Telfer A., Joliot P., Antonaru L., Ruban A., Cardona T., Krausz F., Bousac A., Fantuzzi A., Rutherford A.W. Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll *f*-containing photosystems // Science. 2018. V. 360. P. 1210–1213.
- Ohkubo S., Miyashita H. Selective detection and phylogenetic diversity of *Acaryochloris* spp. that exist in association with didemnid ascidians and sponge // Microb. Environ. 2012. V. 27. P. 217–225.
- Ohkubo S., Miyashita Y., Murakami A., Takeyama H., Tsuchiya T., Mimuro M. Molecular detection of epiphytic *Acaryochloris* spp. on marine macroalgae // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 7912–7915.
- Partensky F., Six C., Ratin M., Garczarek L., Vaultot D., Probert I., Calteu A., Gourvil P., Marie D., Grébert T., Bouchier C., Le Panse S., Gachenot M., Rodriguez F., Garrido J.L. A novel species of the marine cyanobacterium *Acaryochloris* with a unique pigment content and lifestyle // Sci. Rep. 2018. V. 8. Art. 9142. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27542-7>
- Pinevich A., Averina S. New life for old discovery: amazing story about how bacterial predation on *Chlorella* resolved a paradox of dark cyanobacteria and gave the key to early history of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration // Protistology. 2021. V. 15. P. 107–126.
- Renger T., Schlodder E. The primary electron donor of Photosystem II of the cyanobacterium *Acaryochloris marina* is a chlorophyll *d* and the water oxidation is driven by a chlorophyll *a*/chlorophyll *d* heterodimer // J. Phys. Chem. 2008. V. 112. P. 7351–7354.
- de los Rios A., Grube M., Sancho L.G., Ascaso C. Ultrastructural and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing Antarctic granite rocks // FEMS Microb. Ecol. 2007. V. 59. P. 386–395.
- Sawicki A., Chen M. Molecular mechanism of photosynthesis driven by red-shifted chlorophylls // Microbial Photosynthesis / Eds. Wang Q. et al. Singapore: Springer, 2020. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3110-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3110-1_1)
- Schiller H., Senger H., Miyashita H., Miyachi S., Dau H. Light-harvesting in *Acaryochloris marina* – spectroscopic characterization of a chlorophyll *d*-dominated photosynthetic antenna system // FEBS Lett. 1997. V. 30. P. 433–436.
- Schliep M., Chen M., Larkum A., Quinell R. The function of MgDVP in a chlorophyll *d*-containing organism // Photosynthesis. Energy from the Sun / Eds. Allen J.F. et al. Dordrecht: Springer, 2008. P. 1125–1128.
- Schliep M., Crossett B., Willows R.D., Chen M. <sup>18</sup>O labeling of chlorophyll *d* in *Acaryochloris marina* reveals that chlorophyll *a* and molecular oxygen are precursors // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 28450–28456.
- Schmitt F.-J., Campbell Z.Y., Bui M.V., Hüls A., Tomo T., Chen M., Maksimov E.G., Allakhverdiev S.I., Friedrich T. Photosynthesis supported by a chlorophyll *f*-dependent, entropy-driven uphill energy transfer in *Halomicronema hongdechloris* cells adapted to far-red light // Photosynth. Res. 2019. V. 139. P. 185–201.
- Shen G., Canniffe D.P., Ho M.Y., Kurashov V., van der Est A., Golbeck J.Y., Bryant D.A. Characterization of chlorophyll *f* synthase heterologously produced in *Synechococcus* sp. PCC 7002 // Photosynth. Res. 2019. V. 140. P. 77–92.
- Shen L.-Q., Zhang Z.-C., Shang J.-L., Li Z.-K., Chen M., Li R., Qiu B.-S. *Kovackia minuta* sp. nov. (Leptolyngbyaceae, Cyanobacteria), a new freshwater chlorophyll *f*-producing cyanobacterium // J. Phycol. 2022. Accepted. <https://doi.org/10.1111/jpy.13248>
- Soulier N., Laremore T.N., Bryant D.A. Characterization of cyanobacterial allophycocyanins absorbing far-red light // Photosynth. Res. 2020. V. 145. P. 189–207.
- Swingley W.D., Chen M., Cheung P.C., Conrad A.L., Dejesa L.C., Hao J., Honchak B.M., Karbach L.E., Kurdoglu A., Lahiri S., Mastrian S.D., Miyashita H., Page L., Ramakrishna P., Sato S., Sattley W.M., Shimada Y., Taylor H.L., Tomo T., Tsuchiya T., Wang Z.T., Raymond J., Mimuro M., Blankenship R.E., Touchman J.W. Niche adaptation and genome ex-

- pansion in the chlorophyll *d* producing cyanobacterium *Acaryochloris marina* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 2005–2010.
- Swingley W.D., Hohmann-Marriott M.F., Olson T.L., Blankenship R.E. Effect of iron on growth and ultrastructure of *Acaryochloris marina* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 8606–8610.
- Tomo T., Kato Y., Suzuki T., Akimoto S., Okubo T., Noguchi T., Hasegawa K., Tsuchiya T., Tanaka K., Fukuya M., Dohmae N., Watanabe T., Mimuro M. Characterization of highly purified photosystem I complexes from the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC 11017 // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 18198–18209.
- Tomo T., Okubo T., Akimoto S., Yokono M., Miyashita H., Tsuchiya T., Noguchi T., Mimuro M. Identification of the special pair of photosystem II in a chlorophyll *d* dominated cyanobacterium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 7283–7288.
- Tomo T., Shinoda T., Chen M., Allakhverdiev S.I., Akimoto S. Energy transfer processes in chlorophyll *f*-containing cyanobacteria using time-resolved fluorescence spectroscopy on intact cells // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1837. P. 1484–1489.
- Trampe E., Kühl M. Chlorophyll *f* distribution and dynamics in cyanobacterial beachrock biofilms // J. Phycol. 2016. V. 52. P. 990–996.
- Trinugroho J.P., Bečková M., Shao S., Yu J., Zhao Z., Murray J.W., Sobotka R., Komenda J., Nixon P.J. Chlorophyll *f* synthesis by a super-rogue photosystem II complex // Nat. Plants. 2020. V. 6. P. 238–244.
- Tsuzuki Y., Tsukatani Y., Yamakawa H., Itoh S., Fujita Y., Yamamoto H. Effects of light and oxygen on chlorophyll *d* biosynthesis in a marine cyanobacterium *Acaryochloris marina* // Plants. 2022. V. 11. Art. 915. <https://doi.org/10.3390/plants11070915>
- Ulrich N.J., Uchida H., Kanesaki Y., Hirose E., Murakami A., Miller S.R. Reacquisition of light-harvesting genes in a marine cyanobacterium confers a broader solar niche // Curr. Biol. 2021. V. 31. P. 1539–1546.
- Wood A.M. *Acaryochloris* – explaining the riddle of chlorophyll *d* in red algae and expanding PAR for oxygenic photosynthesis // J. Phycol. V. 48. P. 1317–1319.
- Xu C., Zhu Q., Chen J.-H., Shen L., Yi X., Huang Z., Wang W., Chen M., Kuang T., Shen J.-R., Zhang X., Han G. A unique photosystem I reaction center from a chlorophyll *d*-containing cyanobacterium *Acaryochloris marina* // J. Integr. Plant Biol. 2021. V. 63. P. 1740–1752. <https://doi.org/10.1111/jipb.13113>
- Yoneda A., Wittmann B.J., King J.D., Blankenship R.E., Dantas G. Transcriptomic analysis illuminates genes involved in chlorophyll synthesis after nitrogen starvation in *Acaryochloris* sp. CCMEE 5410 // Photosynth. Res. 2016. V. 129. P. 171–182.
- Zhang Z.-C., Li Z.-K., Yin Y.-C., Li Y., Jia Y., Chen M., Qiu B.-S. Widespread occurrence and unexpected diversity of red-shifted chlorophyll-producing cyanobacteria in humid subtropical forest ecosystems // Environ. Microbiol. 2019. V. 21. P. 1497–1510. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14582>
- Zhao C., Gan F., Shen G., Bryant D.A. RfpA, RfpB, and RfpC are the master control elements of far-red light photoacclimation (FaRLiP) // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1303. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01303>

## On the Edge of the Rainbow: Red-Shifted Chlorophylls and Far-Red Light Photoadaptation in Cyanobacteria

A. V. Pinevich<sup>1</sup>, \* and S. G. Averina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saint Petersburg State University, St.-Petersburg, Russia

\*e-mail: Pinevich.A@mail.ru

Received May 25, 2022; Revised July 11, 2022; Accepted July 12, 2022

**Abstract**—The phenomenon of photosynthetic adaptation of cyanobacteria to far-red light (FRL; 700–750 nm) is closely related to such basic themes as: phototrophy, microbial ecology, and diversity of bacteria. In applied terms, this bioenergetic strategy is essential for biotechnology of photosynthesis, with a perspective of getting access to an additional light energy resource. The majority of cyanobacteria is known to use 400–700 nm wavelength light, excited state being channeled from the light-harvesting complex to reaction centers of two photosystems containing chlorophyll *a* (Chl *a*) with the red maxima of ~700 nm. After isolation of first strains producing chlorophylls *d* and *f* it appeared that cyanobacteria can also use FRL. A significant amount of data has currently been obtained concerning the cyanobacteria which constitutively produce Chl *d*, as well as of those which produce Chl *f* or Chl *f*/Chl *d* during FRL photoacclimation (FaRLiP). Incorporating these pigments into photosynthetic apparatus, particularly with the use of FaRLiP mechanism augments the adaptation potential of cyanobacteria and expands their distribution span. The review provides the evidence on: photosynthetic apparatuses containing Chl *d* or Chl *d*/Chl *f*; the FaRLiP gene cluster; phylogeny of cyanobacteria constitutively or inducibly producing red-shifted chlorophylls; the use of chlorophylls in chemotaxonomy and the application of this character in cyanobacterial nomenclature.

**Keywords:** far-red light, FaRLiP gene cluster, reaction center, light-harvesting complex, phycobilisome, photoadaptation, photosynthetic apparatus, chlorophyll *d*, chlorophyll *f*, cyanobacteria

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИАЦИДОБАКТЕРИИ В НИЗИННЫХ БОЛОТАХ: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ  
РАЗНООБРАЗИЕ И АНАЛИЗ ГЕНОМОВ КЛЮЧЕВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ© 2022 г. С. Н. Дедыш<sup>а</sup>, А. А. Иванова<sup>а</sup>, Ш. А. Бегматов<sup>б</sup>, А. В. Белецкий<sup>б</sup>, А. Л. Ракитин<sup>б</sup>,  
А. В. Марданов<sup>б</sup>, Д. А. Филиппов<sup>с</sup>, Н. В. Равин<sup>б, \*</sup><sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 199071 Россия<sup>б</sup>Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 199071 Россия<sup>с</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, 152742 Россия

\*e-mail: nravin@mail.ru

Поступила в редакцию 31.05.2022 г.

После доработки 07.06.2022 г.

Принята к публикации 09.06.2022 г.

Бактерии филума *Acidobacteriota* являются одной из основных групп прокариот в почвах и торфяниках. Особенно многочисленны ацидобактерии в кислых верховых болотах, где доминируют представители хорошо изученного класса *Acidobacteriia*. Разнообразие и метаболический потенциал ацидобактерий, населяющих низинные болота с нейтральным pH, исследованы меньше. Мы провели сравнительный анализ состава сообществ ацидобактерий в четырех верховых и шести низинных болотах Вологодской области. Фрагменты последовательностей генов 16S рРНК ацидобактерий составляли 30–42 и 7–22% всех прочтений, полученных из образцов торфа верховых и низинных болот, соответственно. Ацидобактерии верховых болот были представлены порядками *Acidobacteriales* и *Bryobacteriales* класса *Acidobacteriia*, тогда как в торфе низинных болот преобладали классы *Vicinamibacteria* и *Blastocatellia*. Из метагеномов торфа низинных болот были собраны геномы четырех представителей *Blastocatellia* (семейство *Pyrimonadaceae*, 2 генома), *Vicinamibacteria* (семейство UBA2999) и *Thermoanaerobaculia* (порядок UBA5066). Анализ геномов выявил у всех четырех микроорганизмов ключевые пути аэробного гетеротрофного метаболизма, в том числе Эмбдена–Мейергофа и глюконеогенеза, неокислительный этап пентозофосфатного пути, цикл трикарбоновых кислот, а также электрон-транспортную цепь аэробного дыхания, включающую терминальные цитохром *c*-оксидазы. Все геномы кодируют молибдоптериновые оксидоредуктазы CISM семейства и мультигеновые цитохромы *c*, что указывает на возможность диссимиляционного восстановления соединений серы и Fe(III) в анаэробных условиях. Вероятными субстратами для роста могут являться аминокислоты, пептиды и жирные кислоты. Представители *Pyrimonadaceae* также могут использовать углеводы, включая полисахариды и, вероятно, участвуют в деструкции различных биополимеров в торфяных болотах. Представители *Thermoanaerobaculia* и *Vicinamibacteria* не имеют генов секретируемых гликозил-гидролаз и могут использовать ограниченный спектр простых сахаров. Геном представителя *Vicinamibacteria* содержал набор генов, кодирующих ранее не описанные у ацидобактерий бактериальные микрокомпарменты (метабоლოსомы), вероятно, участвующие в метаболизме L-рамнозы.

**Ключевые слова:** *Acidobacteriota*, низинные болота, верховые болота, *Vicinamibacteria*, *Blastocatellia*, *Thermoanaerobaculia*, метагеномный анализ, геном

**DOI:** 10.31857/S0026365622600511

Представители филума *Acidobacteria*, недавно переименованного в филум *Acidobacteriota* (Oren, Garrity, 2021) составляют одну из численно доминирующих групп бактерий в почвах и торфяниках (Ludwig et al., 1997; Janssen, 2006; Jones et al., 2009; Lauber et al., 2009; Kielak et al., 2016; Dedysh, Oren, 2020; Ivanova et al., 2020a, 2020b). По данным молекулярного профилирования состава микробных сообществ почв по генам 16S рРНК, доля ацидобактерий обычно составляет от 5 до 50% всего пула прочтений ПЦР-фрагментов этих генов (Janssen, 2006; Lee et al., 2008; Lauber et al.,

2009; Foessel et al., 2014). Знания о функциональной роли ацидобактерий в почвенных экосистемах включают сведения о деструкции различных биополимеров и участии в глобальных циклах углерода, железа и водорода (Kielak et al., 2016; Eichorst et al., 2018), однако этот перечень далеко не полон, так как спектр культивируемых ацидобактерий остается ограниченным. Известное разнообразие ацидобактерий составляет 26 филогенетических подгрупп (Barns et al., 2007), которые относятся к 15 классам (Dedysh, Yilmaz, 2018). Лишь пять из этих классов – *Acidobacteriia*, *Blasto-*

*catellia*, *Holophagae*, *Vicinamibacteria* и *Thermoanaerobaculia* — содержат таксономически охарактеризованных представителей (Dedysh, Yilmaz, 2018). Подавляющее большинство полученных в культурах и охарактеризованных ацидобактерий принадлежат к классу *Acidobacteriia*, который объединяет ацидофильных и ацидотолерантных, аэробных и анаэробных хемоорганотрофов, использующих широкий спектр моно-, ди- и полисахаридов, обладающих гидролитическим потенциалом и населяющих преимущественно кислые наземные местообитания (Dedysh, Oren, 2020).

Болота являются одной из экосистем, обильно колонизованных ацидобактериями. Их доля в составе микробных сообществ особенно высока в кислых верховых болотах (Dedysh et al., 2006; Dedysh, 2011; Ivanova et al., 2020a), а доминирующие популяции представлены ацидобактериями порядков *Acidobacteriales* и *Bryobacterales* (Ivanova et al., 2020a). Пул охарактеризованных представителей этих порядков довольно велик. Он включает бактерии родов *Granulicella* (Pankratov, Dedysh, 2010), способных к деструкции ряда полисахаридов растительного происхождения, представителей рода *Bryobacter*, утилизирующих специфические продукты разложения фитомассы сфагновых мхов (Kulichevskaya et al., 2010), целлюлолитических и хитинолитических ацидобактерий родов *Telmatobacter* (Pankratov et al., 2012) и *Acidisarcina* (Belova et al., 2018) соответственно, а также ряда других родов этих порядков. В противоположность верховым болотам, состав и функциональный потенциал ацидобактерий, населяющих низинные болота с нейтральной реакцией среды, изучены слабо. Как было отмечено в ранее проведенном анализе микробных сообществ двух низинных болот, в составе ацидобактерий преобладают представители класса *Blastocatellia* и ряда некультивируемых филогенетических подгрупп этого филума (Ivanova et al., 2020a).

Настоящее исследование было предпринято с целью более детального анализа состава популяций ацидобактерий в низинных болотах. Мы расширили спектр болотных экосистем и провели сравнение сообществ ацидобактерий на примере четырех верховых и шести низинных болот Вологодской области. Мы также проанализировали метагеномы двух низинных болот и собрали геномы представителей ацидобактерий, типичных для этих экосистем, что позволило получить данные о метаболическом потенциале этих микроорганизмов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования и отбор образцов.** Образцы торфа для исследования были отобраны на территории Вологодской области из четырех верховых болот (Барское и Алексеевское — южная подзона

тайги, Шиченгское и Пиявочное — средняя подзона тайги) и шести низинных болот (Родионское — южная подзона тайги, Шиченгское, Пиявочное, Илекса, Поврека и Чарозерское — средняя подзона тайги). Координаты точек отбора образцов и основные характеристики исследованных торфяных болот приведены в табл. 1.

**Молекулярный анализ филогенетического разнообразия ацидобактерий.** Анализ состава сообществ прокариот в образцах торфа путем экстракции ДНК и секвенирования пула ПЦР-амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК был проведен в ранее выполненном исследовании (Ivanova et al., 2020a). Пул полученных в этом исследовании последовательностей фрагментов гена 16S рРНК, депонированный в GenBank под номером PRJNA610704, был использован в настоящей работе для анализа филогенетического разнообразия болотных ацидобактерий. Биоинформатический анализ полученных последовательностей проводили с помощью программного пакета QIIME v. 2019.10 (Caporaso et al., 2010). Таксономическую классификацию последовательностей осуществляли согласно базе данных Silva v.138 (Pruesse et al., 2007; Quast et al., 2013) с уровнем сходства 80%. Денойзинг и выбраковку химерных последовательностей проводили с помощью программы DADA2 (Callahan et al., 2016).

**Секвенирование метагеномов, сборка и анализ геномов ацидобактерий.** Препараты суммарной ДНК из образцов торфа низинных болот Шиченгское и Чарозерское выделяли с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (“Qiagen”). Полученные препараты секвенировали с использованием платформы Illumina HiSeq2500 в соответствии с инструкциями производителя (“Illumina”). В результате секвенирования TruSeq библиотек ДНК (парные чтения 2 × 150 нт.) было получено 92686766 (27.8 млрд нт.) и 125441212 (37.6 млрд нт.) пар чтений для образцов из болот Шиченгское и Чарозерское соответственно. Удаление адаптеров и низкокачественных последовательностей (Q < 30) проводили с помощью Cutadapt v. 1.17 (Martin, 2011) и Sickle v.1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>) соответственно. Чтения были собраны *de novo* в контиги с использованием программы MEGANIT v.1.2.9 (Li et al., 2015).

Полученные контиги длиной более 1500 нт. были кластеризованы в MAG (metagenome-assembled genomes) с использованием MetaBAT v. 2.15 (Kang et al., 2015). Собранные MAG были таксономически идентифицированы с использованием Genome Taxonomy Database Toolkit (GTDB-Tk) v.1.3.0 (Chaumeil et al., 2020) и базы данных Genome Taxonomy database (GTDB) (Parks et al., 2022). Параметры полноты и загрязнения (избыточности) MAG оценивали по наличию набора

**Таблица 1.** Расположение сайтов отбора образцов торфа и основные характеристики болот, исследованных в настоящей работе

|                   |   | Характеристики             |     |        |                      |               |         |         |         |        |
|-------------------|---|----------------------------|-----|--------|----------------------|---------------|---------|---------|---------|--------|
|                   |   | координаты                 | pH  | ТОС, % | N <sub>общ</sub> , % | сульфат, мг/л | Fe, ppm | Ca, ppm | Mg, ppm | P, ppm |
| Верховые болота*  | 1 | 59°56'56" N<br>41°16'59" E | 4.3 | 88.5   | 0.605                | 172           | 343     | 3522    | 634     | 614    |
|                   | 2 | 60°46'29" N<br>36°49'35" E | 3.7 | 85.1   | 0.923                | 220           | 1347    | 4190    | 682     | 791    |
|                   | 3 | 59°27'10" N<br>40°30'45" E | 4.3 | 88     | 0.685                | 211           | 662     | 4191    | 905     | 721    |
|                   | 4 | 59°22'33" N<br>39°59'26" E | 4.1 | 81.5   | 1.16                 | 200           | 5306    | 3765    | 816     | 1020   |
| Низинные болота** | 1 | 59°56'31" N<br>41°15'53" E | 7.4 | 73.6   | 2.31                 | 202           | 9387    | 29834   | 2575    | 1179   |
|                   | 2 | 60°46'08" N<br>36°49'30" E | 6.9 | 71.6   | 1.65                 | 222           | 16344   | 27373   | 1078    | 1305   |
|                   | 3 | 59°47'08" N<br>37°52'08" E | 7.6 | 41.8   | 1.06                 | 186           | 106966  | 32196   | 1599    | 8920   |
|                   | 4 | 61°08'18" N<br>36°33'27" E | 6.9 | 83.2   | 2.55                 | 230           | 3455    | 15968   | 2583    | 1049   |
|                   | 5 | 61°07'16" N<br>36°33'21" E | 6.5 | 48.6   | 1.51                 | 607           | 19264   | 8494    | 2665    | 1192   |
|                   | 6 | 60°30'42" N<br>38°38'59" E | 7.1 | 66.2   | 2.4                  | 188           | 5333    | 31193   | 2695    | 985    |

\* Верховые болота: 1 – Шиченгское, 2 – Пиявочное, 3 – Алексеевское, 4 – Барское.

\*\* Низинные болота: 1 – Шиченгское, 2 – Пиявочное, 3 – Родионское, 4 – Илекса, 5 – Поврека, 6 – Чарозерское.

однокопийных маркерных генов с помощью программы CheckM 1.1.3 (Parks et al., 2015).

Поиск генов и аннотацию геномов проводили с помощью сервера RAST 2.0 (Brettin et al., 2015) с последующей коррекцией аннотации путем сравнения предсказанных последовательностей белков с базами данных NCBI. N-концевые сигнальные пептиды были предсказаны с помощью Signal P v.5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019); для классификации и анализа гидрогеназ использовали HydDB сервер (Søndergaard et al., 2016).

Последовательности MAG ацидобактерий депонированы в NCBI GenBank под номерами JAMQRH000000000 (геном SH2), JAMQPI000000000 (геном CH3), JAMQPJ000000000 (геном CH5) и JAMQPK000000000 (геном CH22).

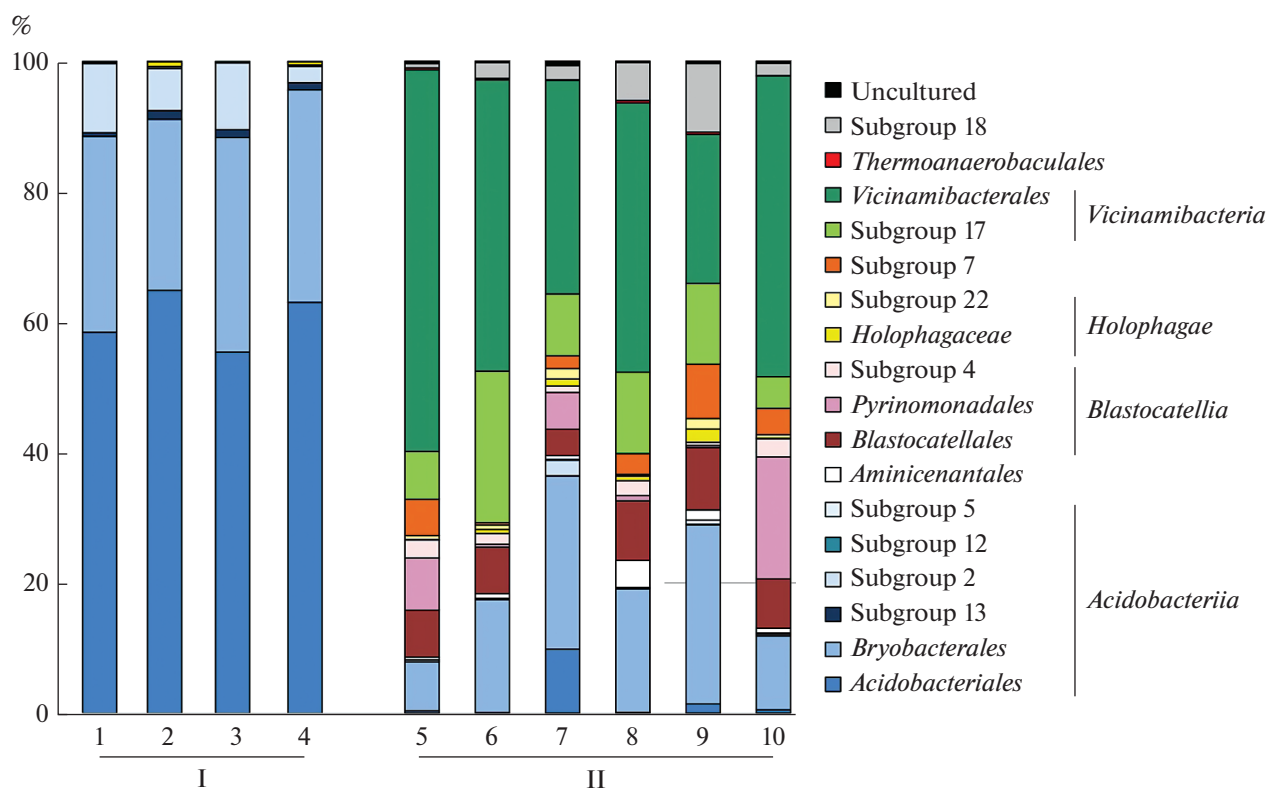
## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Филогенетическое разнообразие ацидобактерий в верховых и низинных болотах.** В общей сложности, из исследованных образцов торфа верховых и низинных болот было получено 2174164 фрагмента (средняя длина ~440 п.н.) последовательностей гена 16S рРНК. После процедуры фильтрации по

качеству и длине прочтений и выбраковке химер были отсортированы 1024783 последовательности. Пул фрагментов представителей филы *Acidobacteriota* включал 233178 последовательностей, что составляло 30–42% всех прочтений, полученных из торфа верховых болот, и 7–22% прочтений, полученных из торфа низинных болот.

Сообщество ацидобактерий верховых болот почти целиком (>99%) состояло из представителей класса *Acidobacteriia* (рис. 1). В пределах этого класса преобладали бактерии порядков *Acidobacteriales* (от 55.4% общего числа всех последовательностей ацидобактерий в болоте Барское до 64.9% в болоте Алексеевское) и *Bryobacteriales* (от 26.3% общего числа всех прочтений в болоте Алексеевское до 32.9% в болоте Барское). Третьей численно значимой группой ацидобактерий являлась филогенетическая подгруппа 2 (Subdivision 2), также относящаяся к классу *Acidobacteriia*, но пока не имеющая культивируемых представителей. Доля фрагментов гена 16S рРНК ацидобактерий подгруппы 2 составляла от 2.5% всех прочтений в болоте Пиявочное до 10.6% всех прочтений в болоте Шиченгское. Среди малочисленных групп ацидобактерий в верховых болотах были





**Рис. 1.** Состав микробного сообщества ацидобактерий в торфе верховых (I) и низинных (II) болот согласно результатам анализа генов 16S рРНК. Цифрами обозначены верховые болота: 1 – Шиченгское, 2 – Алексеевское, 3 – Барское, 4 – Пиявочное; низинные болота: 5 – Шиченгское, 6 – Родионское, 7 – Пиявочное, 8 – Илекса, 9 – Поврека, 10 – Чарозерское. Результаты анализа разнообразия представлены на уровне порядков и классов. Представители каждого класса ацидобактерий обозначены в одной цветовой гамме. Данные представляют собой среднее значение, полученное из 5 повторностей.

выявлены представители подгрупп 12 и 13 (рис. 1). Наиболее многочисленными группами последовательностей гена 16S рРНК, которые могли быть классифицированы на уровне рода, принадлежали представителям *Occallatibacter* (3.3–9.7%), *Bryobacter* (8.5–17.3%) и *Candidatus Solibacter* (13.4–22.9%).

Ацидобактериальные сообщества низинных и верховых болот коренным образом различались (рис. 1 и 2). В низинных болотах численно доминировали представители класса *Vicinamibacteria*, относящиеся к порядку *Vicinamibacteriales* (от 23.1% всех последовательностей ацидобактерий в болоте Поврека до 58.9% в болоте Шиченгское) и некультивируемой филогенетической подгруппе 17 (Subdivision 17) (от 4.9% всех последовательностей ацидобактерий в болоте Чарозерское до 23.4% в болоте Родионское). Вторым по численности был класс *Blastocatellia*, представители которого составляли от 9.2 до 29.0% всех ацидобактерий. В пределах этого класса доминировали бактерии семейства *Blastocatellaceae* (от 4.1% полученных фрагментов ацидобактерий в болоте Пиявочное до 9.4% в болоте Поврека) и *Pyrinomonadaceae* (от 0.3% в болоте Поврека до 18.8% в

болоте Чарозерское) (рис. 2). Представители класса *Acidobacteriia* также были выявлены в составе сообществ ацидобактерий низинных болот, однако их доля была значительно ниже, чем в верховых болотах и составляла от 8.6% в болоте Шиченгское до 39.5% в болоте Пиявочное. В пределах этого класса наиболее представленными группами были ацидобактерии рода *Bryobacter* (2.4–12.2% всех последовательностей ацидобактерий) и *Candidatus Solibacter* (2.9–12.4%). Несколько минорных групп ацидобактерий, которые были обнаружены в низинных болотах, но отсутствовали в верховых, составляли представители класса *Thermoanaerobaculia*, некультивируемых филогенетических подгрупп 7, 18, 22 и порядка “*Aminicenantales*”.

В целом, доля фрагментов гена 16S рРНК ацидобактерий, которые могли быть классифицированы на уровне рода, составила 38–48% в верховых болотах и лишь 8–28% в низинных болотах. Таким образом, подавляющее большинство ацидобактерий в низинных болотах были представлены неизвестными таксонами.



**Таблица 2.** Основные характеристики геномов ацидобактерий, полученных из метагеномов торфа низинных болот

| Геном              | Полнота, % | Загрязнение, % | Размер MAG, н.т. | Число контигов | Таксономическая классификация по GTDB   |
|--------------------|------------|----------------|------------------|----------------|---|
| Болото Шиченгское  |            |                |                  |                |   |
| SH2                | 91.1       | 5.3            | 7378535          | 909            | p__Acidobacteriota; c__Blastocatellia;<br>o__Pyrinomonadales;<br>f__Pyrinomonadaceae; g__PSRF01 |
| Болото Чарозерское |            |                |                  |                |   |
| CH3                | 91.0       | 2.9            | 6905000          | 735            | p__Acidobacteriota; c__Blastocatellia;<br>o__Pyrinomonadales; f__Pyrinomonadaceae               |
| CH5                | 88.7       | 4.7            | 3735478          | 687            | p__Acidobacteriota; c__Thermoanaerobaculia;<br>o__UBA5066; f__UBA5066; g__Fen-183               |
| CH22               | 89.7       | 4.4            | 3781114          | 242            | p__Acidobacteriota; c__Vicinamibacteria;<br>o__Vicinamibacterales; f__UBA2999                   |

**Определение последовательностей геномов некультивируемых ацидобактерий.** Для получения MAG членов микробного сообщества мы просеквенировали метагеном образцов торфа из низинных болот Шиченгское и Чарозерское. Анализ таксономической принадлежности полученных MAG показал, что четыре из них, один из Шиченгского и три из Чарозерского болота, относились к ацидобактериям (табл. 2).

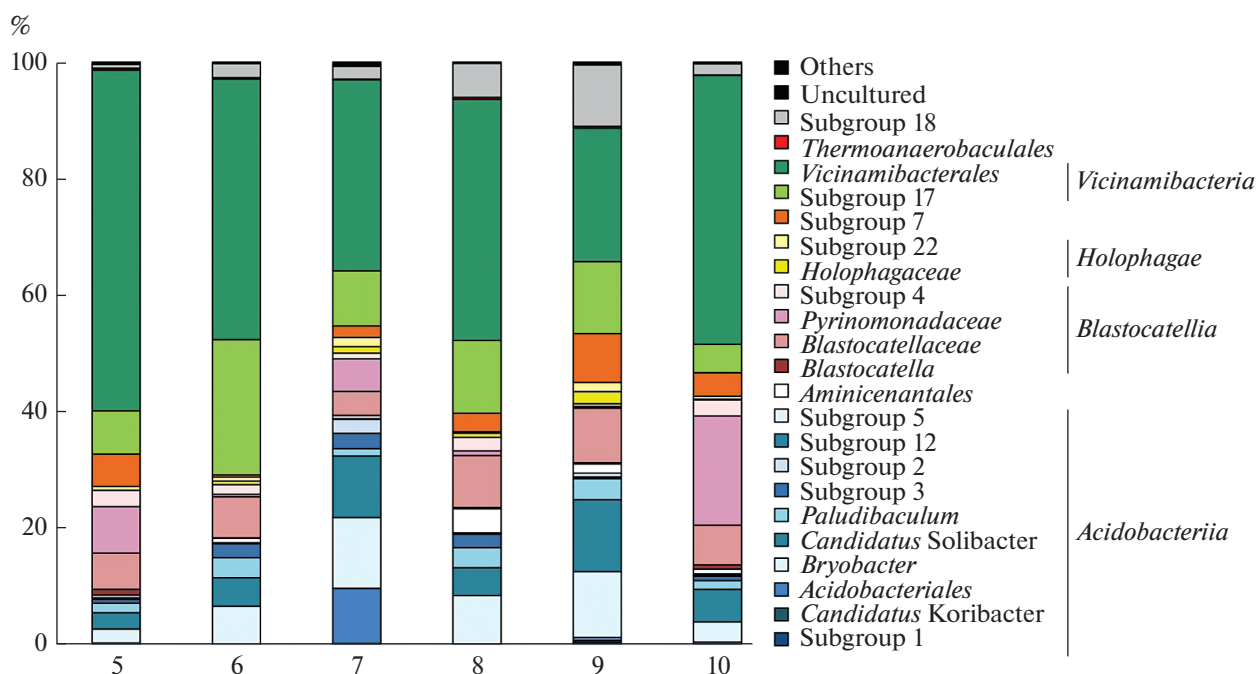
Два полученных генома, SH2 и CH3, относились к семейству *Pyrinomonadaceae* класса *Blastocatellia*, в котором представляли некультивируемый род-кандидат PSRF01 и новую линию уровня рода соответственно. Два других генома были отнесены к некультивируемому порядку-кандидату UBA5066 класса *Thermoanaerobaculia* (CH5) и семейству UBA2999 класса *Vicinamibacteria* (CH22).

Присутствие в геномах генов, кодирующих белки MreBCD и RodA, указывает на то, что клетки всех четырех ацидобактерий имеют палочковидную форму. Во всех геномах отсутствовали гены флагеллярного аппарата, но содержался набор генов пилей IV типа, наличие которых указывает на “ползающую” подвижность бактерий и их способность к адгезии к твердым субстратам (Mandlik et al., 2008).

**Анализ центральных путей метаболизма новых ацидобактерий.** Анализ геномов всех четырех бактерий выявил ключевые пути аэробного гетеротрофного метаболизма, в том числе Эмбдена–Мейергофа, глюконеогенеза, неокислительный этап пентозофосфатного пути и цикл трикарбоновых кислот. Во всех геномах кодируется электрон-транспортная цепь для аэробного дыхания, включающая терминальные цитохром *c*-оксидазы. Все четыре генома кодируют оксидазы *aa3* типа, а геномы SH2, CH3 и CH22 дополнительно содержат гены

оксидазы *cbb3* типа. Эти оксидазы различаются по своему родству к кислороду: в то время как ферменты типа *aa3* имеют низкое родство и обычно используются аэробными микроорганизмами, оксидазы типа *cbb3* обычно имеют очень высокое родство к кислороду, обеспечивая дыхание в микроаэробных условиях (Pitcher et al., 2002). Предсказанная способность ацидобактерий расти в аэробных условиях согласуется с наличием в их геномах супероксиддисмутазы и каталазы, участвующих в защите от активных форм кислорода у аэробов.

Все четыре ацидобактерии обладают генетическими детерминантами, необходимыми и для анаэробного дыхания. Все геномы кодируют молибдоптериновые оксидоредуктазы CISM (complex iron–sulfur molybdoenzyme) семейства (Rothery et al., 2008), гомологичные полисульфид-, тиосульфат- и тетраионатредуктазам. Бактерии SH2 и CH5 также содержат гены цитохром *c*-зависимой нитритредуктазы, восстанавливающей нитрит до аммония; у SH2 имеется редуктаза закиси азота (N<sub>2</sub>O), а у CH3 – редуктаза оксида азота (NO). Отметим, что все геномы содержали гены мультигеновых (до 10 гем-связывающих сайтов) цитохромов *c*, число которых у SH2, CH3, CH5 и CH22 составляло 36, 29, 49 и 16 соответственно. Такие цитохромы *c*-типа играют ключевую роль в переносе электронов из клетки к внеклеточному акцептору электронов у хорошо изученных грамотрицательных бактерий *Shewanella* и *Geobacter*, осуществляющих диссимиляционное восстановление железа Fe(III) (Shi et al., 2007; Richter et al., 2012). Взаимодействию с нерастворимыми минералами Fe(III) также могут способствовать пили типа IV, кодируемые во всех четырех геномах.



**Рис. 2.** Состав микробного сообщества ацидобактерий в торфе низинных болот согласно результатам анализа генов 16S рРНК. Цифрами обозначены следующие болота: 5 – Шиченгское, 6 – Родионское, 7 – Пиявочное, 8 – Илекса, 9 – Поврека, 10 – Чарозерское. Результаты анализа разнообразия представлены на уровне родов и таксонов высокого порядка. Представители каждого класса ацидобактерий обозначены в одной цветовой гамме. Данные представляют собой среднее значение, полученное из 5 повторностей.

Помимо органических субстратов (см. ниже), все анализируемые ацидобактерии могут использовать неорганические доноры электронов для дыхания. Все геномы кодируют СО-дегидрогеназу аэробного типа, а геномы представителей *Pyrinomonadaceae* (SH2 и CH3) также [NiFe]-гидрогеназы группы 1h, обладающие очень высоким сродством к водороду и способные окислять следовые количества атмосферного  $H_2$  (Greening et al., 2015).

**Потенциальные субстраты для роста и экологическая роль.** Анализ геномов показал наличие генов транспортеров аминокислот и коротких пептидов, что указывает на способность этих бактерий использовать соответствующие субстраты. Все геномы также кодируют путь  $\beta$ -окисления жирных кислот, которые, вероятно, также могут использоваться в качестве субстратов. Бактерия SH2 кодирует набор ферментов пути утилизации бензоата (бензоил-СоА оксигеназная система), а бактерия CH22 – транспортеры ди- и трикарбоновых кислот (цитрат, фумарат, малат, сукцинат), которые могут использоваться в цикле трикарбоновых кислот.

Представители *Pyrinomonadaceae* обладают разнообразными возможностями использования углеводных субстратов, о чем свидетельствует наличие в их геномах большого числа гликозил-гидролаз и транспортеров сахаров. Бактерии SH2 и

CH5 обладают генетическим потенциалом для утилизации ксилана, в том числе содержат гены эндо-1,4- $\beta$ -ксилазаз, содержащих N-концевые сигналы секреции и карбогидрат-связывающие домены, гены секретируемых ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаз,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ксилозидаз, а также транспортеров и ферментов пути утилизации ксилозы (ксилозоизомераза и ксилулозокиназа). Наличие транспортеров АВС типа для мальтозы/мальтодекстрина и амилолитических ферментов указывает на возможность использования крахмала и его производных. Также оба генома кодируют пектатлиазы с N-концевыми сигналами секреции, ключевые ферменты, обеспечивающие утилизацию пектина. Особенностью бактерии CH3 является наличие кластера генов, кодирующих эндоглюканазы семейств GH9 и GH48. Некоторые из них помимо сигналов секреции содержат связывающие целлюлозу домены (СВМ2 или СВМ3). По-видимому, бактерия CH3 также способна использовать целлюлозу. Обе бактерии обладают генетическим потенциалом для утилизации простых сахаров, включая маннозу, галактозу и N-ацетилглюкозамин.

Анализ геномов бактерий CH5 и CH22 не выявил у них генов, кодирующих секретируемые гликозил-гидролазы, которые могли бы обеспечивать гидролиз сложных полисахаридов. Особенностью бактерии CH22 является наличие у нее секретируемой  $\alpha$ -L-рамнозидазы, которая может

отщеплять терминальные остатки  $\alpha$ -L-рамнозы от  $\alpha$ -L-рамнозидов, и полного пути метаболизма L-рамнозы. Импортированная в клетку L-рамноза преобразуется в L-рамнулозу изомеразой, далее происходит ее фосфорилирование рамнулокиназой и расщепление альдозазой на дигидроксиацетон-фосфат и лактальдегид. Последующий метаболизм лактальдегида, в результате которого образуется пируват, осуществляется в бактериальных микрокомпартаментах-метаболосомах — органеллах, ограниченных белковой оболочкой и предназначенных для метаболизма токсичных для клетки соединений (Chowdhury et al., 2014). Метаболосомы, участвующие в деградации 1,2-пропандиола и этаноламина, были впервые описаны у *Salmonella* (Vobik et al., 1999; Kofoed et al., 1999). Гены, кодирующие структурные белки метаболосомы, обнаружены в геноме бактерии CH22. Подобные механизмы утилизации рамнозы были ранее обнаружены у планктомицетов *Planctomyces limnophilus* (Erbilgin et al., 2014) и *Humisphaera borealis* (Dedysh et al., 2021), но не были описаны для ацидобактерий. Интересно, что геном CH5 также содержит гены структурных компонентов микрокомпартамента, но ферменты утилизации рамнозы у него отсутствуют. Возможно, это связано с неполнотой собранного MAG, или микрокомпаратмент у этой бактерии используется для метаболизма других токсичных соединений.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ разнообразия представителей филума *Acidobacteriota* в четырех верховых и шести низинных болотах Вологодской области подтвердил ранее выявленные отличия состава сообществ ацидобактерий в этих экосистемах (Ivanova et al., 2020a). Ацидобактерии кислых верховых болот были представлены порядками *Acidobacteriales* и *Bryobacteriales* класса *Acidobacteriia*, тогда как в торфе нейтральных низинных болот преобладали ацидобактерии классов *Vicinamibacteria* и *Blastocatellia*. Составляющие минорную группу ацидобактерий представители класса *Thermoanaerobaculia* были выявлены только в низинных болотах. Так как охарактеризованное разнообразие и пул доступных последовательностей геномов представителей классов *Blastocatellia*, *Vicinamibacteria* и *Thermoanaerobaculia* крайне ограничены, нами были собраны и проанализированы геномы четырех типичных представителей этих бактерий из низинных болот.

В настоящее время в семействе *Pyrinomonadaceae* класса *Blastocatellia* имеется четыре культивируемых представителя — *Pyrinomonas methylaliphatogenes*, *Brevitalea aridisoli*, *Brevitalea deliciosa* и *Arenimicrobium luteum* (Crowe et al., 2014; Wüst et al., 2016), однако последовательность генома определена только для *P. methylaliphatogenes* (Lee et al., 2015). Эта бак-

терия является облигатным аэробным гетеротрофом, способным использовать преимущественно белковые субстраты, но также ряд простых сахаров и ксилан (Crowe et al., 2014). Геном *P. methylaliphatogenes* имеет почти вдвое меньший размер (3.8 млн нт.), чем геномы CH5 и CH22, но кодирует большой набор генов гликозил-гидролаз, в том числе эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазу и целлюлазу семейства GH5 (Lee et al., 2015). *B. aridisoli*, *B. deliciosa* и *A. luteum* также являются аэробными гетеротрофами, растут преимущественно на белковых субстратах, но могут использовать некоторые простые сахара. Штамм *B. aridisoli* Ac\_11\_E3<sup>T</sup> также может расти на ксилане и целлюлозе (Wüst et al., 2016). Таким образом, как культивируемые представители *Pyrinomonadaceae*, так и бактерии CH5 и CH22, по-видимому, используют широкий спектр субстратов, включающий белки, простые сахара и некоторые полисахариды.

В классе *Thermoanaerobaculia* имеется лишь один культивируемый представитель, *Thermoanaerobaculum aquaticum*, — выделенная из горячего источника строго анаэробная бактерия, осуществляющая бродильный тип метаболизма на пирувате и белковых субстратах, также способная к диссимиляционному восстановлению Fe(III) и Mn(IV) (Losey et al., 2013). Другой представитель этого класса, “*Candidatus Sulfomarinibacter*”, описан на основе MAG, полученного из метагенома морских осадков (Flieder et al., 2021). Анализ этого генома показал возможность как аэробного, так и анаэробного (с оксидом азота, оксидами металлов и окисленными соединениями серы) дыхания, и использование в качестве субстратов белков и целлюлозы (Flieder et al., 2021). По наличию респираторных путей бактерия CH5 ближе к “*Ca. Sulfomarinibacter*”, а общим свойством всех вышеуказанных *Thermoanaerobaculia*, по-видимому, является способность к диссимиляционному восстановлению железа и узкий спектр используемых субстратов.

В классе *Vicinamibacteria* имеется два культивируемых вида, *Vicinamibacter silvestris* (Huber et al., 2016) и *Luteitalea pratensis* (Vieira et al., 2017), геном второго был просеквенирован (Huang et al., 2016). Обе ацидобактерии были выделены из почв и являются аэробными хемоорганотрофами, использующими различные белковые субстраты и простые сахара, причем геном *L. pratensis* содержит более ста генов гликозил-гидролаз и пептидаз. Следует отметить потенциальную способность *V. silvestris* расти на рамнозе, что было предсказано и для бактерии CH22. Возможно, способность к утилизации рамнозы и образованию необходимых для этого внутриклеточных микрокомпаратментов-метабоლოსом распространена у представителей *Vicinamibacteria* и некоторых других ацидобактерий.

Выполненный в настоящей работе анализ геномов четырех представителей ацидобактерий из низинных болот позволил получить данные о метаболическом потенциале этих микроорганизмов, которые проясняют их функциональную роль в этих экосистемах и могут быть использованы для оптимизации сред и подходов для культивирования этих бактерий.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант 19-29-05059) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-318 от 20.04.2022 о поддержке НЦМУ “Агротехнологии будущего” и государственное задание по теме № 122041100029-2).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования предложена С.Н. Дедыш. Отбор и описание образцов торфа выполнены Д.А. Филипповым. Молекулярное профилирование сообщества прокариот образцов торфа проведено А.В. Ракиным и А.В. Мардановым. Анализ разнообразия ацидобактерий проведен А.А. Ивановой. Сборка и анализ метагеномов выполнены Ш.А. Бегматовым, А.В. Белецким и Н.В. Равиным. Текст статьи написан С.Н. Дедыш и Н.В. Равиным. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Almagro Armenteros J.J., Tsirigos K.D., Sonderby C.K., Petersen T.N., Winther O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 420–423.
- Barns S.M., Cain E.C., Sommerville L., Kuske C.R.* *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 7. P. 3113–3116.
- Belova S.E., Ravin N.V., Pankratov T.A., Rakitin A.L., Ivanova A.A., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Sinninghe Damsté J.S., Dedysh S.N.* Hydrolytic capabilities as a key to environmental success: chitinolytic and cellulolytic *Acidobacteria* from acidic sub-arctic soils and boreal peatlands // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2775.
- Bobik T.A., Havemann G.D., Busch R.J., Williams D.S., Aldrich H.C.* The propanediol utilization (pdu) operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B<sub>12</sub>-dependent 1,2-propanediol degradation // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 5967–5975.
- Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason J.A. 3rd, Stevens R., Vonstein V., Wattam A.R., Xia Fangfang.* RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 8365.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods.* 2016. V. 13. P. 581–583.
- Caporaso J., Kuczynski J., Stombaugh J.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. P. 335–336.
- Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H.* GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // *Bioinform.* 2020. V. 36. P. 1925–1927.
- Chowdhury C., Sinha S., Chun S., Yeates T.O., Bobik T.A.* Diverse bacterial microcompartment organelles // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014. V. 78. P. 438–468.
- Crowe M.A., Power J.F., Morgan X.C., Dunfield P.F., Lagutin K., Rijpstra W.I.C., Vyssotski M., Sinninghe Damsté J.S., Houghton K.M., Ryan J.L.J., Stott M.B.* *Pyrimomonas methylaliphagogenes* gen. nov. sp. nov. a novel group 4 thermophilic member of the phylum *Acidobacteria* from geothermal soils // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 220–227.
- Dedysh S.N.* Cultivating uncultured bacteria from northern wetlands: knowledge gained and remaining gaps // *Front. Microbiol.* 2011. V. 2. P. 184.
- Dedysh S.N., Beletsky A.V., Ivanova A.A., Kulichevskaya I.S., Suzina N.E., Philippov D.A., Rakitin A.L., Mardanov A.V., Ravin N.V.* Wide distribution of *Phycisphaera*-like planctomycetes from WD2101 soil group in peatlands and genome analysis of the first cultivated representative // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 1510–1526.
- Dedysh S.N., Oren A.* “*Acidobacteriia*” // *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* / Eds Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A. and Whitman W.B.). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00001.pub2>.
- Dedysh S.N., Pankratov T.A., Belova S.E., Kulichevskaya I.S., Liesack W.* Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria community composition in an acidic *Sphagnum* peat bog // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 2110–2117.
- Dedysh S.N., Yilmaz P.* Refining the taxonomic structure of the phylum *Acidobacteria* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 3796–3806.
- Eichorst S.A., Trojan D., Roux S., Herbold C., Rattei T., Woebken D.* Genomic insights into the *Acidobacteria* reveal strategies for their success in terrestrial environments // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 1041–1063.
- Erbilgin O., McDonald K.L., Kerfeld C.A.* Characterization of a planctomycetal organelle: a novel bacterial microcompartment for the aerobic degradation of plant saccharides // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 2193–2205.

- Flieder M., Buongiorno J., Herbold C.W., Hausmann B., Rattei T., Lloyd K.G., Loy A., Wasmund K. Novel taxa of *Acidobacteriota* implicated in seafloor sulfur cycling // ISME J. 2021. V. 15. P. 3159–3180.
- Foesel B.U., Nägele V., Naether A., Wüst P.K., Weinert J., Bonkowski M., Lohaus G., Polle A., Alt F., Oelmann Y., Fischer M., Friedrich M.W., Overmann J. Determinants of *Acidobacteria* activity inferred from the relative abundances of 16S rRNA transcripts in German grassland and forest soils // Environ. Microbiol. 2014. V. 16. P. 658–675.
- Greening C., Carere C.R., Rushton-Green R., Harold L.K., Hards K., Taylor M.C., Morales S.E., Stott M.B., Cook G.M. Persistence of the dominant soil phylum *Acidobacteria* by trace gas scavenging // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 11. P. 10497–10502.
- Huang S., Vieira S., Bunk B., Riedel T., Spröer C., Overmann J. First complete genome sequence of a Subdivision 6 *Acidobacterium* strain // Genome Announc. 2016. V. 4. P. e00469-16.
- Huber K.J., Geppert A.M., Wanner G., Fösel B.U., Wüst P.K., Overmann J. The first representative of the globally widespread subdivision 6 *Acidobacteria* *Vicinamibacter silvestris* gen. nov. sp. nov. isolated from subtropical savannah soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 2971–2979.
- Ivanova A.A., Beletsky A.V., Rakitin A.L., Kadnikov V.V., Philippov D.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Dedysh S.N. Closely located but totally distinct: highly contrasting prokaryotic diversity patterns in raised bogs and eutrophic fens // Microorganisms. 2020a. V. 8. P. 484.
- Ivanova A.A., Zhelezova A.D., Chernov T.I., Dedysh S.N. Linking ecology and systematics of acidobacteria: Distinct habitat preferences of the *Acidobacteriia* and *Blastocatellia* in tundra soils // PLoS One. 2020b. V. 15. P. e0230157.
- Janssen P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 1719–1728.
- Jones R.T., Robeson M.S., Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses // ISME J. 2009. V. 3. P. 442–453.
- Kang D.D., Froula J., Egan R., Wang Z. MetaBAT an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities // PeerJ. 2015. V. 3. P. e1165.
- Kielak A.M., Barreto C.C., Kowalchuk G.A., van Veen J.A., Kuramae E.E. The ecology of *Acidobacteria*: moving beyond genes and genomes // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 744.
- Kofoed E., Rappleye C., Stojiljkovic I., Roth J. The 17-gene ethanolamine (eut) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologues of carboxysome shell proteins // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 5317–5329.
- Kulichevskaya I.S., Suzina N.E., Liesack W., Dedysh S.N. *Bryobacter aggregatus* gen. nov. sp. nov. a peat-inhabiting aerobic chemo-organotroph from subdivision 3 of the *Acidobacteria* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 301–306.
- Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 5111–5120.
- Lee K.C.Y., Morgan X.C., Power J.F., Dunfield P.F., Huttenhower C., Stott M.B. Complete genome sequence of the thermophilic *Acidobacteria* *Pyrinomonas methylaliphato-* genes type strain K22<sup>T</sup> // Stand. Genom. Sci. 2015. V. 14. P. 101.
- Lee S.H., Ka J.O., Cho J.C. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 285. P. 263–269.
- Li D., Liu C.M., Luo R., Sadakane K., Lam T.W. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph // Bioinformatics. 2015. V. 31. P. 1674–1676.
- Losey N.A., Stevenson B.S., Busse H.J., Damsté J.S.S., Rijpstra W.I.C., Rudd S., Lawson P.A. *Thermoanaerobaculum aquaticum* gen. nov. sp. nov. the first cultivated member of *Acidobacteria* subdivision 23 isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 4149–4157.
- Ludwig W., Bauer S.H., Bauer M., Held I., Kirchhof G., Schulze R., Huber I., Spring S., Hartmann A., Schleifer K.H. Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 153. P. 181–190.
- Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly involvement in colonization and biofilm development // Trends Microbiol. 2008. V. 16. P. 33–40.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads // EMBnet. J. 2011. V. 17.1. P. 10–12.
- Oren A., Garrity G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. P. 005056.
- Pankratov T.A., Dedysh S.N. *Granulicella paludicola* gen. nov. sp. nov. *Granulicella pectinivorans* sp. nov. *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov. acidophilic polymer-degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2951–2959.
- Pankratov T.A., Kirsanova L.A., Kaparullina E.N., Kevbrin V.V., Dedysh S.N. *Telmatobacter bradus* gen. nov. sp. nov. a cellulytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the *Acidobacteria* and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto et al. 1991 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 430–437.
- Parks D.H., Chuvochina M., Rinke C., Mussig A.J., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent rank normalized and complete genome-based taxonomy // Nucl. Acids Res. 2022. V. 50. P. D785–D794.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates single cells and metagenomes // Genome Res. 2015. V. 25. P. 1043–1055.
- Pitcher R.S., Brittain T., Watmough N.J. Cytochrome *cbh3* oxidase and bacterial microaerobic metabolism // Proc. Biochem. Soc. Trans. 2002. V. 30. P. 653–658.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner F.O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. P. 7188–7196.
- 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. P. D590–D596.

Richter K., Schicklberger M., Gescher J. Dissimilatory reduction of extracellular electron acceptors in anaerobic respiration // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 913–921.

Rothery R.A., Workun G.J., Weiner J.H. The prokaryotic complex iron–sulfur molybdoenzyme family // Biochim. Biophys. Acta – Biomembr. 2008. V. 1778. P. 1897–1929.

Shi L., Squier T.C., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem *c*-type cytochromes. MicroReview // Mol. Microbiol. 2007. V. 65. P. 12–20.

Søndergaard D., Pedersen C.N.S., Greening C. HydDB: A web tool for hydrogenase classification and analysis // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 34212.

Vieira S., Luckner M., Wanner G., Overmann J. *Luteitalea pratensis* gen. nov. sp. nov. a new member of subdivision 6 *Acidobacteria* isolated from temperate grassland soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1408–1414.

Wüst P.K., Foessel B.U., Geppert A., Huber K.J., Luckner M., Wanner G., Overmann J. *Brevitalea aridisoli*, *B. deliciosa* and *Arenimicrobium luteum* three novel species of *Acidobacteria* subdivision 4 (class *Blastocatellia*) isolated from savanna soil and description of the novel family *Pyrinomonadaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 3355–3366.

## Acidobacteria in Fens: Phylogenetic Diversity and Genome Analysis of the Key Representatives

S. N. Dedysh<sup>1</sup>, A. A. Ivanova<sup>1</sup>, Sh. A. Begmatov<sup>2</sup>, A. V. Beletsky<sup>2</sup>, A. L. Rakitin<sup>2</sup>,  
A. V. Mardanov<sup>2</sup>, D. A. Philippov<sup>3</sup>, and N. V. Ravin<sup>2, \*</sup>

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

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

<sup>3</sup>Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, 152742 Russia

\*e-mail: nravin@mail.ru

Received May 31, 2022; revised June 7, 2022; accepted June 9, 2022

**Abstract**—*Acidobacteriota* are one of the major prokaryotic groups in soils and peatlands. They are especially abundant in acidic peat bogs, where representatives of the well-characterized class *Acidobacteriia* predominate. The diversity and metabolic potential of *Acidobacteriota* inhabiting fens with neutral pH have been studied less thoroughly. We analyzed the composition of acidobacterial communities in four peat bogs and six fens of the Vologda region. The *Acidobacteriota*-affiliated 16S rRNA gene sequences comprised 30–42 and 7–22% of all reads retrieved from the peat bogs and fens, respectively. The acidobacteria of peat bogs were represented by the orders *Acidobacteriales* and *Bryobacterales* of the class *Acidobacteriia*, while the classes *Vicinamibacteria* and *Blastocatellia* predominated in fens. Genomes of four uncultured bacteria of *Blastocatellia* (family *Pyrinomonadaceae*, two genomes), *Vicinamibacteria* (family UBA2999), and *Thermoanaerobaculia* (order UBA5066) were assembled from the metagenomes of peat fens. Genome analysis revealed key pathways of aerobic heterotrophic metabolism in all four microorganisms, including the Embden–Meyerhof pathway, gluconeogenesis, the non-oxidative stage of the pentose phosphate pathway, the tricarboxylic acid cycle, and the electron transport chain of aerobic respiration, including terminal cytochrome *c* oxidases. All genomes encoded molybdopterin oxidoreductases of the CISM family and multiheme cytochromes *c*, indicating the possibility of dissimilatory reduction of sulfur compounds and Fe(III) under anaerobic conditions. Probable growth substrates may be amino acids, peptides, and fatty acids. Members of the *Pyrinomonadaceae* can also use various carbohydrates, including polysaccharides, and are likely involved in the degradation of various biopolymers in peat bogs. Members of *Thermoanaerobaculia* and *Vicinamibacteria* lacked the genes for secreted glycosyl hydrolases and probably could only use a limited range of simple sugars. The genome of a bacterium of the class *Vicinamibacteria* contained a set of genes encoding bacterial microcompartments (metabolosomes) that have not previously been described in acidobacteria and are probably involved in the metabolism of L-rhamnose.

**Keywords:** *Acidobacteriota*, fens, peat bogs, *Vicinamibacteria*, *Blastocatellia*, *Thermoanaerobaculia*, metagenomic analysis, metagenome-assembled, genome

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИАНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ  
БИОПЛЕНОК ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*© 2022 г. Д. И. Мокеев<sup>а</sup>, И. В. Волохина<sup>а</sup>, Е. М. Телешева<sup>а</sup>, С. С. Евстигнеева<sup>а</sup>,  
В. С. Гринев<sup>а</sup>, Т. Е. Пылаев<sup>а, б</sup>, Л. П. Петрова<sup>а, \*</sup>, А. В. Шелудько<sup>а, \*\*</sup><sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра  
“Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия<sup>б</sup>Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, 410012 Россия

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

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

Поступила в редакцию 28.03.2022 г.

После доработки 18.05.2022 г.

Принята к публикации 06.06.2022 г.

Для создания условий осмотического стресса при культивировании типового штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 и его спонтанных вариантов Sp7.4 и Sp7.8 использовали полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000), обеспечивающий стабильное снижение уровня водного потенциала, что позволяет моделировать влияние условий засухи на бактериальную популяцию. ПЭГ блокировал подвижность азоспирилл, но не оказывал подобного влияния на способность Sp7 и Sp7.8 формировать биопленки, а также на метаболическую активность биомассы пленок, сформированных без стресса. Осмотический стресс, вызванный ПЭГ 6000, стимулировал формирование биопленок у Sp7.8. Биопленки варианта Sp7.4 оказались наиболее восприимчивыми к негативному влиянию водного стресса, однако в планктонной культуре показатели роста этого варианта в данных условия превышали значения, характерные для Sp7 и Sp7.8. В биопленках штаммы Sp7, Sp7.4 и Sp7.8 продуцировали полисахариды и фитогормон ИУК, формировали клеточные формы, устойчивые к высушиванию. Варианты Sp7.4 и Sp7.8, как и Sp7, колонизировали корни, формировали на них биопленки и оказывали влияние на морфологию корневой системы проростков пшеницы. Результаты исследований показали, что спонтанные варианты штамма Sp7 интересны для дальнейших исследований, направленных на отбор перспективных штаммов азоспирилл, повышающих устойчивость растений к засухе.

**Ключевые слова:** осмотический стресс, водный стресс, засуха, биопленки, покоящиеся формы, высушивание

**DOI:** 10.31857/S0026365622800230

Обитающие в ризосфере альфапротеобактерии *Azospirillum brasilense* оказывают существенное положительное влияние на рост растений и их устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам: благодаря своей способности к фиксации азота и синтезу фитогормонов, контролю фитопатогенов, они улучшают минеральное питание растений, повышают их устойчивость к тяжелым металлам и нейтрализуют токсические вещества (Fibach-Paldi et al., 2012; Vurukonda et al., 2016; Fukami et al., 2018). Засуха/водный стресс, наряду с засолением почв и изменением климата, относится к числу основных абиотических стрессов, с которыми сталкиваются растения и ассоциированные с ними бактерии (Vurukonda et al., 2016; Ansari et al., 2021). В условиях стресса увеличивается потребление растениями ростовых фак-

торов, возникает дефицит ресурсов, приводящий к замедлению роста и развития растений (Hsiao, 1973). Подобно растениям, ризосферные бактерии из-за засухи также подвергаются стрессу, который влияет на их жизнеспособность, физиологические и биохимические функции (Ansari et al., 2021).

Создание условий осмотического стресса при культивировании микроорганизмов и растений в присутствии различных осмотических агентов, обеспечивающих стабильное снижение водного потенциала среды и блокирование поглощения воды, позволяет моделировать влияние засухи на бактериальную популяцию и растения (Chutia, Borah, 2012; Ansari et al., 2021). Такой подход необходим для изучения механизмов и способов защиты микроорганизмов от данного вида стресса с



целью отбора засухоустойчивых ризосферных бактерий, способствующих повышению устойчивости растений к условиям дефицита воды.

Определенное значение для успешного формирования и функционирования растительно-микробной ассоциации и противостояния микробов и растений различным абиотическим стрессам является способность бактерий формировать биопленки на корнях растения-хозяина (Шелудько и соавт., 2010, 2020; Fibach-Paldi et al., 2012; Vogino et al., 2013; Ansari et al., 2021). В биопленках бактерии заключены в матрикс, являющийся резервуаром воды, ферментов и питательных веществ и играющий структурную и защитную роли (Flemming, Wingender, 2010). Матрикс биопленок медленно высыхает, чем предохраняет микроорганизмы от изменений водного потенциала. Исследованы состав, структура и функции основных биополимеров матрикса биопленок азоспирилл, обеспечивающих фиксацию зрелых биопленок на твердой поверхности и выполняющих каркасную функцию, способствующих созданию в биопленках условий для фиксации азота (Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2018, 2020). Охарактеризован морфологический и функциональный полиморфизм клеточных форм в биопленках азоспирилл (Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2020). Наличие покоящихся форм в биопленочной популяции повышает устойчивость к таким негативным воздействиям, как высушивание и окислительный стресс (Шелудько и соавт., 2020).

Можно ожидать, что ризобактерии, формирующие устойчивые к засухе биопленки, найдут применение в борьбе со стрессом растений, обусловленным засухой (Ansari, Ahmad, 2019; Ansari et al., 2021). Однако информация о роли таких бактерий в ослаблении стресса от засухи у растений фрагментарна. Таким образом, основная цель настоящего исследования заключалась в оценке устойчивости к водному стрессу и высушиванию биопленок типового штамма *A. brasilense* Sp7 и его спонтанных вариантов с изменениями в структуре генома. В задачи исследования входили характеристика и анализ устойчивости биопленок к высушиванию, исследование влияния водного стресса на их формирование и физиологическую активность. В работе использованы описанные ранее спонтанные варианты штамма Sp7 с изменениями в структуре генома, затрагивающими плазмидные перестройки (Петрова и соавт., 2010; Кацы, Петрова, 2015). Поскольку фенотипические вариации влияют на широкий спектр свойств азоспирилл (Lerner et al., 2010; Петрова и соавт., 2010; Volfson et al., 2013; Кацы, Петрова, 2015), можно предположить, что устойчивость этих производных к водному стрессу/засухе может отличаться от устойчивости исходного штамма *A. brasilense* Sp7.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы бактерий и питательные среды.** В работе использовали: штамм *A. brasilense* Sp7, выделенный в Бразилии из ризосферы росички лежачей (IBPPM 150; Tarrand et al., 1978), его производные Sp7.4 (IBPPM 573) и Sp7.8 (IBPPM 576) (Петрова и соавт., 2010; Кацы, Петрова, 2015). В скобках приведены регистрационные номера штаммов в Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов, Россия; <http://collection.ibppm.ru/>). Бактерии культивировали при 30°C на малатно-солевой среде (МСС) (Döbereiner, Day, 1976) с 1 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . При необходимости из МСС исключали  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , добавляли агар (до концентрации 0.3, 0.4, 0.5 и 20%) или до 5 мМ L-триптофана. Для создания условий осмотического/водного стресса в среды добавляли непроницающий осмотический агент полиэтиленгликоль (ПЭГ) со средней молекулярной массой 6000 (Chutia, Borah, 2012). ПЭГ 6000 вносили до концентрации 5, 10, 15, 20 и 25%, что соответствует  $-0.05$  Мпа,  $-0.15$  Мпа,  $-0.30$  Мпа,  $-0.49$  Мпа или  $-0.73$  Мпа (Ansari et al., 2021).

**Определение подвижности бактерий и скорости роста планктонных культур в условиях перемешивания.** Ночные (18 ч) культуры бактерий разводили до значений  $A_{590} = 0.05-0.10$  ( $l = 0.5$  см) в стерильной среде МСС и инкубировали при 140 об./мин и температуре 30°C на шейкер-инкубаторе Excella E24 ("New Brunswick Scientific", США). Каждые 2 ч измеряли оптическую плотность бактериальной культуры при  $A_{590}$  ( $l = 0.5$  см).

Для изучения бактериальной подвижности из 24 ч планктонных культур готовили препарат "висячая" капля. Во время просмотра препаратов на микроскопе Leica DM6000 B ("Leica-Microsystems", Германия) вели видеозапись. Оценивали подвижность всех клеток в поле зрения микроскопа. Анализ видеоизображения выполняли с помощью компьютерной программы, разработанной в ИБФРМ РАН. Для изучения перемещения бактерий в полужидких средах их инокулировали уколом бактериальной петли в пластины МСС с 0.4% агара. Через 48–72 ч измеряли диаметр макроколоний, сформированных подвижными клетками.

**Анализ формирования биопленок и респираторной активности их биомассы.** Суточные (24-часовые) культуры азоспирилл из жидкой МСС с  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , выросшие в условиях аэрации, отмывали 50 мМ фосфатным буфером (ФБ) (рН 7.0), разводили свежей средой МСС с  $\text{NH}_4\text{Cl}$  или без него до значений  $A_{590} = 0.05-0.10$  ( $l = 0.5$  см). Среда с инокулятом вносили в стеклянные пробирки (по 2 мл) или ячейки полистирольных планшетов с 96 плоскодонными лунками (по 0.2 мл) и инкубировали при 30°C в стационарных условиях. В каче-



стве контроля в пробирки или ячейки планшетов вносили стерильные среды. Для оценки относительного количества биомассы в зрелых биопленках проводили их окрашивание кристаллическим фиолетовым (O'Toole, Kolter, 1998). К осторожно промытым дистиллированной водой биопленкам добавляли соответствующий объем (2 или 0.2 мл) 1% водного раствора кристаллического фиолетового, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и, после удаления раствора, опять промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в 2 или 0.2 мл этанола и измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 590 нм на фотокolorиметре КФК-2 ("Загорский оптико-механический завод", Россия) или фотометре микропланшетного формата Multiskan Ascent ("ThermoLabsystems", Финляндия). Уровень относительной респираторной активности клеток в биопленках определяли флуориметрическим резазурин-тестом, с модификациями. Из лунок планшета с биопленками отбирали планктонную культуру и вносили по 0.2 мл раствора AlamarBlue ("Sigma", США) в ФБ (рН 7.0) (0.01 г/л). Планшеты инкубировали 24 ч при температуре 30°C. Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse ("Agilent", США) при следующих параметрах: длина волны возбуждения 530 нм, длина волны эмиссии – 600 нм, ширина щели – 10 нм. Аналогичные манипуляции проводили с контрольными пробами.

Фазово-контрастную и просвечивающую электронную микроскопию биопленок, суспензий смытых биопленок и свободных клеток из планктонных культур выполняли на приборах, находящихся в ЦКП "Симбиоз" ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия): Leica DM6000 B ("Leica-Microsystems", Германия) и Libra 120 ("Carl Zeiss", Германия).

**Оценка содержания углеводсодержащих компонентов в матриксе биопленок.** Выделение компонентов матрикса проводили согласно рекомендациям, описанным в работе (Wang et al., 2017). Биомассу зрелых биопленок, сформированных на поверхности стекла, после удаления планктонных бактерий промывали 50 мМ ФБ (рН 7.0) и смывали пипетированием этим буфером, осаждали. Осадок дважды промывали ФБ (рН 7.0). Из отмытой биомассы экстрагировали компоненты матрикса 0.5 М ЭДТА кипячением в течение 10 мин при 100°C. Содержание в экстрактах углеводсодержащих компонентов определяли фенол-серным методом (Wang et al., 2017).

**Определение содержания индолил-3-уксусной кислоты (ИУК).** Биопленки выращивали под МСС с 5 мМ L-триптофана в течение 7 сут, перед окрашиванием пленок отбирали культуральную жидкость, центрифугировали, в надосадочной

жидкости определяли содержание ИУК. Анализ проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Dionex Ultimate 3000 ("Thermo Scientific", США) с использованием колонки Macherey-Nagel Nucleodur HТес С18, средний диаметр частиц 5 мкм с порами 100 Å, геометрия 150 × 3.0 мм ВЭЖХ.

Экстракт хроматографировали в условиях градиентного элюирования (растворитель А – ацетонитрил квалификации HPLC grade ("Panreac", Испания), растворитель В – раствор фосфорной кислоты (рН 2.5) в воде MilliQ), растворитель С – вода MilliQ: состав подвижной фазы изменялся следующим образом: 0–1 мин – 40% А, 30% В, 30% С; 1–4 мин – 70% А, 15% В, 15% С; 4–7 мин – 70% А, 15% В, 15% С; 7–8 мин – 40% А, 30% В, 30% С; 8–12 мин – 40% А, 30% В, 30% С. Время анализа составило 12 мин. Скорость потока 0.25 мл/мин. Объем вводимого образца 5 мкл. Детектирование осуществлялось при длине волны 280 нм. Управление хроматографом и анализ данных выполнялся программой Chromeleon версии 7.1.2.1478 ("Thermo Scientific", "Dionex", США). Идентификацию ИУК проводили сравнением времени удерживания и спектров поглощения с таковыми для стандартного образца. Количественное содержание в растворе устанавливали по калибровочной кривой с коэффициентом корреляции  $R^2 = 0.9997$  линейной аппроксимации точек в диапазоне концентраций 0.78–50.00 мкг/мл.

**Определение численности колониеобразующих единиц (КОЕ) в биопленках.** Зрелые биопленки осторожно промывали 50 мМ ФБ (рН 7.0). Определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в промытых нативных (не подвергавшимся каким-либо воздействиям) и сухих биопленках. В последнем случае промытые биопленки сушили при 30°C и хранили при 37°C (Шелудько и соавт., 2020). Для определения КОЕ в пробирки с биопленками вносили по 2 мл 50 мМ ФБ (рН 7.0), инкубировали 1 ч и смывали биомассу. Биомассу ресуспендировали в 50 мМ ФБ (рН 7.0) и 1 мин диспергировали на встряхивателе Vortex. Полученные суспензии контролировали при помощи световой микроскопии на присутствие в них клеточных агрегатов. Из полученной суспензии готовили серию десятикратных разведений и высевали из них по 100 мкл на плотную МСС. Результаты с учетом разведения пересчитывали на 2 мл, что соответствует смыву 1 биопленки. В качестве контроля использовали пробирки, в которых 7 сут инкубировали стерильную питательную среду. Результаты повторного проверочного окрашивания поверхности стекла опытных пробирок после смывания из них биопленок не отличались от контрольных значений и не превышали 0.04 ед.  $A_{590}$  ( $l = 0.5$  см), что свидетельствовало о полноте смывания биомассы биопленок.

**Анализ способности бактерий к колонизации корней проростков пшеницы.** Семена мягкой яровой пшеницы сорта Саратовская 29, полученные из ФГБНУ ФАНЦ Юго-Востока (Саратов, Россия), стерилизовали, проращивали в течение 3 сут и инокулировали, выдерживая проростки с покачиванием (25 об./мин) в суспензии бактерий ( $OP_{590} = 0.5$  ( $l = 0.5$  см)) в 50 мМ ФБ (рН 7.0), как описано ранее (Шелудько и соавт., 2010). Инокулированные проростки пшеницы однократно промывали стерильным 50 мМ ФБ (рН 7.0) и помещали над слоем жидкости в пробирки, содержащие 10 мл стерильной среды для растений следующего состава (г/л):  $KH_2PO_4 - 4$ ;  $CaCl_2 - 1.25$ ;  $H_3BO_3 - 0.0016$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O - 0.00025$ ;  $MgSO_4 - 0.09$ ;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O - 0.0025$ ;  $KJ - 0.008$ ;  $ZnSO_4 - 0.015$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O - 0.028$ ; этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль  $- 0.037$  (рН 6.0). В жидкой среде инокулированные растения выращивали еще 7 дней при 22°C и освещении с фотопериодом 16/8 ч. Распределение бактерий и образование биопленок на поверхности корней исследовали с использованием микроскопа Leica DM6000 B ("Leica Microsystems", Германия) или конфокального микроскопа (для микроскопии корни помещали в 50% глицерин на 50 мМ ФБ; рН 7.0).

Из навесок стерильно отмытых корней проростков готовили гомогенат, в котором определяли количество КОЕ посредством высева серийных десятикратных разведений на плотную МСС. Нулевое и первое разведение центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость, сушили при 30°C и хранили при 37°C. В этих образцах выявляли устойчивые к высушиванию клетки, как описано выше. Количество бактерий, высеваемых с корней, пересчитывали на одно растение. Контролировали наличие посторонней микрофлоры в гомогенатах корней. Образцы, в посевах с которых встречались колонии с нехарактерной для азоспирилл морфологией, отбрасывали.

**Определение морфометрических и морфофизиологических параметров пшеницы.** Для каждого растения определяли длину корневой системы (в мм), процент разветвленных корней (корни с боковыми отростками) в корневой системе и деформацию корневых волосков (при микроскопии определяли процент искривленных от общего числа волосков на 50–90 участков корня). Для определения сырой и сухой массы (в мг) корневую систему отделяли от надземной части, взвешивали и высушивали при 70°C до постоянного веса.

**Статистическая обработка результатов.** Во всех случаях количественных измерений проводили не менее трех независимых экспериментов как минимум в двух повторностях. Оценку биомассы биопленок каждого штамма выполняли не менее шести раз. Каждый раз окрашивали биопленки,

сформированные в пяти стеклянных пробирках. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010; доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости. Для выявления статистически значимых различий между средними значениями использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) при уровне значимости 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Исследование процесса формирования биопленок.** Сравнение роста штаммов *A. brasilense* Sp7, Sp7.4 и Sp7.8 в жидких средах показало, что при интенсивном перемешивании их планктонные культуры после 24 ч инкубации находятся в стационарной фазе роста. Клетки из этих культур несут полярный жгутик, при помощи которого в среднем  $85.5 \pm 2.2\%$  бактерий плавают со скоростью 28–30 мкм/с (табл. 1). В случае штамма Sp7.4 длина планктонных клеток больше, чем у Sp7 и Sp7.8 (рис. 1).

Охарактеризованные выше 24 ч планктонные культуры инокулировали в среду МСС с  $NH_4Cl$  или без него и инкубировали статично в стеклянных пробирках. При переходе планктонных клеток всех исследованных штаммов (рис. 1; 0 сут культивирования) к биопленочному существованию происходило увеличение длины клеток уже на этапе адсорбции/адгезии бактерий. В 7-дневных пленках длина клеток у штаммов Sp7 и Sp7.8 изменялась в зависимости от присутствия азота в среде (у Sp7.8 уменьшалась под средой с  $NH_4Cl$  и незначительно снижалась у Sp7 в условиях без азота). В случае Sp7.4 длина клеток увеличивалась на каждом этапе формирования биопленки под средой с  $NH_4Cl$  (рис. 1). На 7 сут культивирования все три штамма завершали процесс формирования биопленок на разделе жидкость–твердая поверхность (стабилизируется количество биомассы, образующей пленку). Сравнение биомассы в зрелых пленках показывало, что ее количество зависело от наличия  $NH_4Cl$  в среде у штаммов Sp7 и Sp7.8, но не уступало показателям Sp7.4 (табл. 2, столбцы а). Биопленки Sp7, Sp7.4 и Sp7.8 содержали примерно одинаковое количество бактерий, способных формировать КОЕ на плотных агаризованных средах. В смывах из пробирок с биопленками число КОЕ незначительно варьировало в пределах порядка  $10^{10}$  (КОЕ в биопленке, сформированной в 1 пробирке), независимо от количества биомассы биопленок и/или наличия источника связанного азота в среде (табл. 2, столбцы а, б).

Также в биопленках оценили численность клеточных форм, устойчивых к высушиванию. Биопленки, выращенные на МСС с  $NH_4Cl$  и без него (содержали  $10^{10}$  КОЕ; табл. 2, столбец б), были высушены при 30°C и заложены на хранение

**Таблица 1.** Влияние ПЭГ 6000 на клетки из планктонных культур *A. brasilense* и роение бактерий на полужидких средах

| Штамм | 24 ч культивирования в жидкой МСМ при перемешивании                  |                    |                      |                   |                   |                   |                                 |                   |      | (в)  |                  |                   |                   |                   |                   |
|-------|--|--------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|------|--|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|       | (а)  |                    |                      |                   |                   |                   | (б)                             |                   |      | * диаметр макроколоний, сформированных бактериями за 72 ч инкубации в МСМ с агаром |                  |                   |                   |                   |                   |
|       | отношение $A_{590}$ культуры с ПЭГ к $A_{590}$ культуры без ПЭГ, в % |                    |                      |                   |                   |                   | скорость движения клеток, мкм/с |                   |      | 0.3%   |                  | 0.4%              |                   | 0.5%              |                   |
|       | ПЭГ 6000, %  |                    |                      |                   |                   |                   |                                 |                   |      | ПЭГ 6000, %  |                  |                   |                   |                   |                   |
|       | 0  | 5                  | 10                   | 15                | 20                | 25                | 0                               | 5                 | 10   | 0  | 5                | 0                 | 5                 | 0                 | 5                 |
| Sp7   | 100.0 ± ± 0.5<br>г   | 64.6 ± ± 13.0<br>в | 40.2 ± ± 6.6<br>б    | 30.5 ± ± 2.2<br>б | 12.5 ± ± 1.6<br>а | 12.4 ± ± 1.8<br>а | 30.1 ± ± 1.5<br>б               | 23.0 ± ± 0.9<br>а | Н.п. | 31.9 ± ± 1.8<br>б  | 3.8 ± ± 0.5<br>а | 22.9 ± ± 2.2<br>б | 12.7 ± ± 1.7<br>а | 13.9 ± ± 1.4<br>б | 11.0 ± ± 0.8<br>а |
| Sp7.4 | 100.0 ± ± 4.2<br>в   | 92.0 ± ± 4.2<br>в  | 88.0 ± ± 4.9<br>в, б | 78.2 ± ± 7.6<br>б | 43.7 ± ± 3.4<br>а | 43.5 ± ± 2.4<br>а | 28.3 ± ± 1.6<br>б               | 23.1 ± ± 1.2<br>а | Н.п. | 35.8 ± ± 1.9<br>б  | 3.9 ± ± 0.3<br>а | 26.5 ± ± 2.4<br>б | 10.4 ± ± 0.9<br>а | 18.7 ± ± 2.8<br>б | 10.2 ± ± 1.4<br>а |
| Sp7.8 | 100.0 ± ± 5.4<br>в   | 67.1 ± ± 7.5<br>б  | 58.5 ± ± 2.7<br>б    | 52.5 ± ± 3.1<br>б | 20.6 ± ± 3.6<br>а | 19.5 ± ± 0.5<br>а | 29.3 ± ± 1.3<br>б               | 22.4 ± ± 1.1<br>а | Н.п. | 37.1 ± ± 1.5<br>б  | 3.8 ± ± 0.2<br>а | 27.0 ± ± 2.2<br>б | 11.4 ± ± 1.0<br>а | 18.4 ± ± 1.6<br>б | 10.5 ± ± 1.0<br>а |

Примечание. \* Диаметр зоны инокуляции составлял  $3.8 \pm 0.2$  мм. Н.п. – не перемещаются. Результаты однофакторного дисперсионного (ANOVA) анализа представлены строчными буквами; разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними. В колонках (а–в) сравнения проводили в строках; а или а – средние значения с наименьшей величиной.

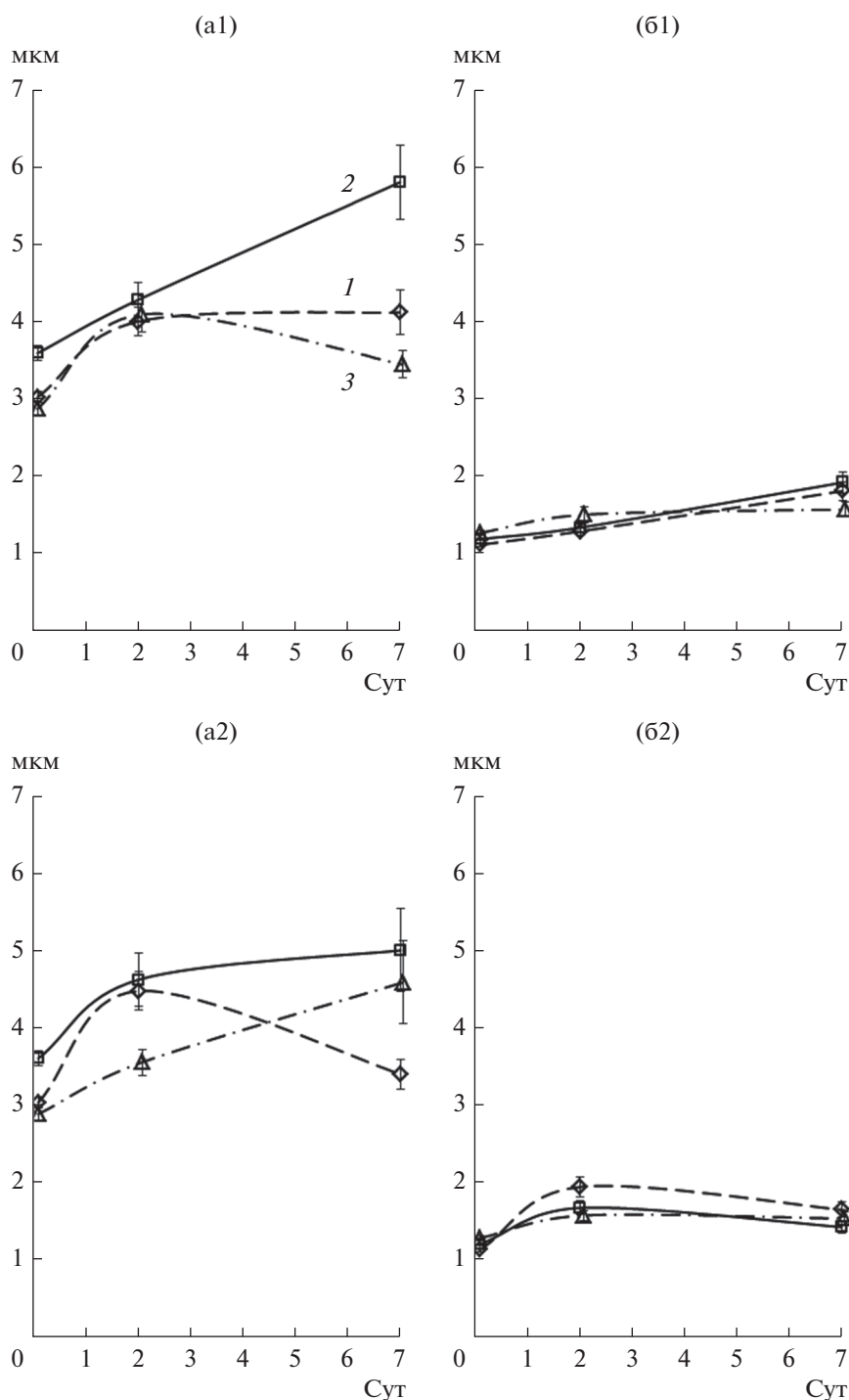
при 37°C. Через 10 сут хранения КОЕ были обнаружены в биопленках всех трех штаммов. Максимальная численность  $10^4$  КОЕ/биопленка сохранялась в пленках Sp7, выращенных в среде без источника связанного азота. В аналогичных условиях биопленки Sp7.8 содержали  $10^3$  КОЕ, а на среде с  $\text{NH}_4\text{Cl}$  этот показатель возрастал у этого штамма до  $10^4$  (табл. 2, столбец в). В среде с  $\text{NH}_4\text{Cl}$  у Sp7 количество КОЕ снижается более чем на порядок (табл. 2, столбец в). В случае штамма Sp7.4 биопленки содержали минимальное число КОЕ ( $10^1$ ), независимо от содержания азота в среде. Необходимо отметить, что бактериальные формы, устойчивые к высушиванию, являются частью системы механизмов, способствующих выживанию микробной популяции в условиях засухи/водного стресса (Berg et al., 1980; Sadasivan et al., 1987; Malinich, Bauer, 2018; Шелудько и соавт., 2020).

**Анализ влияния осмотического стресса на формирование бактериями биопленок.** Для создания модели осмотического/водного стресса использовали непроникающий осмотический агент полиэтиленгликоль (ПЭГ) со средним молекулярным весом 6000. Присутствие ПЭГ приводит к снижению водного потенциала среды и блокированию поглощения воды бактериями или корнями растений (Chutia, Borah, 2012; Ansari et al., 2021). Такой подход позволяет обеспечить стабильное снижение уровня водного потенциала в течение любых желаемых периодов времени и

моделировать влияние условий засухи на бактериальную популяцию и растения (Chutia, Borah, 2012; Ansari et al., 2021).

На начальном этапе оценивали влияние различных концентраций ПЭГ 6000 на рост планктонных культур Sp7, Sp7.4 и Sp7.8 в жидкой МСМ среде при перемешивании. За ростом наблюдали в течение 24 ч. Снижение показателей роста планктонных культур ( $A_{590}$  бактериальной культуры) на 50% и более происходит в присутствии 10% ПЭГ в случае штамма Sp7 и 20% ПЭГ у штаммов Sp7.4 и Sp7.8 по сравнению с показателями, характеризующими рост культур, сформированных без ПЭГ ( $A_{590}$  бактериальной культуры без ПЭГ) (табл. 1). Показатели роста планктонных культур Sp7.4 в присутствии всех использованных концентраций ПЭГ превышали значения, характерные для культур Sp7 и Sp7.8 (табл. 1). Возможно, устойчивость роста планктонных культур Sp7.4 к осмотическому стрессу обусловлены морфологией клеток этого штамма (рис. 1).

Присутствие ПЭГ влияло на подвижность азоспирилл. Так, в присутствии 5% ПЭГ существенно снижалась скорость движения плавающих клеток Sp7, Sp7.4 и Sp7.8 (табл. 1). Дальнейшее повышение концентрации ПЭГ (10–25%) блокировало подвижность планктонных клеток. ПЭГ также негативно влиял на формирование макроколоний бактериями всех исследованных штаммов на полужидких агаризованных средах (табл. 1). На полужидкой среде, содержащей 0.3% агара, ПЭГ



**Рис. 1.** Изменение длины (а) и ширины (б) клеток в биопленках, формируемых штаммами *A. brasilense* Sp7 (1), Sp7.4 (2) и Sp7.8 (3), на стекле под жидкой МСС с  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1) или без связанного азота (2) в течение 7 сут. 0 сут культивирования – размер планктонных клеток, использованных для инокуляции.

в концентрации 5% блокировал подвижность плавающих клеток (клетки оставались в точке инокуляции в полужидкую среду) (табл. 1). При увеличении плотности агара до 0.4–0.5% азоспириллы перемещались в присутствии 5% ПЭГ, формируя колонии роящихся бактерий, хотя и

меньшего диаметра, чем в контроле без стресса (табл. 1).

Анализ формирования азоспириллами биопленок в условиях водного стресса (в присутствии ПЭГ) показал, что концентрация ПЭГ по-

**Таблица 2.** Влияние NH<sub>4</sub>Cl в среде МСС на относительное количество биомассы биопленок *A. brasilense* (а, д) и ее характеристика (б–г, е)

| Штамм | Сформированные за 7 сут культивирования под жидкой МСС на стекле биопленки   |                     |  |                     |   |                                    |   |                     |  |                     |                                 |                     |
|-------|--|---------------------|--|---------------------|---|------------------------------------|---|---------------------|--|---------------------|---------------------------------|---------------------|
|       | (а)<br><i>A</i> <sub>590</sub><br>кристаллического<br>фиолетового,<br>десорбированного<br>после окрашивания<br>биопленок |                     | (б)<br>* количество<br>КОЕ × 10 <sup>10</sup><br>в нативной<br>биопленке |                     | (в)<br>** количество КОЕ в<br>сухой биопленке |                                    | (г)<br>содержание<br>гликополимеров в<br>матрикса,<br>мкг/биопленка |                     | МСС + L-триптофан, 5 мМ  |                     |                                 |                     |
|       |  |                     |  |                     |   |                                    |   |                     | (д)<br><i>A</i> <sub>590</sub><br>кристаллического<br>фиолетового,<br>десорбированного<br>после окрашивания<br>биопленок |                     | (е)<br>продукция ИУК,<br>мкг/мл |                     |
|       | +NH <sub>4</sub> Cl  | -NH <sub>4</sub> Cl | + NH <sub>4</sub> Cl   | -NH <sub>4</sub> Cl | +NH <sub>4</sub> Cl                           | -NH <sub>4</sub> Cl                | +NH <sub>4</sub> Cl   | -NH <sub>4</sub> Cl | +NH <sub>4</sub> Cl  | -NH <sub>4</sub> Cl | +NH <sub>4</sub> Cl             | -NH <sub>4</sub> Cl |
| Sp7   | 0.79 ± 0.09<br>а   | 1.00 ± 0.08<br>б    | 1.3 ± 0.2  | 3.2 ± 0.5           | (2.5 ± 0.5) ×<br>× 10 <sup>1</sup>            | (4.4 ± 0.7) ×<br>× 10 <sup>4</sup> | 72.4 ± 9.6<br>Б   | 44.8 ± 4.7<br>Б     | 0.57 ± 0.13<br>А   | 0.58 ± 0.07<br>А    | 23.8 ± 5.2<br>А                 | 16.0 ± 0.7<br>А     |
| Sp7.4 | 0.75 ± 0.10<br>а   | 0.81 ± 0.10<br>а    | 1.0 ± 0.2  | 1.3 ± 0.4           | (2.3 ± 0.7) ×<br>× 10 <sup>1</sup>            | (2.3 ± 0.6) ×<br>× 10 <sup>1</sup> | 27.6 ± 3.0<br>А   | 36.3 ± 3.5<br>А     | 0.67 ± 0.14<br>А, Б  | 0.72 ± 0.16<br>Б    | 20.0 ± 2.4<br>А                 | 24.4 ± 2.8<br>Б     |
| Sp7.8 | 1.05 ± 0.09<br>б   | 0.80 ± 0.12<br>а    | 2.4 ± 0.4  | 1.3 ± 0.3           | (1.8 ± 0.3) ×<br>× 10 <sup>4</sup>            | (2.5 ± 0.9) ×<br>× 10 <sup>3</sup> | 66.8 ± 11.4<br>Б  | 43.3 ± 4.0<br>Б     | 0.86 ± 0.08<br>Б   | 0.55 ± 0.12<br>А    | 20.1 ± 4.5<br>А                 | 16.4 ± 0.6<br>А     |

Примечание. \* Биомассу биопленки смывали 2 мл 50 мМ ФБ (рН 7.0), в полученной суспензии определяли КОЕ. \*\* 7-ми дневные биопленки высушили и хранили 10 сут при 37°C, биомассу смывали 2 мл 50 мМ ФБ (рН 7.0), в полученной суспензии определяли КОЕ. Результаты однофакторного дисперсионного (ANOVA) анализа представлены заглавными или строчными буквами; разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними. В колонке (а) сравнения проводили в строке, в колонках (в–е) сравнения проводили в столбце; а, А или А – средние значения с наименьшей величиной.

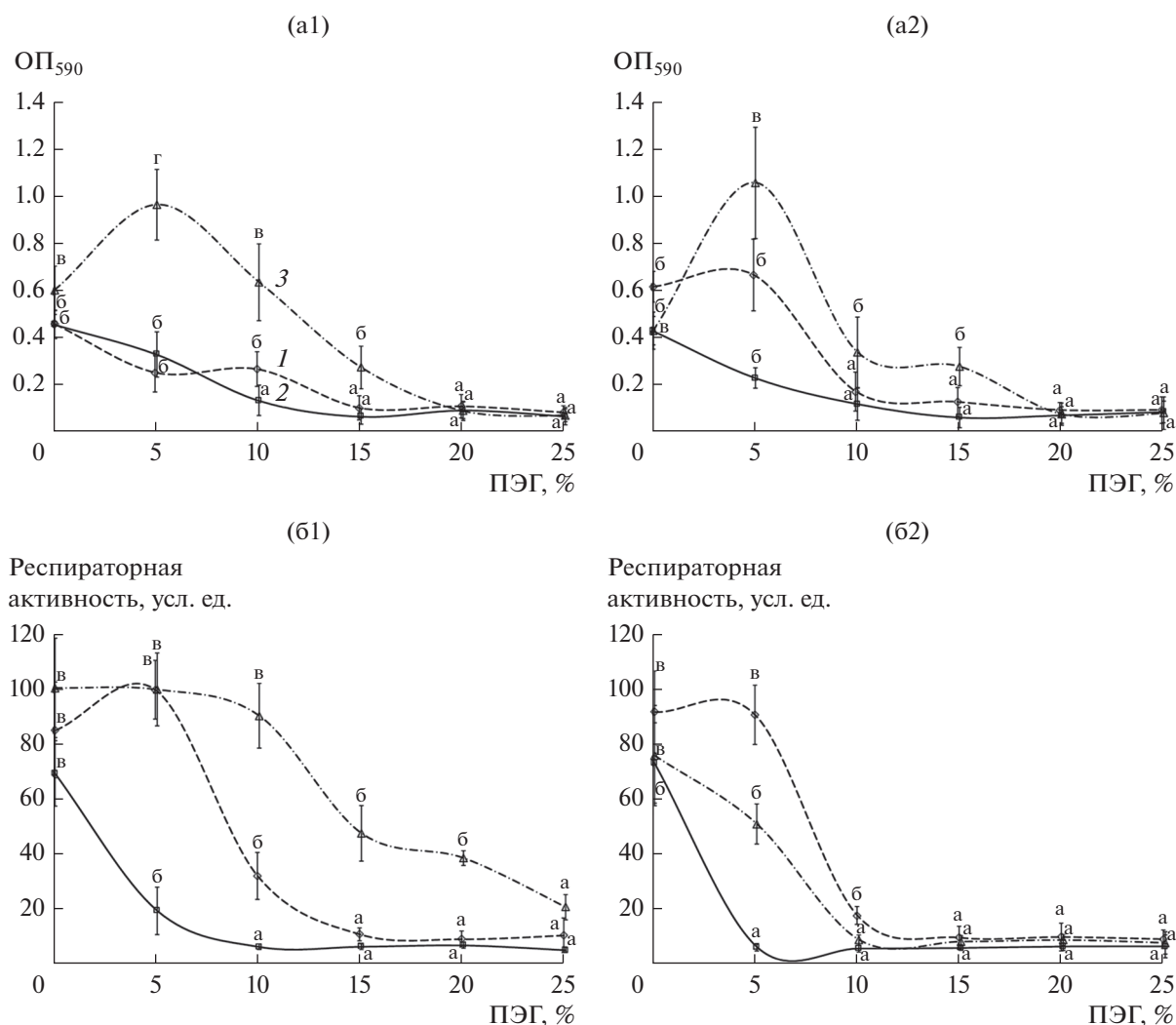
разному влияет на накопление биомассы в биопленках разных штаммов исследуемых микроорганизмов (рис. 2а). Штаммы Sp7 и Sp7.4 формировали биопленки с минимальным количеством биомассы под МСС с NH<sub>4</sub>Cl, содержащей от 15 или от 10% ПЭГ соответственно. Под средой без азота оба штамма накапливали минимальное количество биомассы в присутствии ПЭГ от 10% (рис. 2а). В случае Sp7.8, независимо от присутствия NH<sub>4</sub>Cl, меньше всего биомассы накапливалось в пленках, сформированных под МСС с концентрацией ПЭГ от 20%. Под средой с 5% ПЭГ биопленки этого штамма содержали даже больше биомассы, чем в контроле без стресса. Вариант Sp7.8, формируя биопленки в присутствии ПЭГ (5–15%), накапливал больше биомассы, чем штаммы Sp7 и Sp7.4 (рис. 2а).

**Анализ влияния осмотического стресса на респираторную активность биопленок азоспирилл.** В другой серии экспериментов было исследовано влияние ПЭГ на уже сформированные (после 7 сут культивирования) биопленки. Зрелые биопленки инкубировали со средами, содержащими различные концентрации ПЭГ, в течение 10 дней. Затем измеряли респираторную активность биомассы биопленок (показатель метаболической активности клеток; Петрова и соавт., 2021). В биопленках Sp7, сформированных под средой с азотом, снижение респираторной активности более чем на 70% по сравнению с контролем (без стресса) происходило при концентрации ПЭГ в среде 15–25% (рис. 2б). У зрелых биопленок Sp7.8 из среды с

азотом существенное уменьшение респираторной активности наступало после их инкубации с 25% ПЭГ (рис. 2б). В пленках Sp7 и Sp7.8, образованных под МСС без азота, уменьшение дыхательной активности на аналогичную величину случалось при инкубации с ПЭГ в концентрации от 10%. В случае Sp7.4 снижение уровня респираторной активности (более чем на 70%) происходило в присутствии 5% ПЭГ, независимо от наличия азота в среде (рис. 2б).

Необходимо отметить, что уровень метаболической активности в пленках Sp7.8, сформированных без стресса под средой с азотом, превосходил аналогичные показатели у родительского штамма или варианта Sp7.4 в присутствии всех исследованных концентраций ПЭГ (рис. 2б). Подобный ответ на присутствие ПЭГ был характерен для пленок Sp7, сформированных под средой без азота (рис. 2б).

Определенный вклад в устойчивость азоспирилл к водному стрессу могут вносить углеводсодержащие составляющие матрикса (Vurukonda et al., 2016; Шелудько и соавт., 2018; Gannesen et al., 2019), которые в биопленках являются частью многокомпонентной системы, опосредующей сродство пленок азоспирилл к различным субстратам и их структурную целостность (Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2018). Оценка содержания углеводсодержащих компонентов в матрикса, полученном из смывтой с поверхности стекла биомассы биопленок, показала, что из биопленок Sp7.4, по сравнению с Sp7 и Sp7.8, экстрагировалось меньше углеводов со-



**Рис. 2.** Влияние ПЭГ 6000 на формирование под жидкой средой штаммами *A. brasilense* Sp7 (1), Sp7.4 (2) и Sp7.8 (3) биопленок (а) и респираторную активность (б) сформированных без стресса пленок. Использовали среду МСС с  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1) или без связанного азота (2). Относительное количество биомассы биопленок, сформированных за 7 сут, оценивали, измеряя  $A_{590}$  кристаллического фиолетового, десорбированного после ее окрашивания. Респираторную активность биомассы 7-ми сут биопленок, сформированных без стресса, определяли после их культивирования в течение 10 сут с ПЭГ 6000. Результаты однофакторного дисперсионного (ANOVA) анализа представлены строчными буквами; разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними. Анализировали влияние ПЭГ на средние значения измеряемых параметров штамма. а – средние значения с наименьшей величиной.

ставляющих, независимо от наличия азота в среде выращивания пленок (табл. 2). Бактерии из нативных биопленок этого штамма оказались наиболее чувствительными к негативному влиянию ПЭГ (рис. 2б).

**Анализ адаптации штамма *A. brasilense* Sp7 и его производных к существованию в корневой системе проростков пшеницы.** Количество клеток *A. brasilense*, прикрепившихся к корням, стабилизировалось в течение 3 ч инкубации суспензии бактерий с трехсуточными проростками пшеницы. Число адсорбированных клеток Sp7, Sp7.4 и Sp7.8 варьировало в пределах порядка  $10^7$  КОЕ/растение (табл. 3).

После инокуляции штаммами Sp7, Sp7.4 и Sp7.8 через 6–7 сут бактерии формировали моно- и многослойные биопленки на поверхности клеток эпидермиса корня. В зоне всасывания встречались корневые волоски, покрытые биопленками вдоль всей поверхности, бактериальные пленки располагались у мест соединения корневых волосков с поверхностью корня, на кончике корневого волоска (рис. 3).

Охарактеризована численность устойчивых к высушиванию клеток Sp7, Sp7.4 и Sp7.8, заселивших корни проростков пшеницы и сформировавших там биопленки (гомогенаты инокулированных корней были высушены при  $30^\circ\text{C}$  и заложены

Таблица 3. Влияние инокуляции *A. brasilense* на корневую систему проростков пшеницы

| Штамм | Число прикрепившихся бактерий   | Проросток после 7-ми дней культивирования с бактериями |   |                          |                 |                |                                |  |
|-------|---|--|---|--------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------|--|
|       | (а)<br>КОЕ × 10 <sup>7</sup> ,<br>высеваемые из<br>корневой<br>системы 3-х<br>дневных<br>проростков | высеваемые из<br>корневой системы                      |   | (г)<br>морфология корней |                 |                |                                |  |
|       |   | (б)<br>КОЕ × 10 <sup>9</sup><br>(нативные<br>корни)    | (в)<br>КОЕ × 10 <sup>5</sup><br>(сухие<br>корни*) | длина<br>корней, мм      | биомасса, мг    |                | развет-<br>вленные<br>корни, % | деформи-<br>рованные<br>корневые<br>волоски, % |
| сырая | сухая   |  |   |                          |                 |                |                                |  |
| к**   | 0   | 0  | 0   | 56.3 ± 10.5<br>Б         | 26.4 ± 4.4<br>А | 5.2 ± 0.3<br>А | 36.7 ± 4.1<br>А                | 16.3 ± 1.6<br>А                                |
| Sp7   | 3.1 ± 0.5   | 3.1 ± 0.4  | 1.3 ± 0.3   | 35.7 ± 7.0<br>А          | 32.5 ± 3.3<br>Б | 5.1 ± 0.3<br>А | 55.4 ± 4.1<br>Б                | 37.3 ± 2.8<br>Б                                |
| Sp7.4 | 1.3 ± 0.3   | 1.3 ± 0.3  | 0.4 ± 0.04  | 38.6 ± 6.7<br>А          | 37.9 ± 5.1<br>Б | 5.7 ± 0.3<br>Б | 52.4 ± 3.1<br>Б                | 35.6 ± 2.7<br>Б                                |
| Sp7.8 | 1.4 ± 0.3   | 2.0 ± 0.3  | 1.3 ± 0.2   | 43.4 ± 7.7<br>А          | 36.3 ± 4.5<br>Б | 5.5 ± 0.3<br>Б | 56.7 ± 3.0<br>Б                | 41.3 ± 2.6<br>В                                |

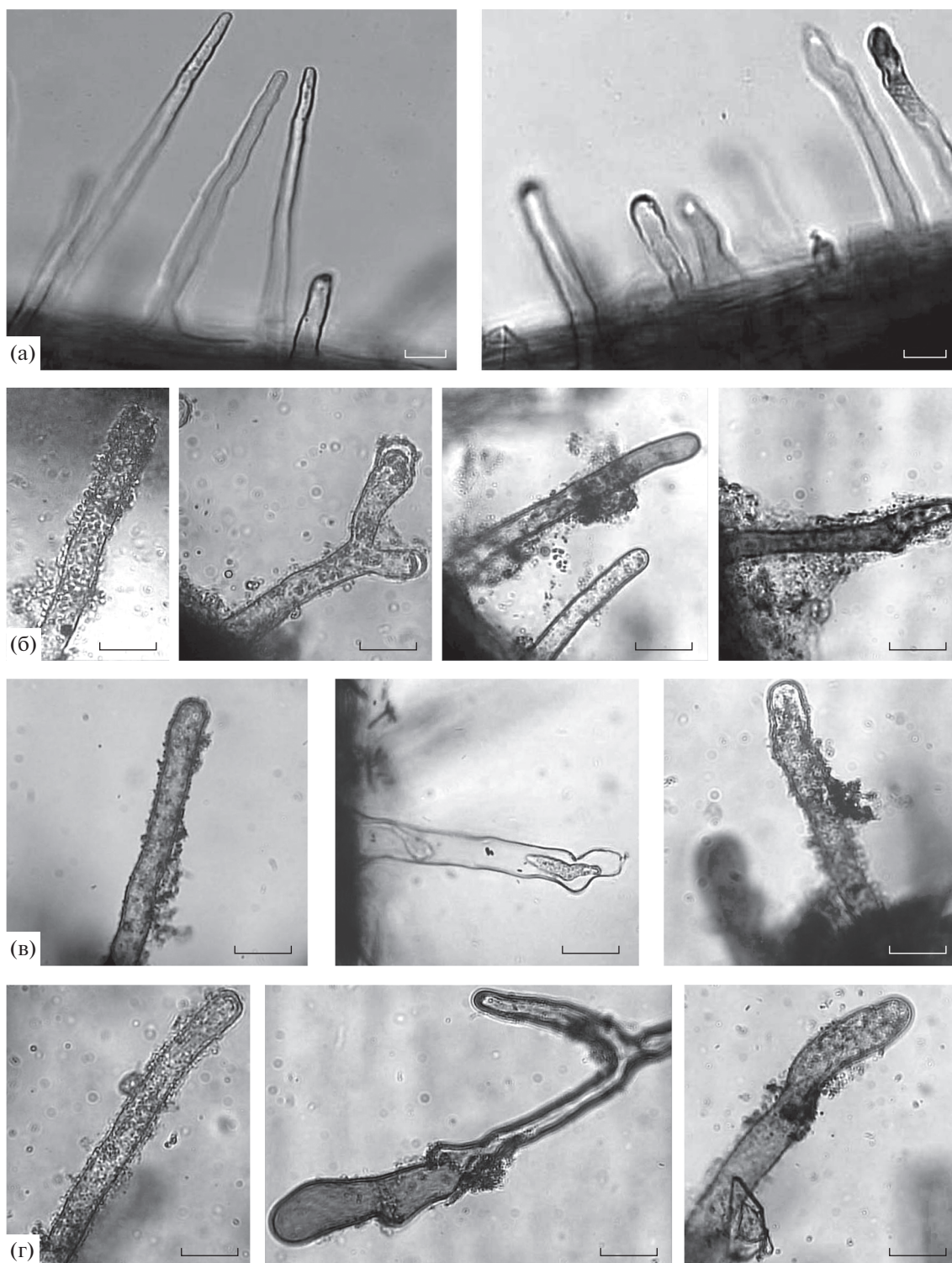
Примечание. \* Сухие корни, хранившиеся 7 сут при 37°C. \*\* Стерильные растения. Результаты однофакторного дисперсионного (ANOVA) анализа в колонке (г) представлены строчными буквами; разными буквами обозначены статистически значимые различия между средними. Сравнения проводили в столбце. А или А – средние значения с наименьшей величиной.

на хранение при 37°C). Сухие корни после 10 сут хранения содержали 10<sup>5</sup> КОЕ Sp7 или Sp7.8 и 10<sup>4</sup> КОЕ в случае Sp7.4 (нативные корни до высушивания содержали 10<sup>9</sup> КОЕ) (табл. 3). Для биопленок, сформированных на абиотической поверхности под МСС, наблюдалась более выраженная тенденция снижения численности клеток в сухих образцах (табл. 2). Вероятно, у азоспирилл, адаптировавшихся к корневой системе растений, формируется больше клеточных форм, устойчивых к высушиванию (или в этих условиях потенциал устойчивости клеток к данному виду стресса возрастает), по сравнению с бактериями из биопленок, сформировавшимися в абиотических условиях – на стекле под МСС.

Присутствие всех исследованных штаммов азоспирилл в корневой системе проростков вызывало уменьшение ее длины, увеличение числа разветвленных корней и деформированных корневых волосков (табл. 3, рис. 3). В корневой системе перечисленные эффекты могли вызывать продуцируемые биопленками штаммов Sp7, Sp7.4 и Sp7.8 полисахариды, ИУК или другие фитогормоны, модулирующие влияние которых хорошо охарактеризовано для азоспирилл (Федоненко и соавт., 2004; Fibach-Paldi et al., 2012; Vurukonda et al., 2016; Fukami et al., 2018). Биопленки всех трех штаммов продуцировали сходное количество ИУК (табл. 2, столбцы г, е).

Бактерии вида *A. brasilense* имеют многокомпонентный геном, нередко претерпевающий спонтанные перестройки, в частности, приводящие к изменению плазмидных профилей штаммов. Перестройки в ДНК, в том числе изменение плазмидного профиля азоспирилл, могут затрагивать: морфологию колоний, агрегацию клеток и подвижность; синтез капсулы и пигментов; продукцию экзополисахаридов (ЭПС) и липополисахаридов (ЛПС), различных метаболитов; устойчивость к солевому стрессу, ампициллину и поверхностно-активным веществам; способность к утилизации углеводов (Lerner et al., 2010; Петрова и соавт., 2010; Volfson et al., 2013; Кацы, Петрова, 2015). Типовой штамм *A. brasilense* Sp7 имеет плазмиды с молекулярной массой 90 (pRhico), 115 (p115) и более 300 МДа. У использованных в настоящей работе спонтанных вариантов *A. brasilense* Sp7.4 и Sp7.8 отсутствовала 115-МДа плазида и изменилась кажущаяся молекулярная масса pRhico, составляющая соответственно ~131 и 124 МДа (Петрова и соавт., 2010; Кацы, Петрова, 2015). В настоящем исследовании мы наблюдали, что спонтанные варианты *A. brasilense* Sp7.4 и Sp7.8, так же как и родительский штамм, колонизировали корни, формировали на них биопленки и оказывали влияние на морфологию корневой системы. Биопленки вариантов, как и Sp7, продуцировали полисахариды и фитогормон ИУК. Адаптируясь в корневой системе проростков пшеницы, все три штамма фор-





**Рис. 3.** Морфология корневых волосков в корневой системе стерильных (а) и инокулированных штаммами *A. brasilense* Sp7 (б), Sp7.4 (в) и Sp7.8 (г) проростков пшеницы после 7 дней культивирования в жидкой среде. Масштабная метка – 25 мкм.

мировали клеточные формы, устойчивые к высушиванию. Клеточные формы, устойчивые к высушиванию, являются частью системы механизмов,

способствующих выживанию микробной популяции в условиях водного стресса. Такие клетки у азоспирилл охарактеризованы как цистоподоб-



ные формы (ЦП-формы) (Sadasivan et al., 1987; Malinich, Bauer, 2018; Шелудько и соавт., 2020). ЦП-формы азоспирилл сравнивают с цистами азотобактера (Berg et al., 1980). Заметным отличием ЦП-форм *Azospirillum* от цист *Azotobacter* является отсутствие четкой дифференциации внешнего слоя на экзину и интину (Berg et al., 1980). В биопленках *A. brasilense* Sp7 для ЦП-форм характерен морфологический и функциональный полиморфизм (Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2020). Очевидно, в сухих биопленках после гибели вегетативных клеток (Sadasivan et al., 1987; Malinich, Bauer, 2018; Шелудько, 2020) жизнеспособность сохраняется только у цистоподобных форм.

В условиях, моделирующих осмотический/водный стресс, подавлялась подвижность планктонных и роящихся клеток штаммов Sp7, Sp7.4 и Sp7.8. Непроницающий осмотический агент ПЭГ, использованный для создания условий осмотического стресса, в концентрации 10% блокировал движение клеток, плавающих при помощи полярного жгутика (Fla) в жидкой планктонной культуре. ПЭГ в концентрации 5% подавлял скорость плавающих бактерий в планктонной культуре, а на полужидкой среде, содержащей 0.3% агара, блокировал. При увеличении плотности агара до 0.4–0.5% азоспириллы синтезируют дополнительно многочисленные латеральные жгутики (Laf) (Petrova et al., 2020). Бактерии на этих средах продолжают перемещаться в присутствии 5% ПЭГ, формируя колонии роящихся клеток, но меньшего диаметра, чем в контроле без стресса.

При достаточной влажности ризосферные микроорганизмы слабо адсорбируются на поверхности частиц почвы и, следовательно, могут перемещаться к корням растений (Oliveira et al., 2004). Так, азоспириллы при 20% влажности почвы мигрируют от растения к растению (Bashan, 1986). Экспериментальная модель, в которой для стабильного и воспроизводимого снижения водного потенциала используется агаризованная среда с инфузией ПЭГ, близка к агрономическим засухе/водному стрессу в почве (Frolov et al., 2017).

ПЭГ в концентрациях, подавляющих/блокирующих подвижность плавающих/роящихся бактерий (5–10%), не оказывал значительного влияния на способность Sp7 и Sp7.8 формировать биопленки и не ингибировал метаболическую активность клеток этих штаммов в биопленках, сформированных без стресса. Показатели, характеризующие устойчивость биопленок спонтанного варианта Sp7.8 к условиям осмотического стресса/высушиванию, превосходили аналогичные параметры у родительского штамма или варианта Sp7.4. Биопленки Sp7.4 оказались наиболее восприимчивыми к негативному влиянию осмотического стресса, однако при тех же концентрациях

ПЭГ планктонные культуры этого штамма росли лучше, чем культуры Sp7 и Sp7.8.

Типовой штамм *A. brasilense* Sp7 используют в качестве модели в исследованиях, направленных на подбор ризосферных бактерий, способных повышать устойчивость злаковых культур к негативному влиянию засухи/водного стресса (Notununu et al., 2022). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что бактерии этого штамма формируют биопленки в условиях негативного воздействия осмотического/водного стресса. В биопленках клетки *A. brasilense* Sp7 приспосабливаются к условиям, моделирующим засуху/изменение водного режима. Таким образом, наши результаты анализа устойчивости биопленок *A. brasilense* Sp7 к осмотическому стрессу и имеющиеся литературные данные (Ansari, Ahmad, 2019; Ansari et al., 2021) позволяют использовать данный признак при отборе ризобактерий, перспективных для применения в борьбе со стрессом растений, обусловленном засухой. Варианты *A. brasilense* Sp7.4 и Sp7.8, являющиеся производными *A. brasilense* Sp7, интересны для дальнейших исследований, направленных на отбор перспективных штаммов, повышающих устойчивость растений к засухе.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Центру коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН (Саратов, Россия). Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00006-а. Оценка респираторной активности клеток выполнена при частичной финансовой поддержке Саратовского государственного медицинского университета в рамках проекта № SSMU-2021-001.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кацы Е.И., Петрова Л.П. Геномные перестройки у *Azospirillum brasilense* Sp7 с участием плазмиды pRhico и профага ФАб-Сд // Генетика. 2015. Т. 51. С. 1351–1358.
- Katsy E.I., Petrova L.P. Genome rearrangements in *Azospirillum brasilense* Sp7 with the involvement of the plasmid pRhico and the prophage ФАб-Сд // Russ. J. Genet. 2015. V. 51. P. 1165–1171.

- Петрова Л.П., Шелудько А.В., Кацы Е.И. Плазмидные перестройки и изменения в формировании биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 129–132.
- Petrova L.P., Shelud'ko A.V., Katsy E.I. Plasmid rearrangements and alterations in *Azospirillum brasilense* biofilm formation // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 121–124.
- Петрова Л.П., Филипьевичева Ю.А., Телешева Е.М., Пылаев Т.Е., Шелудько А.В. Изменения в синтезе липополисахарида влияют на формирование биопленок *Azospirillum baldaniorum* in planta в условиях повышенного содержания меди // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 459–470.
- Petrova L.P., Filip'cheva Yu.A., Telesheva E.M., Pylaev T.E., Shelud'ko A.V. Variations in lipopolysaccharide synthesis affect formation of *Azospirillum baldaniorum* biofilms in planta at elevated copper content // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 470–480.
- Федоненко Ю.П., Здорovenko Э.Л., Коннова С.А., Игнатов В.В., Шляхтин Г.В. Сравнительная характеристика липополисахаридов и O-специфических полисахаридов *Azospirillum brasilense* Sp245 и его омегон-Км мутантов КМ018 и КМ252 // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 180–187.
- Fedonenko Yu.P., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Shlyakhtin G.V. A comparison of the lipopolysaccharides and O-specific polysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp245 and its omegon-Km mutants КМ018 and КМ252 // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 143–149.
- Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корневой пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 696–704.
- Shelud'ko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 688–695.
- Шелудько А.В., Филипьевичева Ю.А., Телешева Е.М., Буров А.М., Евстигнеева С.С., Бурыйгин Г.Л., Петрова Л.П. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 483–494.
- Shelud'ko A.V., Filip'cheva Yu.A., Telesheva E.M., Burov A.M., Evstigneeva S.S., Burygin G.L., Petrova L.P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 610–620.
- Шелудько А.В., Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Филипьевичева Ю.А., Буров А.М., Петрова Л.П., Пономарева Е.Г., Кацы Е.И. Анализ ультраструктуры клеток в составе биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 59–73.
- Shelud'ko A.V., Mokeev D.I., Evstigneeva S.S., Filip'cheva Yu.A., Burov A.M., Petrova L.P., Ponomareva E.G., Katsy E.I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 50–63.
- Ansari F.A., Ahmad I. Fluorescent *Pseudomonas*-FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 4547.
- Ansari F.A., Jabeen M., Ahmad I. *Pseudomonas azotoformans* FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant // Int. J. Environ. Sci. Technol. 2021. V. 18. P. 3855–3870.
- Bashan Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. P. 3407–3414.
- Berg R.H., Tyler M.E., Novick N.J., Vasil V., Vasil I.K. Biology of *Azospirillum*-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity // Appl. Environ. Microbiol. 1980. V. 39. P. 642–649.
- Bogino P.C., Oliva M.M., Sorroche F.G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 15838–15859.
- Chutia J., Borah S.P. Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India: II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress // Am. J. Plant Sci. 2012. V. 3. P. 971–980.
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symposium on Nitrogen Fixation / Eds. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
- Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2012. V. 326. P. 99–108.
- Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623–633.
- Frolov A., Bilova T., Paudel G., Berger R., Balcke G.U., Birkemeyer C., Wessjohann L.A. Early responses of mature *Arabidopsis thaliana* plants to reduced water potential in the agar-based polyethylene glycol infusion drought model // J. Plant Physiol. 2017. V. 208. P. 70–83.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation // AMB Expr. 2018. V. 8. P. 73–85.
- Gannesen A.V., Zdorovenko E.L., Botchkova E.A., Hardouin J., Massier S., Kopitsyn D.S., Gorbachevskii M.V., Kadykova A.A., Shashkov A.S., Zhurina M.V., Netrusov A.I., Knirel Y.A., Plakunov V.K., Feuilloley M.G.J. Composition of the biofilm matrix of *Cutibacterium acnes* acneic strain RT5 // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01284>
- Hsiao T.C. Plant responses to water stress // Ann. Rev. Plant Physiol. 1973. V. 24. P. 519–570.
- Lerner A., Valverde A., Castro-Sowinski S., Lerner H., Okon Y., Burdman S. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation // Environ. Microbiol. Rep. 2010. V. 2. P. 577–586.
- Malinich E.A., Bauer C.E. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean) // Symbiosis. 2018. V. 76. P. 97–108.
- Notununu I., Moleleki L., Roopnarain A., Adeleke R. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the molecular responses of maize under drought and heat stresses: a review // Pedosphere. 2022. V. 32. P. 90–106.

- Oliveira A.L.M., Canuto E., Silva E.E., Veronica M.R., Baldani J.I. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture intensities // Braz. J. Microbiol. 2004. V. 35. P. 295–299.
- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // Mol. Microbiol. 1998. V. 28. P. 449–461.
- Petrova L.P., Yevstigneeva S.S., Borisov I.V., Shelud'ko A.V., Burygin G.L., Katsy E.I. Plasmid gene AZOBR\_p60126 impacts biosynthesis of lipopolysaccharide II and swarming motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 // J. Basic Microbiol. 2020. V. 60. P. 613–623.
- Sadasivan L., Neyra C.A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 1670–1677.
- Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum braslense* sp. nov. // Can. J. Microbiol. 1978. V. 24. P. 967–980.
- Volfson V., Fibach-Paldi Sh., Paulucci N.S., Dardanelli M., Matan O., Burdman S., Okon Y. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects // Soil Biol. Biochem. 2013. V. 67. P. 255–262.
- Vurukonda S.S.K.P., Sandhya V., Shrivastava M., Ali S.K.Z. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria // Microbiol. Res. 2016. V. 184. P. 13–24.
- Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L.Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // ISME J. 2017. V. 11. P. 1602–1613.

## Resistance of Biofilms Formed by the Soil Bacterium *Azospirillum brasilense* to Osmotic Stress

D. I. Mokeev<sup>1</sup>, I. V. Volokhina<sup>1</sup>, E. M. Telesheva<sup>1</sup>, S. S. Evstigneeva<sup>1</sup>, V. S. Grinev<sup>1</sup>, T. E. Pylaev<sup>1, 2</sup>,  
L. P. Petrova<sup>1</sup>, \*, and A. V. Shelud'ko<sup>1</sup>, \*\*

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

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

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

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

Received March 28, 2022; revised May 18, 2022; accepted June 6, 2022

**Abstract**—Polyethylene glycol (PEG 6000) was used to establish osmotic stress conditions during growth of the type strain *Azospirillum brasilense* Sp7 and its spontaneous variants Sp7.4 and Sp7.8, because it causes a stable decrease in the water potential and thus makes it possible to simulate the effect of drought on the bacterial population. While PEG suppressed the motility of azospirilla, it had no effect on the ability of strains Sp7 and Sp7.8 to form biofilms, as well as on the metabolic activity of the biofilms formed in the absence of stress. PEG 6000-caused osmotic stress promoted biofilm formation in Sp7.8. While the biofilms of the Sp7.4 variant were those most sensitive to the negative effect of the water stress, the growth variables of the planktonic culture of this variant under stress conditions exceeded the values for both Sp7 and Sp7.8. In biofilms, strains Sp7, Sp7.4, and Sp7.8 produced polysaccharides and the plant hormone IAA; desiccation-resistant cell forms emerged. The variants Sp7.4 and Sp7.8, similarly to Sp7, formed biofilms during plant root colonization and affected the morphology of the root system of wheat seedlings. Our results show that spontaneous variants of strain Sp7 may be of interest for further research directed at selection of promising *Azospirillum* strains to enhance the drought resistance of plants.

**Keywords:** osmotic stress, water stress, drought, biofilms, dormant forms, drying

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИВЫЖИВАНИЕ СТАРЕЮЩИХ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ  
ПРИ ЛЕТАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ<sup>1</sup>© 2022 г. Г. И. Эль-Регистан<sup>а</sup>, \*, Н. Г. Лойко<sup>а</sup>, Ю. А. Николаев<sup>а</sup><sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: anmsaa@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.06.2022 г.

После доработки 22.06.2022 г.

Принята к публикации 23.06.2022 г.

В природных системах микроорганизмы периодически подвергаются ингибирующим рост и летальным воздействиям стрессоров. Известно, что в присутствии летальных доз антибиотиков популяция бактерий выживает и сохраняется как вид за счет жизнеспособных неделящихся дормантных клеток-персистеров. Как выживает популяция при летальных, и более того, сочетанных или последовательных воздействиях стрессоров химической и физической природы неизвестно, что и определило цель настоящего исследования. Проведен сравнительный анализ выживаемости популяций стационарных культур *Escherichia coli* K-12 MG1655 при летальных воздействиях антибиотика ципрофлоксацина (CIP) и лизирующего раствора, теплового и щелочного шоков. Выявлена более высокая устойчивость к стрессорным воздействиям: (1) стареющих стационарных клеток, содержащих сформированный биокристаллический нуклеоид, по сравнению с клетками, только перешедшими в стационарную фазу; (2) популяций, инкубируемых в буфере без питательных веществ, а не в ростовой среде. При действии CIP на популяции статически инкубируемых культур выявлена их более высокая устойчивость к сверхвысоким концентрациям CIP (100 мкг/мл) по сравнению с биоцидной дозой (10 мкг/мл) (эффект Игла). Обнаружена гетерогенность выживающих при летальных воздействиях теплового и рН-шока субпопуляций за счет реверсии к росту временно утративших способность образовывать колонии на плотной среде клеток (через 10–30 сут их инкубации). Выявленная устойчивость выживших после теплового или рН-шока клеток к последующей биоцидной атаке CIP позволяет идентифицировать эти клетки как персистеры. Обнаруженная гетерогенность субпопуляции персистеров по показателю их стрессоустойчивости может иметь значение при коррекции режимов стерилизации и антибиотикотерапии.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, клетки-персистеры, выживание, стрессоры, гетерогенность, рН, ципрофлоксацин, тепловой шок

**DOI:** 10.31857/S0026365622600493

В настоящее время хорошо известно, что при воздействии летальных доз антибиотиков на культуры микроорганизмов в них выживают клетки малочисленной субпопуляции персистеров (0.001–5%), образующиеся в результате цитодифференцировки и приобретающие фенотип толерантности к любым антибиотикам (Balaban et al., 2004, 2013; Lewis, 2010). Частота образования таких клеток-персистеров возрастает по мере старения микробной культуры, составляя в фазе экспоненциального роста 0.001–0.1% (персистеры II типа) и 1–5% в стационарной фазе (персистеры I типа). При перенесении в свежую среду персистеры прорастают, возвращаясь к исходному фенотипу, и воспроизводят родительскую по-

пуляцию чувствительных к антибиотикам клеток, в которой опять образуется малочисленная субпопуляция клеток-персистеров. Механизмы образования персистеров и их устойчивости к антибиотикам широко изучаются преимущественно на моделях патогенных бактерий, что обусловлено запросами медицины (Balaban et al., 2013; Michiels, Fauvart, 2016; van der Bergh et al., 2017). Практически неизвестно, как выживают бактериальные популяции при воздействии летальных доз стрессоров физической и химической природы, а также при их сочетанном действии. Имеется отрывочная информация об устойчивости персистеров к некоторым химическим токсикантам, например, ионам тяжелых металлов (Van den Bergh et al., 2017).

В наших исследованиях было показано, что сочетанное воздействие на экспоненциально раз-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622600493 для авторизованных пользователей.

вивающуюся микробную культуру сублетальных доз физических (тепловой шок, 45°C, 2 ч) и химических стрессоров (внесение микробного алармона — гексилрезорцина) влияет на развитие устойчивости микробной популяции к последующей летальной антибиотической атаке. Было обнаружено, что в зависимости от временного интервала между этими последовательными воздействиями, частота образования персистеров II типа возрастает или, напротив, уменьшается (Лойко с соавт., 2015). Показано потенцирующее действие стресса на образование персистеров I типа, сопряженное с переходом культуры в стационарную фазу (van den Bergh et al., 2022; Peyrusson et al., 2022). О том, как влияют стрессорные воздействия летального уровня на выживание стационарных культур и персистеров I типа, информации нет, хотя эти ситуации имеют место как в медицинской практике при стерилизации использованного оборудования и биологического материала, так и в природных системах. Вместе с тем хорошо известно, что клетки культур стационарной фазы (неделяющиеся с эндогенным метаболизмом) более устойчивы к сублетальным стрессорным воздействиям, чем клетки экспоненциально растущей культуры (Pletnev et al., 2015; Agrawal et al., 2019; Gottesman, 2019).

Переход развивающейся бактериальной культуры в стационарную фазу роста вызван изменением транскрипционных программ, определяющих смену стратегий развития популяции с размножения клеток и экспансии пространства на запрет клеточного деления и повышение стрессоустойчивости клеток. Этот переход сопровождается важными событиями, обеспечивающими выживание популяции в неблагоприятных для роста условиях. На популяционном уровне выживание популяции в стрессовых условиях обеспечивается, как отмечено выше, фенотипическим переходом клеток малочисленной субпопуляции в фенотип персистеров. Устойчивость персистеров к повреждающим воздействиям, существенно более высокая, чем у ординарных клеток, обусловлена: (1) их крайне низкой метаболической активностью, то есть независимостью от условий окружающей среды, (2) очень низкой протон движущей силой (PMF), (3) снижением диффузии в клетку антибиотиков или других токсикантов, а также высокой эффективностью эффлюкс систем (Lewis, 2010; Grant, Hung, 2013; Maisonneuve, Gerdes, 2014; van den Bergh et al., 2017).

На клеточном уровне устойчивость к стрессам связана с изменением структурной организации клеточных оболочек, замещением в мембранах ненасыщенных жирных кислот насыщенными, что вызывает снижение микровязкости липидной стромы мембран и повышение их прочности (Ткаченко, 2012; Cañas-Duarte et al., 2020).

Основным событием, происходящим в стационарных клетках является структурная реорганизация нуклеоида. Транскрипционная программа клеток стационарной фазы включает изменения в синтезе белков, ассоциированных с нуклеоидом (NAPs), имеющих функции глобальных транскрипционных регуляторов (Azam, Ishihama, 1999). В стационарных клетках основным из NAPs становится белок Dps (DNA — binding protein from starved cells). Белок Dps, относящийся к семейству ферритиновых белков, образует самосборку додекамеры, в полости которых Dps связывает ионы Fe<sup>2+</sup> и окисляет их активными формами кислорода, образующимися в реакции Фентона, защищая, таким образом, клетки от окислительного стресса. Экспрессия белка Dps включена также в клеточные ответы на стрессорные воздействия голодания, температурного шока, pH-шока и др. (Karas et al., 2015). Другая, наиболее важная функциональная активность Dps обусловлена способностью его додекамеров к: (1) самосборке в упорядоченную кристаллическую структуру и (2) образованию комплексов с ДНК, что сопровождается ее компактизацией. Совокупно, это приводит к образованию биокристаллического нуклеоида (БН). Включение нитей ДНК в многослойную конструкцию Dps-Dps обуславливает обратимую супрессию транскрипционной активности ДНК (Karas et al., 2015; Janissen et al., 2018). Образование БН в стационарных клетках должно обеспечивать, таким образом, их более высокую стрессоустойчивость дополнительно к метаболически обусловленной стрессоустойчивости. Процесс биокристаллизации нуклеоида начинается при переходе культуры *E. coli* в стационарную фазу и завершается через 48 ч (Frenkel-Krispin et al., 2004). Отметим, что биокристаллизация нуклеоида имеет место как в обычных вегетативных стационарных клетках, так и в клетках персистерах I типа, образовавшихся в стационарных популяциях. Дальнейшая судьба этих двух субпопуляций различна. В стареющей бактериальной культуре стационарная фаза сменяется фазой отмирания бактериальной культуры, когда обычные клетки автолизуются, а персистеры, устойчивые к автолизу, выживают. При этом обломки и внутреннее содержимое лизированных клеток способствуют выживанию персистеров (Podlesek et al., 2016) и, согласно гипотезе (Лойко с соавт., 2015), созреванию персистеров в анабиотические покоящиеся формы, обладающие высокой устойчивостью к повреждающим стрессорным воздействиям. Эта устойчивость персистеров, приобретающих состояние спячки (dormancy) или оцепенения (quiescence), обусловлена изменением компонентного состава и, следовательно, структурной организации и функциональной активности клеточных оболочек: липидного состава мембран (Gonçalves, de Carvalho, 2016; Cañas-

Duarte et al., 2020) и пептидогликана клеточной стенки (Rittershaus et al., 2013; Pletnev et al., 2015; Jia et al., 2020), а также закислением цитоплазмы (Goode et al., 2021).

Таким образом, клетки стационарной популяции как ординарные вегетативные, так и персистеры обладают, по-видимому, ранжированной устойчивостью к повреждающим воздействиям. Наиболее устойчивы клетки-персистеры, созревающие в процессе длительного культивирования в высоко стрессоустойчивые покоящиеся формы. Достаточно устойчивы старые стационарные клетки с биокристаллизованным нуклеотидом, и наименее стрессоустойчивы клетки ранней стационарной фазы.

Целью настоящего исследования было определить уровень выживания (персистенции) бактериальных популяций *Escherichia coli* при индивидуальных и сочетанных летальных стрессорных воздействиях на стационарные культуры бактерий разного возраста. В настоящем исследовании было выяснено влияние на устойчивость клеток к действию стрессоров: (1) возраста стационарных клеток (1 и 3 сут); (2) природы стрессора – биологической (антибиотик ципрофлоксацин (CIP)), химической (лизирующий раствор, pH-шок), физической (тепловой шок); (3) последовательности сочетанного действия стрессоров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Объекты исследования.** В работе использовали грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* шт. K12 MG1655 из коллекции культур НИИ новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАН.

Бактерии культивировали в среде LB (Broth, Miller, VWR, USA) в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды на орбитальной качалке (160 об./мин) при температуре 28°C. Инокулят – культуру стационарной фазы роста (ночная культура) вносили в количестве 0.5 мл на 50 мл среды (1%), что обеспечивало начальную оптическую плотность (ОП)  $\approx 0.3$  ( $\lambda = 450$  нм,  $l = 10$  мм) (Spectrophotometer 7315, Jenway, GB). Для определения численности стрессоустойчивых (выживших) клеток (персистеров) в стационарных (1 и 3 сут) культурах *E. coli* использовали графическую зависимость изменения титра клеток от времени воздействия.

**Выявление персистеров I типа *E. coli* воздействием антибиотика CIP.** В бактериальные культуры стационарной фазы роста (1 и 3 сут), полученные как описано выше, вносили CIP до конечных концентраций 10 и 100 мкг/мл, соответствующих 10 и 100 минимальным ингибирующим концентрациям (МИК), и инкубировали их при температуре 28°C без перемешивания в течение 14–16 сут. Периодически определяли титр жизнеспособных клеток по числу колониеобразующих единиц (КОЕ/мл)

после высева 6-кратно отмытых от антибиотика 0.9% NaCl аликвот на агаризованную среду LB (с добавлением 1.5% Bacteriological Agar, Helicon, Russia).

**Выявление персистеров I типа *E. coli* воздействием лизирующего раствора.** В бактериальные культуры стационарной фазы роста (1 и 3 сут), полученные как описано выше, вносили содержащий додецилсульфат натрия лизирующий раствор (из набора Plasmid Miniprep Кат. # BC021L, Евроген, Россия) до конечных концентраций 2.5 и 5 об. % и инкубировали их при температуре 28°C без перемешивания в течение 4 часов. Каждые 40 мин определяли изменение титра жизнеспособных клеток после высева 2-кратно отмытых 0.9% NaCl аликвот на агаризованную среду LB (с добавлением 1.5% Bacteriological Agar, Helicon, Russia).

**Выявление клеток стационарных культур *E. coli*, устойчивых к тепловому шоку.** Аликвоты (1 мл) бактериальных культур *E. coli* стационарной фазы роста (1 и 3 сут) переносили в пластиковые пробирки объемом 2 мл и подвергали воздействию температуры 50, 55 или 60°C в течение 60 мин с использованием термошейкера (TS-100, Biosan) при перемешивании (740 об./мин). Каждые 5–10 мин определяли численность жизнеспособных клеток (методом КОЕ).

**Выявление клеток стационарных культур *E. coli*, устойчивых к pH-шоку.** Аликвоты (1 мл) бактериальных культур *E. coli* стационарной фазы роста (1 и 3 сут) переносили в пластиковые пробирки объемом 2 мл. Туда же вносили 1 н раствор КОН до увеличения показателя pH среды до 10.0. Культуры инкубировали при 28°C без перемешивания в течение 240 мин, определяя каждые 30 мин численность жизнеспособных клеток (методом КОЕ).

**Подготовка клеточных популяций для дальнейших экспериментов.** Клетки контрольных и опытных образцов делили на две партии. Первую партию контрольных и опытных образцов отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (10000 g, 15 мин), промывали PBS буфером (после теплового и щелочного шоков 2 раза, после действия CIP 6 раз), и ресуспендировали в культуральной жидкости, полученной после культивирования клеток *E. coli* в течение 1- или 3-х сут, соответственно (для экспериментов с CIP 6- и 8-сут, соответственно). Эти клеточные популяции обозначали “П среда”. Вторую партию контрольных и опытных образцов отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (10000 g, 15 мин), промывали PBS буфером (после теплового и щелочного шоков 2 раза, после действия CIP 6 раз), и ресуспендировали в PBS буфере, обозначая соответственно “К буфер” или “П буфер”.

**Определение длительности выживания клеток после стрессорных воздействий.** Клетки контрольных и опытных образцов, подготовленные, как описа-

но выше, хранили в течение 4–8 мес. при 23°C без перемешивания, периодически определяя количество жизнеспособных клеток (методом КОЕ).

**Стрессирование клеток, выживших после воздействия СІР.** Клеточные популяции подвергали воздействию теплового шока (15 и 30 мин при температуре 55°C) и щелочного шока (увеличение рН до 10.0 добавлением 1 н КОН и инкубирование в течение 2 ч). Далее определяли численность оставшихся жизнеспособными клеток (методом КОЕ).

**Стрессирование клеток, выживших после теплового шока.** Клеточные популяции подвергали воздействию СІР (10 мкг/мл, инкубация в статическом режиме при 23°C в течение 5 сут) и щелочного шока (увеличение рН до 10.0 добавлением 1 н КОН и инкубирование в течение 2 ч). Далее определяли численность оставшихся жизнеспособными клеток (методом КОЕ).

**Стрессирование клеток, выживших после воздействия щелочного шока.** Клеточные популяции подвергали воздействию СІР (10 мкг/мл, инкубация в статическом режиме при 23°C в течение 5 сут) и теплового шока (15 и 30 мин при температуре 55°C). Далее определяли численность оставшихся жизнеспособными клеток (методом КОЕ).

**Статистический анализ.** Все эксперименты проводились в 5-ти кратной повторности. Статистический анализ был сделан с использованием стандартных методов в программе Microsoft Excel XP. Группу данных считали однородной, если среднеквадратичные отклонения  $\sigma$  не превышали 10%. Различия между группами считали достоверными при критерии вероятности  $P > 0.95$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления клеток-персистеров бактериальную популяцию подвергают воздействию летальных доз антибиотиков (Michiels, Fauvart, 2016). При этом об образовании субпопуляции персистеров судят по обнаружению плато на кривой отмирания клеток (Valaban et al., 2004, 2013). В настоящей работе, наряду с воздействием антибиотика СІР, впервые были предложены новые способы выявления персистеров с помощью лизирующего раствора, а также теплового и щелочного шоков путем анализа кривой отмирания клеток в результате действия стресса. Также рассматривались вопросы влияния на выживание клеточных популяций возраста культуры до стрессового воздействия и среды, в которой инкубируются клетки. Под термином “выживание” понимали сохранение бактериями колониеобразующей способности.

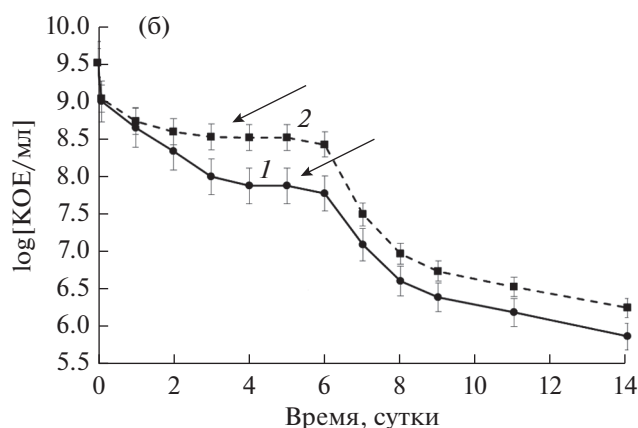
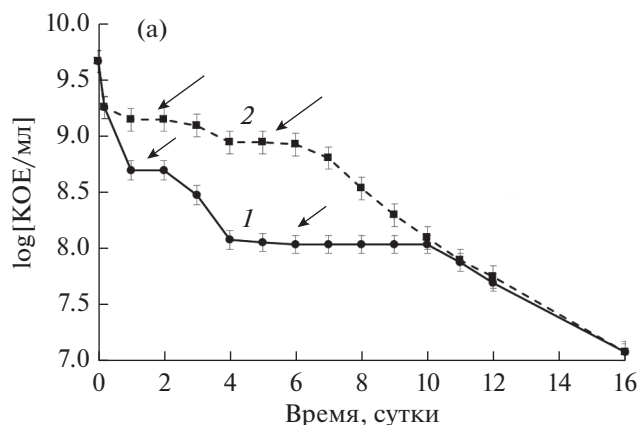
### *Выявляющее персистеры действие СІР*

Персистеры I типа выявляли, добавляя СІР (10 и 100 мкг/мл) в 1 и 3 сут стационарные культуры

*E. coli* (рис. 1). Парадоксально, но число выживших клеток в обеих культурах было больше при воздействии сверх высокой дозы СІР 100 мкг/мл – 10–15%, чем при биоцидной 10 мкг/мл – 1–3%. Такой феномен, при котором численность выживших бактерий больше при концентрациях антибиотика значительно более высоких, чем оптимальная бактерицидная концентрация, был описан как эффект Игла (Eagle, 1948; Eagle, Musselman, 1948). Его неоднократно фиксировали в экспериментах с культурами бактерий и грибов различных таксонов (Prasetyoputri et al., 2019). Отметим, что эффект Игла описывался ранее для экспоненциально растущих клеток, а в наших исследованиях впервые показан для клеток стационарных культур. Молекулярные и клеточные механизмы эффекта Игла плохо изучены, но полагают, что один из них связан с действием автолизина, интерферирующем с действием антибиотиков. Также возможно, что сверхвысокие дозы антибиотика вызывают снижение уровня образующихся при стрессе АФК, что приводит к увеличению доли выживающих клеток (Prasetyoputri et al., 2019). Хотя эти гипотезы были сформулированы для экспоненциально растущих клеток, они не противоречат полученным нами результатам для стационарных культур. Существенных различий между выживанием клеток при антибиотической атаке в 1 и 3 сут культурах *E. coli* не было обнаружено, численность выявленных на “плато” клеток-персистеров в обоих вариантах составляла около 3% (действие 10 мкг/мл СІР) (табл. 1). Единственным различием было более быстрое отмирание клеток 3 сут культуры по сравнению с клетками 1 сут культуры.

### *Выявляющее персистеры действие лизирующего раствора*

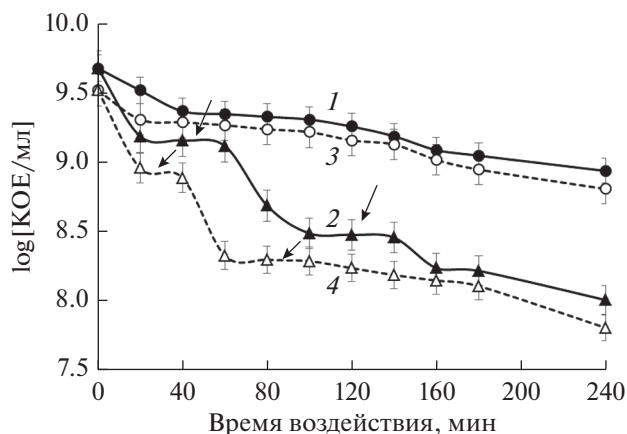
Персистеры I типа выявляли, добавляя лизирующий раствор (2.5 и 5 об. %) в 1 и 3 сут стационарные культуры *E. coli* (Canas-Duarte et al., 2014) (рис. 2). Селективирующий эффект зависел от концентрации лизирующего раствора и был хорошо выражен при использовании 0.5 об. % раствора для обоих вариантов – 1 и 3 сут культур *E. coli*. При этом в 3 сут культуре, в которой отмирание ординарных клеток шло быстрее, численность выживающих клеток составляла 3–5%, а в 1 сут культуре была выше – 5–7%. Это объясняется тем, что при старении стационарных клеток прочность клеточных оболочек снижается и воздействие компонентов лизирующего раствора приводит к более быстрому разрушению бактериальных клеток. Следует отметить, что количество персистеров, выявленное воздействием на популяцию СІР и лизирующего раствора, было примерно одинаково (табл. 1).



**Рис. 1.** Кривые отмирания популяций стационарных культур *E. coli* после внесения летальных доз СИР – 10 (1) и 100 (2) мкг/мл: а – 1 сут культура; б – 3 сут культура. Инкубация в статическом режиме. Стрелками указаны плато персистеров.

*Селектирующее стационарные клетки  
E. coli действие летального рН-шока  
(защелачивание среды)*

Действие КОН на статически инкубируемые 1 и 3 сут культуры, увеличивающее рН среды до



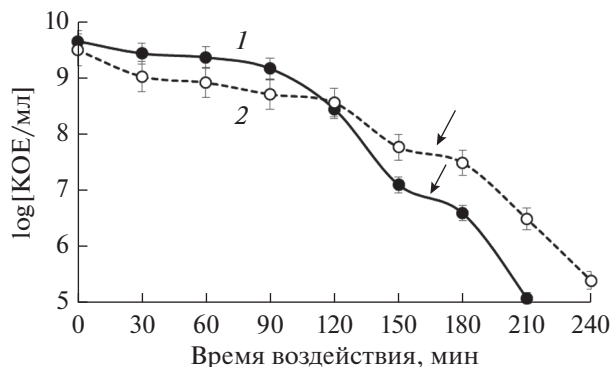
**Рис. 2.** Кривые отмирания популяций 1 (1, 2) и 3 (3, 4) сут стационарных культур после внесения лизирующего раствора 2.5 (1, 3) и 5 (2, 4) об. %. Стрелками указаны плато персистеров. Инкубация в статическом режиме.

значений 10.0, представлено на рис. 3 в виде графических зависимостей динамики снижения количества жизнеспособных клеток. После длительной лаг-фазы (до 90 и 120 мин соответственно) на кривой лизиса наблюдался период отмирания клеток, более быстрый в 1 сут культуре. Затем следовал 30 минутный период замедления гибели клеток (плато) и дальнейшее ускоренное отмиранием культуры. Численность клеток, по-видимому, персистеров, на выявленных плато, составляла около 0.3% в 1 сут культуре и 1% в 3 сут культуре (рис. 3), что несколько меньше, чем при выявлении персистеров воздействием антибиотика или лизирующего раствора (табл. 1). Вероятно, несмотря на то, что мембраны клеток-персистеров имеют повышенную прочность за счет высокого содержания насыщенных жирных кислот и пониженной микротекучести липидной стромы

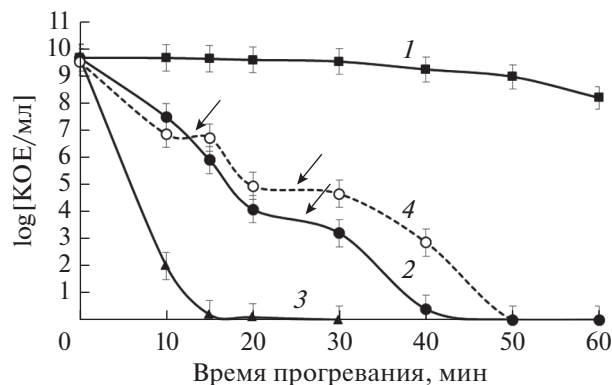
**Таблица 1.** Доля (%) выживших клеток-персистеров популяций 1 и 3 сут стационарных культур *E. coli* после стрессорных летальных воздействий СИР, лизирующего раствора, теплового и щелочного шоков

| Летальное воздействие  | Доля жизнеспособных клеток-персистеров, в % от первоначального количества |                |
|------------------------|---|----------------|
|                        | 1 сут культура  | 3 сут культура |
| СИР, 10 мкг/мл         | 3   | 3              |
| СИР, 100 мкг/мл        | 13  | 10             |
| Лизирующий раствор, 5% | 5–7   | 3–5            |
| Тепловой шок 55°C,     |   |                |
| 15 мин                 | 0.001   | 0.5            |
| 20 мин                 | 0.0001  | 0.005          |
| Щелочной шок,          |   |                |
| рН 10, 150 мин         | 0.3   | 1.0            |





**Рис. 3.** Кривые отмирания популяций 1 (1) и 3 (2) сут стационарных культур *E. coli* после внесения КОН (рН 10). Стрелками указаны плато персистеров. Инкубация в статическом режиме.



**Рис. 4.** Кривые отмирания популяций 1 (1, 2, 3) и 3 (4) сут стационарных культур *E. coli* при тепловом шоке 50°C (1), 55°C (2, 4), 60°C (3) в зависимости от времени воздействия. Стрелками указаны плато персистеров. Инкубация при перемешивании.

(Balaban et al., 2013), они тоже чувствительны к воздействию КОН.

*Селектирующее стационарные клетки E. coli действие летального теплового шока*

Развитие стрессового ответа клеток на сублетальный тепловой шок хорошо изучено. Показаны его воздействие на клеточную оболочку грамотрицательных бактерий, ее стрессовый ответ и основные пути проведения стрессового сигнала, в том числе функциональность  $\sigma$ -фактора, контролирующего продукцию липополисахаридов и целостность внешней мембраны (Wang et al., 2021). Имея повышенную прочность клеточных мембран, можно предположить, что клетки-персистеры должны быть более устойчивы к летальному тепловому шоку, что должно отразиться на кривой отмирания клеток образованном плато.

При подборе условий теплового шока наиболее показательным оказалось воздействие 55°C (рис. 4). В этом случае на кривых отмирания обнаруживались плато, соответствующие субпопуляциям с более выраженной термоустойчивостью клеток. Кривые отмирания популяций 1 и 3 сут культур имели сходный характер. Однако, клетки 3 сут культуры демонстрировали большую устойчивость, а кривая отмирания имела два хорошо выраженных плато: первое – в период 10–15 мин прогревания (0.5% клеток популяции) и второе – в период 20–30 мин прогревания, где численность выживших клеток составляла 0.01%. Более высокая термостабильность клеток 3 сут культур по сравнению с 1 сут культурами, по-видимому, объясняется спецификой структурной реорганизации клеток – завершением формирования в них БН с помощью белка Dps (Frenkiel-Krispin, Minsky, 2006; Крупянский с соавт., 2018). Одной из функций белка Dps является повышение термоста-

бильности стационарных клеток по сравнению с клетками экспоненциально растущих культур (Almirón et al., 1992; Karas et al., 2015). Выявленные нами различия в термостабильности клеток 1 и 3 сут стационарных культур еще раз на новой модели подтвердили роль БН в термоустойчивости клеток.

Таким образом, при летальных воздействиях высокой температуры или рН-шока жизнеспособными остаются около десятой – сотой доли процента от численности стационарных популяций. Можно полагать, что эти выжившие клетки являются персистерами.

Для проверки высказанного положения далее были изучены свойства полученных клеток-персистеров: способность к длительному сохранению жизнеспособности и устойчивость к перекрестному действию стрессорных факторов.

*Свойства клеток-персистеров, выявленных после действия СІР*

**Длительность сохранения жизнеспособности.** Отмытые от антибиотика субпопуляции клеток-персистеров 1 и 3 сут стационарных культур *E. coli*, оставшихся жизнеспособными после 5 сут воздействия летальных доз СІР, а также соответствующие им контрольные варианты стационарных культур, хранили в течение 7 мес. в среде роста и в буфере (табл. S1).

Сразу после воздействия СІР, отмытки и ресуспендирования выживших персистеров в среде роста или буфере титр жизнеспособных клеток составил 3.0 и 2.2% от исходного количества бактерий в 1 сут культуре и 2.3 и 2.1% в 3 суточной, соответственно. В контрольных популяциях, без воздействия антибиотика, но с 5-ти суточной инкубацией и последующим перенесением в среду

или буфер количество жизнеспособных клеток оказалось ~35–50% от исходного (табл. S1).

Через месяц хранения 1 сут культур количество (относительно их титра на начало периода хранения) жизнеспособных персистеров, хранившихся в среде роста, снижалось до 3.5%, тогда как стационарных клеток в контрольном образце — до 7.1%. При хранении бактерий в буфере, количество выживших клеток было выше — 12.1 и 23.0% соответственно. В случае 3 сут культур и в среде роста, и в буфере относительное количество клеток-персистеров через месяц хранения было выше, чем в контрольных вариантах в 2.6 и 4.2 раза, соответственно. Т.е. прослеживалась общая тенденция лучшего сохранения жизнеспособных клеток как контрольных, так и опытных популяций в буфере, а также большая устойчивость к длительной инкубации 3 сут популяций. Интересно, что при хранении фракции персистеров 3 сут культур в течение 1 мес. в буфере их численность не менялась, а в среде роста — падала меньше, чем в 3 раза, что свидетельствует об устойчивости персистеров к автолизу (Balaban et al., 2013; Orman, Brynildsen, 2015; van den Bergh et al., 2017; Mohiuddin et al., 2021). Однако через 7 мес. инкубации доля КОЕ-образующих клеток-персистеров в этих образцах снижалось до 4.4% в буфере и 9.0% в среде, что можно объяснить гетерогенностью субпопуляции персистеров и приобретением частью из них состояния “некультивируемости” при принципиальном сохранении их жизнеспособности. Значительно снижалась численность жизнеспособных клеток через 7 мес. хранения и в контрольных популяциях, и по абсолютным значениям она совпадала со значениями в опытных вариантах. Т.е. доля выживших анабиотических покоящихся клеток (Эль-Регистан с соавт., 2006) в контрольных популяциях соответствовала численности персистеров в опытных популяциях, что подтверждает ранее высказанную гипотезу, рассматривающую персистеры как предшественники покоящихся форм (Лойко с соавт., 2015).

**Устойчивость к стрессовым факторам.** При сильном стрессовом воздействии основная часть популяции отмирает, а клетки малочисленной субпопуляции персистеров с нарушенным метаболизмом выживают (Hofer, 2022). Их состояние при этом характеризуется крайне слабым обменом веществ и пролонгированной реверсией к росту (Balaban et al., 2013). При этом реактивированные в свежей среде персистеры теряют свою стрессоустойчивость и погибают при повторном стрессорном воздействии (Wainwright et al., 2021), что используется как прием тиндализации в медицинской практике. Однако не известно, что будет со способностью персистеров ревертировать к росту, если их подвергать повторному летальному стрессовому воздействию без предварительной реактивации. Такая схема повторного перекрест-

ного стресса клеток-персистеров была воспроизведена в наших экспериментах.

**Воздействие теплового шока.** Популяции персистеров 1 и 3 сут культур, выявленные СР, а также популяции клеток контрольных вариантов, ресуспендированные в среде роста и буфере, подвергали тепловому шоку (55°C, 15 и 30 мин), после чего определяли численность выживших клеток (табл. S2).

В образцах 1 сут культур после 15 мин прогревания титр жизнеспособных клеток в контрольных и опытных вариантах снижался на 3–4 порядка, а в 3 сут — на 2–3 порядка. При этом относительное количество выживших клеток-персистеров во всех вариантах было выше, чем стационарных клеток в 1.5–4.5 раза. Устойчивости как контрольных, так и клеток-персистеров способствовала инкубация в PBS буфере. Т.е. в образцах клеток, суспендированных в среде роста, автолиз шел быстрее, чем при суспендировании клеток в буфере, что можно объяснить присутствием в среде роста токсичных продуктов метаболизма, а также ненасыщенных жирных кислот, индуцирующих автолиз клеток (Эль-Регистан с соавт., 2006). Синергидное действие ненасыщенных жирных кислот и нагревания вызывают сверхкритическое повышение текучести липидной стромы мембран и гибель клеток.

Описанные тенденции усиливались при более длительном (30 мин) воздействии температуры. Сам факт выживания части персистеров при возрастании времени прогревания свидетельствует о гетерогенности популяции персистеров по показателю терморезистентности. Если гетерогенность популяции покоящихся анабиотических форм по их терморезистентности была известна (Эль-Регистан с соавт., 2006), то для персистеров она показана впервые и может объясняться, различиями в составе и количестве структурных компонентов мембраны (насыщенных жирных кислот и др.).

Таким образом, после теплового шока в субпопуляциях персистеров выживает больший процент клеток (в 1.5–185 раз), чем в контрольных вариантах, при этом в образцах суспендирования в буфере больше, чем при суспендировании в среде роста. Эти результаты подтверждают высокую термоустойчивость персистеров, а также роль среды, в которой клетки подвергались прогреванию, что показано впервые.

**Воздействие защелачивания среды.** В популяции персистеров 1 и 3 сут культур, выявленные СР, а также популяции клеток контрольных вариантов, ресуспендированные в среде роста и буфере, внесли 1 н КОН до pH 10.0. Через 2 ч инкубации определяли количество жизнеспособных клеток (табл. S3).

Так же как и в экспериментах с воздействием повышенной температуры, клетки 1 сут культур

оказались более чувствительны к щелочному шоку, чем клетки 3 сут культур, при этом персистеры оказались более устойчивы, примерно в 4 раза, чем контрольные стационарные клетки. Более высокая устойчивость персистеров может объясняться отмеченным ранее изменением (по сравнению с ординарными клетками) составом мембранных липидов и потому — структурной реорганизацией липидной стромы мембран.

*Свойства клеток-персистеров, выявленных после летального щелочного шока*

**Длительность сохранения жизнеспособности.** Отмытые от КОН субпопуляции клеток-персистеров 1 и 3 сут культур *E. coli*, а также соответствующие им контрольные варианты стационарных культур, хранили в течение 4 мес. в среде роста и в буфере (табл. S4).

Анализ результатов, полученных для контрольных и опытных образцов, хранившихся 1 мес. в статических условиях, выявил их принципиальные различия. Во всех образцах контрольных вариантов как 1 сут, так и 3 сут культур шло отмирание клеток, при этом более быстрое в среде роста, чем в буфере, и в 1 сут популяциях, чем в 3 сут, а количество жизнеспособных клеток (в % от исходного) снижалось до уровня 5–12%. Еще через 3 мес. хранения титр выживших клеток в контрольных вариантах составлял 0.5–0.8%, что соответствовало численности анабиотических покоящихся форм, в виде которых выживают и сохраняют вид бактериальные популяции (Эль-Регистан с соавт., 2006).

Принципиально другие результаты были получены для опытных вариантов. Отмирание клеток-персистеров шло быстрее в популяциях, инкубируемых в буфере, а чувствительность 3 сут клеток оказывалась выше. Следует отметить, что через мес. инкубации (а для 1 сут вариантов и через 4 мес.) количество жизнеспособных бактерий было выше, чем на момент начала их хранения, что связано с реактивацией части клеток популяций. Это объясняется тем, что щелочной рН-стресс на первом этапе сопровождается энергозависимым выходом из клеток  $K^+$ , снижением активности воды, увеличением плотности цитоплазмы и ингибированием ряда метаболических процессов (Saito, Kobayashi, 2003; Padan et al., 2005). Поэтому сразу после стрессового шока численность способных образовывать колонии на плотной среде клеток в популяции резко снижается. На следующем этапе развития стрессового ответа начинается потребление ионов  $K^+$ , которые в данном случае имеются как в среде роста, так и PBS буфере. Этот транспорт потенцируется осмотически активными веществами (Diskowski et al., 2015), присутствующими в среде роста (культуральной жидкости) и отсутствующими в буфере.

Поэтому доля реактивированных клеток больше в образцах суспендирования клеток в среде роста, а не в буфере.

Также следует отметить совпадение численности клеток, выживших во всех вариантах через 4 мес. хранения, с численностью, принятой для персистеров — около 1% от исходного значения. Это позволяет предположить, что при летальном щелочном стрессе выживают клетки-персистеры. Однако, обнаруженная реактивация клеток опытных вариантов, приводящая к увеличению их численности, не позволяет рекомендовать прием летального воздействия КОН для селекции клеток-персистеров. Сам факт пролонгированной реактивации малочисленной субпопуляции клеток после летального стресса описывается впервые.

**Воздействие СР.** В популяции клеток 1 и 3 сут стационарных культур, перенесших щелочной стресс, отмытых от КОН, и в популяции контрольных вариантов, ресуспендированных в среде роста или буфере, вносили СР (10 мкг/мл) и инкубировали в статическом режиме 5 сут. Затем клетки отмывали от СР и определяли численность выживших бактерий методом КОЕ (табл. S5).

Внесение СР в популяции контрольных вариантов 1 и 3 сут культур ожидаемо привело к селекции субпопуляции персистеров, численность которых составила соответственно 2.6 и 2.4% в среде роста и 10.7 и 8.9% в буфере (табл. S5). Действие антибиотика на персистеры, выявленные воздействием КОН, имело менее катастрофические последствия, особенно для 3 сут популяций, в которых остались жизнеспособными 32.8% клеток, инкубируемых в среде и 22.8% клеток, инкубируемых в буфере (табл. S5). Это подтверждает тот факт, что при летальном действии КОН выживают клетки-персистеры, *a priori* устойчивые к воздействию антибиотиков.

Дистресс, вызванный внесением СР в суспензию персистеров, выявленных воздействием КОН, был более губителен для клеток 1 сут популяций. Титр выживших в них клеток был на 1–1.5 порядка меньше, чем в популяциях 3 сут культур, и составлял всего 0.02% (в среде) и 0.007% (в буфере) от исходного количества бактерий в популяции до всех воздействий ( $4.6 \times 10^9$  клеток/мл). Это еще раз подтверждает ранее сделанный вывод об устойчивости персистеров 3 сут культур за счет наличия в них сформированного БН.

Следует отметить, что при двойном последовательном действии стрессоров большую роль играет их очередность. Так, при внесении СР в стрессированную КОН суспензию клеток 1 сут культур в среде роста выжило 7.7% клеток, а при обратной последовательности воздействий — сначала СР, потом КОН, выжило 19.3%. Такой же эффект был обнаружен для образцов 3 сут культур (32.9 и 41.7%). Это свидетельствует о гетерогенности суб-

популяции персистеров, что может иметь значение для коррекции режимов антибиотикотерапии.

**Воздействие теплового шока.** Популяции клеток 1 и 3 сут стационарных культур, перенесших щелочной стресс, отмытых от КОН, и популяции контрольных вариантов, ресуспендированных в среде роста или буфере, подвергали прогреванию при 55°C в течение 15 и 30 мин, после чего определяли численность КОЕ-образующих клеток (табл. S6). Таким образом, на клетки контрольных вариантов влиял только тепловой шок, а на клетки опытных вариантов — оба стрессора, КОН и высокая температура.

Как в контрольных, так и в опытных вариантах тепловой шок оказывал более губительное воздействие на клетки 1 сут культур и инкубированных в среде роста. Так, количество выживших клеток после 30 минутного воздействия термошока в опытных популяциях, хранящихся в среде роста и в буфере составило 0.02 и 0.1%, а в контрольных почти на два порядка меньше — 0.0001 и 0.003% соответственно. В 3 сут популяциях этот разрыв был меньше и составлял один порядок. Полученные результаты позволяют заключить, что рН-шок отселекционировал стрессоустойчивые клетки, выживающие при повторном воздействии не только СР, но и теплового шока. Сравнение приведенных данных в табл. S6 с полученными при последовательном воздействии СР и затем теплового шока (15 мин) (табл. S2) выявило их близость. Это подтверждает, что при дистрессе с большой долей вероятности выживают клетки-персистеры.

*Свойства клеток-персистеров, выявленных после летального теплового шока*

**Длительность сохранения жизнеспособности.** Подвергнутые 30 мин воздействию температуры 55°C субпопуляции клеток-персистеров 1 и 3 сут культур *E. coli*, а также соответствующие им контрольные варианты стационарных культур, хранили в течение 4 мес. в среде роста и в буфере (табл. S7).

Приведенные в табл. S7 результаты оказались схожи с полученными при воздействии щелочного шока (табл. S4). Сразу после прогрева численность КОЕ-образующих клеток резко снижалась во всех опытных образцах. При этом доля выживающих клеток была на 1.5–2 порядка меньше в ростовой среде, чем в буфере, и меньше в образцах 1 сут культур, чем 3 сут культур. Через 11 сут хранения в контрольных вариантах начинался автолиз, и численность клеток снижалась на 20–90%. В дальнейшем автолиз продолжался и через 4 мес. титр жизнеспособных клеток составлял 0.5–1% от первоначального. В опытных образцах все складывалось кардинально по-другому. В 1 и

3 сут опытных культурах, инкубируемых в среде роста, уже через 11 сут КОЕ-образующих клеток не обнаруживалось, тогда как в буферных образцах их численность, наоборот, возрастала на 1–2 порядка. Дальнейшее хранение практически не влияло на ситуацию. Через 4 мес. хранения численность персистеров (кроме варианта 1 сут в среде роста, где КОЕ-образующие клетки так и не выявлялись), а также контрольных клеток, было на уровне 1% от исходного в первоначальных популяциях, что соответствует принятой численности субпопуляции персистеров (Balaban et al., 2004, 2013).

Полученные результаты позволяют сделать ряд выводов. (1) Показанная для опытных образцов частичная реактивация клеток после теплового шока, аналогичная реактивации клеток после воздействия КОН (рН 10), свидетельствует об их стрессовом состоянии с временной потерей колониеобразующей способности. (2) Определение колониеобразующей способности клеток сразу после окончания стрессорного воздействия (тепловой шок, защелачивание среды, рН 10) не отражает количества жизнеспособных клеток. Численность колониеобразующих клеток следует определять через некоторое, эмпирически подобранное, время после повреждающего воздействия, достаточное для реактивации поврежденных, но не убитых клеток. (3) Удельная доля жизнеспособных клеток (от 100% в исходной популяции), восстановивших КОЕ-образующую способность после теплового шока ~1%, позволяет отнести их к субпопуляции персистеров. (4) Увеличение численности выжившей субпопуляции за счет ревертировавших к росту клеток почти на 2 порядка (по сравнению с численностью сразу после воздействия стрессора) свидетельствует о гетерогенности персистеров по их стрессоустойчивости. (5) Отмирание стрессированных тепловым шоком клеток в ростовой среде (но не в буфере) объясняется синергидным действием ростиингирующих метаболитов, накапливающихся в стационарной фазе, и снижением барьерной функции мембран прогретых (55°C) клеток (Эль-Регистан с соавт., 2006). Полученные результаты демонстрируют биотехнологическую целесообразность долгосрочного хранения микроорганизмов в виде суспензии их стационарных клеток (со сформированным БН) в буферных растворах.

**Воздействие защелачивания среды.** В популяции персистеров 1 и 3 сут культур, выявленные 30 мин тепловым шоком (55°C), а также популяции клеток контрольных вариантов, ресуспендированные в среде роста и буфере, вносили 1 н КОН до рН 10.0. Через 2 ч инкубации определяли количество жизнеспособных клеток (табл. S8).

В контрольных вариантах, где бактерии подвергались действию только одного стрессора —

КОН, жизнеспособность клеток снижалась до 6.3% в случае 1 сут культуры и 11.9% – 3 сут культуры, что подтверждает показанную выше более высокую стрессоустойчивость “стареющих” стационарных клеток со сформированным БН. В опытных образцах колониеобразующие клетки не выявлялись, что можно интерпретировать как следствие дистресса.

**Воздействие СІР.** В популяции клеток 1 и 3 сут стационарных культур, выявленные 30 мин тепловым шоком (55°C), и в популяции контрольных вариантов, ресуспендированных в среде роста или буфере, вносили СІР (10 мкг/мл) и инкубировали в статическом режиме 5 сут. Затем клетки отмывали от СІР и определяли численность выживших бактерий методом КОЕ (табл. S9).

В контрольных вариантах 1 и 3 сут культур, инкубируемых в ростовой среде, после воздействия СІР жизнеспособными оставались ~2.5% клеток, тогда как в популяциях, инкубируемых в буфере ~10.0%. Это подтверждает ранее сделанный вывод о потенцирующем автолиз клеток действию культуральной жидкости стареющих стационарных культур.

Персистеры, выявленные тепловым шоком, оказались очень устойчивы к действию антибиотика, особенно 3 сут, инкубируемые в среде, численность которых в результате воздействия снижалась только на 20%. Эта устойчивость к воздействию антибиотика предполагает, что при тепловом стрессе выживают именно клетки персистеры. Их низкая численность ( $10^3$ – $10^5$  клеток/мл) подтверждает ранее сделанный вывод о гетерогенности субпопуляции персистеров по признаку стрессоустойчивости. Отметим, что субпопуляции анабиотических покоящихся форм также гетерогенны по признаку стрессоустойчивости, в частности – терморезистентности, что ранее связывали с их различиями в структурной организации клеточных оболочек (моно- или многослойных) (Сузина с соавт., 2001). Однако такое объяснение не годится для персистеров, выявленных в стационарных культурах. Как было ранее показано для грамотрицательных бактерий за проведение сигнала при тепловом шоке ответственны несколько систем, в том числе, контролируемая  $\sigma^E$ -фактором (Wang et al., 2021), под контролем которого находится продукция липополисахаридов и целостность внешней мембраны, что влияет на выживание клеток при тепловом стрессе. Стохастичность выражения этой системы может определять различия в стрессовом ответе на тепловой шок в субпопуляции персистеров.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В природных системах микроорганизмы периодически подвергаются ингибирующим рост и

летальным воздействиям стрессоров. В настоящей статье приведены результаты системного исследования выживаемости популяций *E. coli* стационарной фазы роста при летальных воздействиях физических (тепловой шок), химических (лизирующий раствор, рН-шок) и биологических (антибиотик СІР) стрессоров. Анализ результатов выживания популяций при: (а) летальных воздействиях, (б) последующем длительном (до 7 мес.) хранении и (в) перекрестных стрессорных воздействиях, позволил сделать следующие выводы. (1) Сохранение бактериальной популяции как вида при летальных воздействиях любой природы осуществляется за счет выживания малочисленной субпопуляции клеток-персистеров, что расширяет диапазон стрессоров, к которым устойчивы эти дормантные (покоящиеся) формы. (2) Субпопуляция персистеров гетерогенна по признаку их стрессоустойчивости. (3) Стрессоустойчивость клеток стационарных популяций зависит от их структурной организации и выражена сильнее у старых стационарных клеток, содержащих сформированный БН. (4) Обнаружен эффект реверсии к росту у малочисленной субпопуляции клеток, временно (14 сут) потерявших способность к росту после летального воздействия теплового шока или рН-шока. (5) Обнаружено потенцирующее автолиз клеток действие ростовой среды стационарных культур (содержащей токсичные продукты клеточного метаболизма и аутоиндукторы автолиза), что обуславливает предпочтительность хранения микробных популяций в буфере.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансирована за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ФИЦ Биотехнологии РАН по Госзаданию “Микробиология инновационных биотехнологий” № 122040800164-6.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Крупянский Ю.Ф., Лойко Н.Г., Сеницын Д.О., Терешкина К.Б., Терешкин Э.В., Фролов И.А., Чуличков А.Л., Бокарева Д.А., Мысякина И.С., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Попов В.О., Соколова О.С., Шайтан К.В., Попов А.Н. Биокристаллизация в клетках и спорах бактерий и грибов // Кристаллография. 2018. Т. 63. С. 572–577.

- Krupyanskiy Y.F., Loiko N.G., Sinityn D.O., Tereshkina K.B., Tereshkin E.V., Frolov I.A., Chulichkov A.L., Bokareva D.A., Mysyakina I.S., Nikolaev Y.A., El'-Registan G.I., Popov V.O., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Popov A.N.* Biocrystallization in bacterial and fungal cells and spores // *Crystallogr. Rep.* 2018. V. 63. P. 594–599.
- Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Манучарова Н.А., Соина В.С., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И.* Реактивация покоящихся и некультивируемых форм бактерий из древних почв и мерзлотных подпочвенных отложений // *Микробиология.* 2012. Т. 81. С. 474–485.
- Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Manucharova N.A., Soina V.S., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I.* Reactivation of dormant and nonculturable bacterial forms from paleosoils and subsoil permafrost // *Microbiology (Moscow).* 2012. V. 81. P. 435–445.
- Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутьельян А.В., Эль-Регистан Г.И.* Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // *Микробиология.* 2015. Т. 84. С. 512–528.
- Loiko N.G., Kozlova A.N., Nikolaev Y.A., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V., El'-Registan G.I.* Effect of stress on emergence of antibiotic-tolerant *Escherichia coli* cells // *Microbiology (Moscow).* 2015. V. 84. P. 595–609.
- Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Дмитриев В.В., Шорохова А.П., Горленко В.М., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И.* Тонкая структура мумифицированных клеток микроорганизмов, образующихся под влиянием химического аналога аутоиндуктора анабиоза // *Микробиология.* 2001. Т. 70. С. 776–787.
- Suzina N.E., Mulyukin A.L., Loiko N.G., Kozlova A.N., Dmitriev V.V., Shorohova A.P., Gorlenko V.M., Duda V.I., El'-Registan G.I.* Fine structure of mummified cells of microorganisms formed under the influence of a chemical analogue of the anabiosis autoinducer // *Microbiology (Moscow).* 2001. V. 70. P. 667–677.
- Ткаченко А.Г.* Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов: научное издание / Отв. ред. Демаков В.А. Екатеринбург: РАН, УрО, Ин-т экологии и генетики микроорганизмов, 2012. 237 с.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И.* Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // *Микробиология.* 2006. Т. 75. С. 446–456.
- El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I.* Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // *Microbiology (Moscow).* 2006. V. 75. P. 380–389.
- Agrawal A., Rangarajan N., Weisshaar J.C.* Resistance of early stationary phase *E. coli* to membrane permeabilization by the antimicrobial peptide Cecropin A // *Biochim. Biophys. Acta. – Biomembr.* 2019. V. 1861. P. 182990. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2019.05.012>
- Almirón M., Link A.J., Furlong D., Kolter R.* A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes Dev.* 1992. V. 6 (12B). P. 2646–2654. <https://doi.org/10.1101/gad.6.12b.2646>
- Bacterial Persistence. Methods and Protocols / Eds. Michiels J., Fauvart M. Humana New York, NY, 2016. 244 p. (Methods in Molecular Biology. V. 1333). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5>
- Balaban N., Gerdes K., Lewis K., McKinney J.D.* A problem of persistence: still more questions than answers? // *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. V. 11. P. 587–591.
- Balaban N., Merrin I., Chait R., Kowalik L., Leibler S.* Bacterial persistence as a phenotypic switch // *Science.* 2004. V. 305. P. 1622–1625.
- Cañas-Duarte S.J., Perez-Lopez M.I., Herrfurth C., Sun L., Contreras L.M., Feussner I., Leidy C., Riaño-Pachón D.M., Restrepo S., Pedraza J.M.* An integrative approach points to membrane composition as a key factor in *E. coli* persistence // *BioRxiv.* 2020. 08.28.271171. <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.271171>
- Diskowski M., Mikusevic V., Stock C., Hänel I.* Functional diversity of the superfamily of K<sup>+</sup> transporters to meet various requirements // *Biol. Chem.* 2015. V. 396. P. 1003–1014. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0123>
- Eagle H.* A paradoxical zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin *in vitro* // *Science.* 1948. V. 107. P. 44–45.
- Eagle H., Musselman A.D.* The rate of bactericidal action of penicillin *in vitro* as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms // *J. Exper. Med.* 1948. V. 88. P. 99–131.
- Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimoni E., Wolf S.G., Minsky A.* Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 51. P. 395–405.
- Frenkiel-Krispin D., Minsky A.* Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in *E. coli*, *B. subtilis* and *D. radiodurans* // *J. Struct. Biol.* 2006. V. 156. P. 311–319.
- Gonçalves F.D., de Carvalho C.C.* Phenotypic modifications in *Staphylococcus aureus* cells exposed to high concentrations of vancomycin and teicoplanin // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00013>
- Goode O., Smith A., Zarkan A., Cama J., Invergo B.M., Belgami D., Caño-Muñiz S., Metz J., O'Neill P., Jeffries A., Norville I.H., David J., Summers D., Pagliara S.* Persister *Escherichia coli* cells have a lower intracellular pH than susceptible cells but maintain their pH in response to antibiotic treatment // *mBio.* 2021. V. 12. e0090921. <https://doi.org/10.1128/mBio.00909-21>
- Gottesman S.* Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. P. 11685–11700.
- Grant S.S., Hung D.T.* Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and oxidative stress response // *Virulence.* 2013. V. 4. P. 273–283.
- Hofer U.* Stress and disarray leading to persistence // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. V. 20. P. 63. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00669-7>
- Janissen R., Arens M., Vtyurina N.N., Rivai Z., Sunday N.D., Eslami-Mossallam B., Gritsenko A.A., Laan L., de Ridder D., Artsimovič I., Dekker N.H., Abbondanzieri E.A., Meyer A.S.* Global DNA compaction in stationary-phase bacteria does not affect transcription // *Cell.* 2018. V. 174. P. 1188–1199. e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.049>
- Jia Y., Yu C., Fan J., Fu Y., Ye Z., Guo X., Xu Y., Shen C.* Alterations in the cell wall of *Rhodococcus biphenylivorans* under norfloxacin stress // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 554957. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.554957>
- Karas V.O., Westerlaken I., Meyer A.S.* The DNA-Binding protein from starved cells (Dps) utilizes dual functions to defend cells against multiple stresses // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. P. 3206–3215. <https://doi.org/10.1128/JB.00475-15>

- Lewis K. Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. P. 357–372.
- Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters cell // *Cell.* 2014. V. 157. P. 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>
- Mohiuddin S.G., Ghosh S., Ngo H.G., Sensenbach S., Karki P., Dewangan N.K., Angardi V., Orman M.A. Cellular self-digestion and persistence in bacteria // *Microorganisms.* 2021. V. 31. P. 2269. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112269>
- Orman M.A., Brynildsen M.P. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli* // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms8983>
- Padan E., Bibi E., Ito M., Krulwich T.A. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1717. P. 67–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010>
- Peyrusson F., Nguyen T.K., Najdovski T., Van Bambeke F. Host cell oxidative stress induces dormant *Staphylococcus aureus* persisters // *Microbiol. Spectr.* 2022. V. 10. Art. e0231321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02313-21>
- Pletnev P., Osterman I., Sergiev P., Bogdanov A., Dontsova O. Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. № 4. P. 22–33.
- Podlesek Z., Butala M., Šakanović A., Žgur-Bertok D. Antibiotic induced bacterial lysis provides a reservoir of persisters // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2016. V. 109. P. 523–528. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0657-x>
- Prasetyoputri A., Jarrad A.M., Cooper M.A., Blaskovich M.A.T. The Eagle effect and antibiotic-induced persistence: two sides of the same coin? // *Trends Microbiol.* 2019. V. 27. P. 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.007>
- Rittershaus E.S., Baek S.H., Sasseti C.M. The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence // *Cell Host Microbe.* 2013. V. 13. P. 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.012>
- Saito H., Kobayashi H. Bacterial responses to alkaline stress // *Sci. Prog.* 2003. V. 86. P. 271–282. <https://doi.org/10.3184/003685003783238635>
- 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. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux001>
- Van den Bergh B., Schramke H., Michiels J.E., Kimkes T.E.P., Radzikowski J.L., Schimpf J., Vedelaar S.R., Burschel S., Dewachter L., Lončar N., Schmidt A., Meijer T., Fauvart M., Friedrich T., Michiels J., Heinemann M. Mutations in respiratory complex I promote antibiotic persistence through alterations in intracellular acidity and protein synthesis // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 546. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28141-x>
- Wainwright J., Hobbs G., Nakouti I. Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies // *Arch. Microbiol.* 2021. V. 203. P. 5899–5906.
- Wang X.T., Xiao S.D., Ma B.G. Molecular responses to heat stress in *Escherichia coli* // *Stress: Genetics, Epigenetics and Genomics. Handbook of Stress Series* / Ed. Fink G. Elsevier, 2020. V. 4. P. 289–296.

## Survival of Aging Microbial Populations under Lethal Impacts

G. I. El-Registan<sup>1</sup>, \*, N. G. Loiko<sup>1</sup>, and Yu. A. Nikolaev<sup>1</sup>

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

\*e-mail: anmsaa@yandex.ru

Received June 4, 2022; revised June 22, 2022; accepted June 23, 2022

**Abstract**—Microorganisms inhabiting natural environments are periodically subject to growth-inhibiting and lethal action of stress factors. Bacterial populations are known to survive and preserve its species identity in the presence of lethal doses of antibiotics due to viable nondividing dormant persister cells. Since the mechanisms of population survival under lethal and especially combined action of chemical and physical stress agents are unknown, this was the goal of the present work. Comparative analysis of survival of the stationary-phase cultures of *Escherichia coli* K-12 MG1655 under lethal impacts of ciprofloxacin (CIP) and a lysing solution, as well as of heat and alkaline shocks, was carried out. Higher resistance to stress impacts was shown for (1) aging stationary-phase cells containing a developed biocrystalline nucleoid, compared to the cells just entering the stationary phase; and (2) the populations incubated in a nutrients-free buffer, rather than in a growth medium. CIP treatment of the populations of statically incubated cultures revealed their higher resistance to extreme CIP concentrations (100 µg/mL) compared to the biocidal dose (10 µg/mL) (the Eagle effect). The subpopulations surviving the lethal impacts of heat and pH shock were found to exhibit heterogeneity due to reversion to growth of the cells temporary lacking ability to form colonies on solid media (after 10–30 days of incubation). Resistance of the cells surviving the heat or pH stresses to the subsequent biocidal treatment with CIP suggests their identification as persister cells. Heterogeneity of the persister subpopulation in their stress resistance may be important for adjustment of the modes for sterilization and antibiotic therapy.

**Keywords:** *Escherichia coli*, persister cells, survival, stress agents, heterogeneity, pH, ciprofloxacin, heat shock



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИДЕГРАДАЦИЯ ГЛИЦИНБЕТАИНА В РЕАКЦИИ СТИКЛЕНДА  
ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИЕЙ *HALONATRONOMONAS BETAINI*,  
ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ СОДОВОГО ОЗЕРА ТАНАТАР III© 2022 г. Е. Н. Деткова<sup>а</sup>, Ю. В. Болтянская<sup>а</sup>, В. В. Кевбрин<sup>а, \*</sup><sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: kevbrin@inmi.ru

Поступила в редакцию 07.06.2022 г.

После доработки 14.06.2022 г.

Принята к публикации 14.06.2022 г.

Обнаружена способность галоалкалофильного микроорганизма *Halonatronomonas betaini* Z-7014<sup>T</sup> использовать глицинбетаин как акцептор электронов в реакции Стикленда с его последующим восстановительным расщеплением до триметиламина и ацетата. В качестве доноров электронов использовались лейцин, аланин, валин, изолейцин и серин, а также неидентифицированные олигопептиды, входящие в состав таких белковых гидролизатов, как дрожжевой экстракт, триптон, пептон и сойтон. Максимальная стимуляция роста культуры бетаином была получена на дрожжевом экстракте. Для сочетаний аминокислота + бетаин были определены соотношения субстрат/продукт и получены балансовые уравнения. Впервые продемонстрирована деградация бетаина в реакции Стикленда для алкалофильных микроорганизмов, входящих в состав биоценозов содовых озер.

**Ключевые слова:** бетаин, аминокислоты, триметиламин, реакция Стикленда, галоалкалофилы, содовые озера

**DOI:** 10.31857/S002636562260050X

Содовые озера представляют собой особые водные экосистемы, отличительной чертой которых является присутствие, помимо хлорида, также и карбоната/бикарбоната натрия в различных, вплоть до насыщающих, концентрациях, что, соответственно, определяет устойчивые значения pH среды в щелочном диапазоне. Несмотря на экстремальные условия, такие экосистемы характеризуются высоким биоразнообразием галофильных микроорганизмов с разной степенью алкалофилии (Grant, Jones, 2016). Развитие любых микробных биоценозов сопровождается как ростом, так и отмиранием клеток, в результате чего в микроокружении живых клеток появляются органические компоненты отмершей микробной биомассы. Одним из таких компонентов, характерных именно для биоценозов, населяющих водоемы с повышенной концентрацией натрия, является глицинбетаин.

Глицинбетаин (далее бетаин) представляет собой триметилированное производное глицина, является широко распространенным осморегулятором и обнаруживается повсеместно в клетках живых организмов от бактерий и архей до растений, морских простейших и млекопитающих (Yancey et al., 1982; Galinski, Truper, 1994; Annunziata et al., 2019). С точки зрения экологической микробио-

логии наибольший интерес представляют процессы анаэробной деструкции бетаина, при котором его разложение является неполным и приводит к образованию веществ с меньшей молекулярной массой, могущих служить субстратами для других микроорганизмов биоценоза. Изучение бактериальной анаэробной деструкции бетаина началось с 80-х гг. XX в. и продолжается с некоторыми перерывами до настоящего времени, причем основными объектами выступали сначала негалофильные, а затем галофильные бактерии (Oren, 1990; Zou et al., 2016).

Анаэробные галоалкалофилы, участвующие в разложении бетаина, впервые были выделены и подробно охарактеризованы лишь недавно сотрудниками ФИЦ Биотехнологии РАН (Sorokin, 2021; Voltyanskaya et al., 2022). В обеих работах исходным материалом послужили природные образцы гиперсоленых озер Алтайского края. В первой работе из накопительных культур с бетаином было получено два штамма – ANB-GB1 и ANB-GB2, относящиеся к роду *Natroniella* и способные к сбраживанию бетаина до триметиламина (ТМА) и ацетата, а также штамм AArg-GB, относящийся к роду *Halalkaliarchaeum* (Sorokin, 2021). Последний разлагал бетаин в окислительно-восстановительной реакции с серой как акцептором электронов.



Во второй работе был выделен штамм Z-7014<sup>T</sup>, образовавший новый род и вид, *Halonatronomonas betaini*, в порядке *Halanaerobiales* (Boltyanskaya et al., 2022). Несмотря на то, что исходно штамм был выделен на минеральной среде с бетаином, рост чистой культуры в этих условиях был крайне слабым (максимальная оптическая плотность (ОП<sub>600</sub>) 0.04), но воспроизводимым на протяжении 5 последовательных пересевов. В каждом пересеве был детектирован ТМА, являющийся характерным продуктом анаэробного разложения бетаина. В этой связи мы выдвинули предположение, что штамм Z-7014<sup>T</sup> использует бетаин не как источник энергии и углерода, а как акцептор электронов, донором которых служат компоненты дрожжевого экстракта в низкой концентрации (0.2 г/л). Последний часто добавляют в среды для алкалофилов как источник ростовых факторов. В этом случае слабый рост может объясняться лимитированием одним из компонентов редокс-реакции.

Целью данной работы было проверить это предположение, выявить возможность роста штамма Z-7014<sup>T</sup> с бетаином как акцептором на пептидах и индивидуальных аминокислотах, оценить стимулирующий эффект, провести анализ возможных продуктов реакций и составить для них балансовые уравнения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Организм и культивирование.** В работе использовали типовой штамм *Halonatronomonas betaini* Z-7014<sup>T</sup> (=КСТС 25237<sup>T</sup>, =VKM В-3506<sup>T</sup>), выделенный из осадков содового озера Танатар III (Алтайский край, Россия). Организм культивировали в строго анаэробных условиях при 42°C в пробирках Хангейта или бутылках объемом 500 мл на минеральной среде с рН 8.5, описанной ранее (Boltyanskaya et al., 2022).

Концентрации белковых гидролизатов в опытах (дрожжевой экстракт, пептон, сойтон, триптон, казаминовые кислоты) составляли 1.5 г/л. Для скрининга на предмет использования аминокислот совместно с бетаином их также вносили до конечной концентрации 1.5 г/л. Для получения балансовых уравнений концентрации аланина, лейцина, изолейцина и валина были около 11 мМ, серина – 20 мМ. Раствор бетаина, предварительно нейтрализованный 12 М NaOH, вносили в среды до конечной концентрации 3 г/л (19.5 мМ). Такие значения были взяты, исходя из описанных в литературе соотношений аминокислота/бетаин (Naumann et al., 1983). Среды с аминокислотами дополняли (г/л): NH<sub>4</sub>Cl – 0.5, дрожжевым экстрактом – 0.2, а также раствором витаминов – 10 мл/л (Drake, 1994).

Засев производили культурами, взятыми из среды логарифмической фазы роста, из расчета

1–3% (об./об.). Опыты проводили в трех независимых повторностях. Все полученные данные являются усредненными по результатам этих экспериментов.

**Определение роста.** Рост культуры контролировали по увеличению оптической плотности (ОП) при 600 нм на спектрофотометре КФК-3 (Россия) в 1-см кюветках.

**Аналитические методы.** В культуральной жидкости, свободной от клеток, измеряли концентрации субстратов и продуктов микробной активности. Аммоний определяли по реакции с реактивом Несслера после изотермической микровозгонки в виде свободного аммиака. В образце культуральной жидкости, оставшейся после удаления аммония, определяли концентрацию аминокислот методом с *o*-фталевым диальдегидом (Alvarez-Coque et al., 1989). Для каждой аминокислоты была построена своя калибровочная кривая. Бетаин определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Стайер (“Аквилон”, Россия). Разделение проводили на колонке Partisil 5 ODS 3 (“Whatman”, США). Состав элюента: 20 мМ КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub>, 10 мМ КОН, 1% ацетонитрила; рН 6.9, расход 0.8 мл/мин. Детектирование проводили с УФ детектором при 210 нм. ТМА, ацетат и другие летучие жирные кислоты (ЛЖК) определяли методом ГЖХ на хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия). Газ-носитель – азот, детектор – пламенно-ионизационный. Образцы для определения ТМА подщелачивали 6 М КОН в герметично закрытой виале, перемешивали и 1 мкл жидкой фазы вводили в капиллярную колонку PoraPLOT 25 м × 0.32 мм × 10 мкм (“Phenomenex”, США). Температурный режим колонки – изотермический, 160°C. Образцы для определения ЛЖК подкисляли 5 М фосфорной кислотой, перемешивали и 1 мкл образца вводили в насадочную колонку 1 м × 3 мм, заполненную фазой Carborpack C, 0.3% Carbowax 20M, 0.1% Н<sub>3</sub>Р<sub>4</sub> (“Supelco”, США). Температурный режим колонки – программируемый.

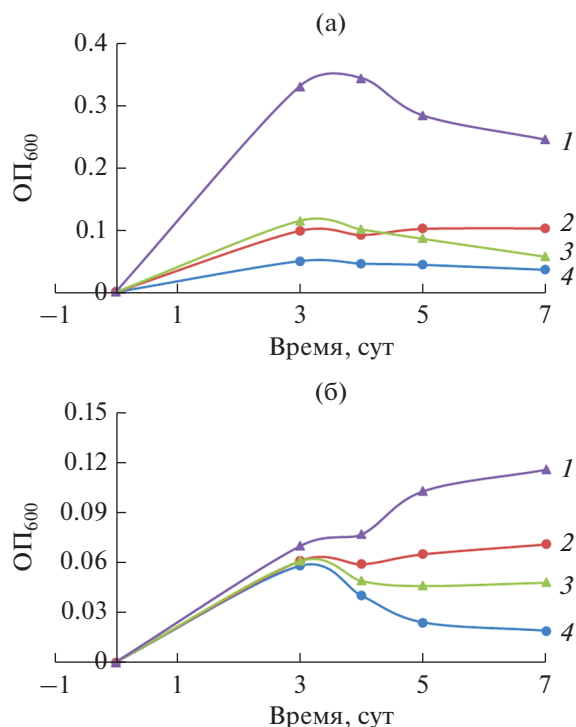
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние бетаина на рост *H. betaini* на белковых гидролизатах.** Ранее нами было показано, что штамм Z-7014<sup>T</sup> способен сбраживать коммерческие пептидоподобные субстраты, но не белки (Boltyanskaya et al., 2022). Предпочтительным оказался дрожжевой экстракт, рост на триптоне, сойтоне и пептоне был более слабым. С учетом поставленной задачи представлялось важным проверить, стимулирует ли присутствие бетаина рост штамма на этих белковых гидролизатах (рис. 1а, 1б). Как видно из графиков, наиболее значительную стимуляцию роста (3–3.5-кратная) наблюдали для пары дрожжевой экстракт + бетаин. При росте на триптоне наличие бетаина приводило к

увеличению конечной ОП культуры примерно вдвое, однако абсолютные значения оставались существенно более низкими, чем даже в случае дрожжевого экстракта без акцептора. Напротив, на сойтоне и пептоне в первые трое суток роста в случае присутствия бетаина стимуляция была либо очень слабой (сойтон), либо вовсе отсутствовала (пептон). В обоих случаях в отсутствие бетаина рост на сойтоне и пептоне достигал максимума через 3 сут, после чего начинался лизис. В присутствии бетаина рост на сойтоне продолжался и после 3 сут, тогда как на пептоне ОП достигала максимума через 3 сут и оставалась примерно постоянной, без признаков лизиса культуры. Возможно, при росте на пептоне бетаин играет роль не акцептора, а вещества, оказывающего стабилизирующее действие на клетки. Разница в стимулирующем эффекте может быть частично связана с различиями в аминокислотном составе белковых гидролизатов (табл. 1). Также известно, что, помимо аминокислот, эти гидролизаты содержат олигопептиды различной длины, количества которых не нормируются, а дрожжевой экстракт, кроме того, содержит еще и вещества небелковой природы (Zimbro, Power, 2003).

Помимо увеличения ОП при росте на среде с дрожжевым экстрактом и бетаином было обнаружено 4-кратное в сравнении с ростом без бетаина возрастание концентрации ацетата — основного продукта брожения белков, а также появление 7.8 мМ ТМА, индикатора использования бетаина. В присутствии бетаина также появился набор ЛЖК, характерных для анаэробного распада белков (менее 1 мМ каждой): пропионат, *изо*-бутират, *н*-бутират, 2-метилбутират и *изо*-валерат. Исходя из полученных результатов, представлялось важным оценить возможность стимуляции роста бетаином, заменив дрожжевой экстракт индивидуальными аминокислотами.

**Влияние бетаина на использование аминокислот *H. betaini*.** Ранее было показано, что *H. betaini* не сбраживает ни одну из 20 кодируемых (протеиногенных) аминокислот (Boltanskaya et al., 2022). Однако отсутствие роста на индивидуальных



**Рис. 1.** Динамика роста *H. betaini* на белковых гидролизатах с бетаином и без него: (а) — (1) дрожжевой экстракт + бетаин; (2) триптон + бетаин; (3) дрожжевой экстракт; (4) триптон; (б): — (1) сойтон + бетаин; (2) пептон + бетаин; (3) сойтон; (4) пептон.

аминокислотах не исключает возможности их утилизации в окислительно-восстановительной реакции с внешним акцептором — бетаином в нашем случае. Оказалось, что в таких условиях рост штамма поддерживают пять из 20 протестированных аминокислот — лейцин, аланин, валин, *изо*-лейцин и серин. Стимуляции роста бетаином на остальных аминокислотах либо не происходило вообще, либо эффект был крайне слабым. На рис. 2 представлены данные по росту штамма Z-7014<sup>T</sup> на парах аминокислота + бетаин, а в табл. 2 показаны количества использованных субстратов, образовавшихся продуктов, а также соотношения

**Таблица 1.** Процентное содержание свободных аминокислот в белковых гидролизатах Bacto (BD, USA) (Zimbro, Power, 2003). Показаны только те аминокислоты, которые использует штамм Z-7014<sup>T</sup>

| Аминокислота | Пептон | Сойтон | Триптон | Дрожжевой экстракт | Казаминовые кислоты |
|--------------|--------|--------|---------|--------------------|---------------------|
| Аланин       | 1.2    | 0.4    | 1.0     | 4.4                | 3.0                 |
| Изолейцин    | 0.6    | 0.6    | 1.3     | 1.8                | 3.1                 |
| Лейцин       | 1.6    | 1.7    | 4.8     | 3.0                | 4.6                 |
| Серин        | 0.4    | 0.3    | 0.7     | 1.3                | 4.3                 |
| Валин        | 0.7    | 0.4    | 1.7     | 2.2                | 4.7                 |
| Сумма        | 4.5    | 3.4    | 9.5     | 12.7               | 19.7                |

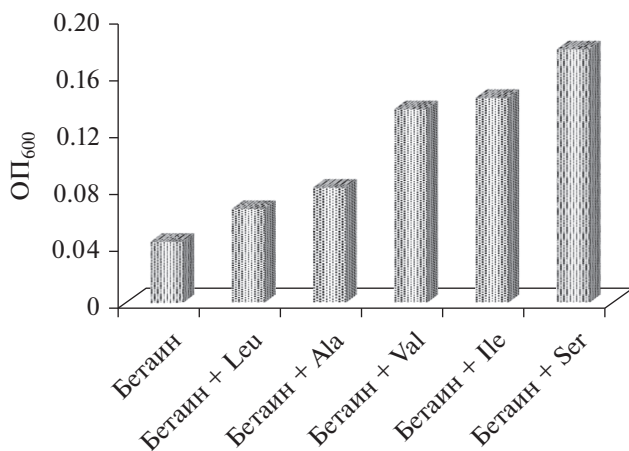


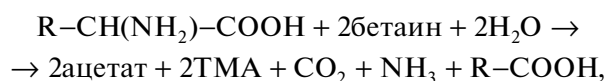
Рис. 2. Максимально достигнутые значения ОП при росте *H. betaini* на аминокислотах с бетаином.

между ними. Как видно из табл. 2, во всех случаях основными продуктами являлись ацетат, ТМА и аммиак. При росте на лейцине, изолейцине и валине дополнительно обнаруживались продукты дезаминирования этих аминокислот – *изо*-валерат, 2-метилбутират и *изо*-бутират соответственно. Следует отметить, что те же органические кислоты были идентифицированы при росте *H. betaini* на дрожжевом экстракте, что говорит о способности организма использовать одновременно и пептиды, и свободные аминокислоты. Продукты неполного восстановления бетаина – N,N-диметилглицин и саркозин, а также монометиламин и диметиламин среди продуктов реакций обнаружены не были. Потребление аланина, изолейцина и валина оказалось практически полным, тогда как лейцин и серин израсходовались лишь частично. При этом максимальный рост с бетаином наблюдался на серине, а минимальный – на лейцине. Рост на аланине с бетаином был почти вдвое слабее, чем на изолейцине, валине или серине, однако количе-

ства образовавшихся продуктов были близки (рис. 2, табл. 2). Возможно, распад аминокислот различался по энергетическому выходу.

Интересным является тот факт, что, несмотря на хороший рост на индивидуальных аминокислотах с бетаином, рост на паре казиминовые кислоты + бетаин был близок к контролю (ОП<sub>600</sub> 0.03). При этом удельное содержание пяти аминокислот, используемых штаммом Z-7014<sup>T</sup>, в казиминовых кислотах было выше, чем в дрожжевом экстракте (табл. 1). Мы предполагаем, что при совместном присутствии пептидов и аминокислот (как в дрожжевом экстракте), штамм Z-7014<sup>T</sup>, возможно, предпочитает пептиды, а не аминокислоты. В составе казиминовых кислот пептидов нет (Zimbrow, Power, 2003). С другой стороны, отсутствие роста может быть связано с низким удельным суммарным содержанием лейцина, аланина, валина, изолейцина и серина в казиминовых кислотах: 1.5 г/л казиминовых кислот соответствуют 0.3 г/л этих аминокислот в сумме. Однако четырехкратное увеличение концентрации казиминовых кислот не привело к заметному улучшению роста.

Впервые совместное использование аминокислот в реакции Стикленда с бетаином как акцептором было продемонстрировано у анаэробной бактерии *Clostridium sporogenes* (Naumann et al., 1983). Как и в случае *H. betaini*, бетаин в качестве единственного субстрата не использовался. Для лейцина, аланина, валина и изолейцина авторами были определены продукты реакций и получено общее балансовое уравнение:

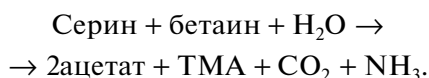


где R-CH<sub>3</sub> для аланина, для остальных трех аминокислот структуры, соответствующие каждой аминокислоте.

Таблица 2. Количественные значения субстратов и продуктов при росте *H. betaini* на аминокислотах с бетаином. Символ Δ обозначает разницу между начальным и конечным значением. Ак – аминокислота, Бет – бетаин. Все концентрации веществ даны в мМ

| Субстрат     | Δ ОП <sub>600</sub> | Δ Ак | Δ Бет | Δ Ацетат | Δ Другие ЛЖК            | Δ NH <sub>3</sub> | Δ ТМА | Δ Бет/Δ Ак | Δ Ак/Δ NH <sub>3</sub> | Δ Бет/Δ ТМА | Δ Ак/Δ ЛЖК |
|--------------|---------------------|------|-------|----------|-------------------------|-------------------|-------|------------|------------------------|-------------|------------|
| Бетаин       | 0.04                | –    | 4.3   | 3.9      | –                       | 0.5               | 3.5   | –          | –                      | 1.2         | –          |
| Бетаин + Leu | 0.07                | 6.1  | 13.5  | 12.0     | <i>Изо</i> -валерат 4.2 | 5.4               | 10.1  | 2.2        | 1.1                    | 1.3         | 1.5        |
| Бетаин + Ala | 0.08                | 9.7  | 18.8  | 30.3     | –                       | 8.3               | 14.9  | 1.9        | 1.2                    | 1.3         | –          |
| Бетаин + Val | 0.14                | 8.9  | 18.1  | 17.0     | <i>Изо</i> -бутират 6.4 | 9.7               | 16.7  | 2.1        | 0.9                    | 1.1         | 1.4        |
| Бетаин + Ile | 0.14                | 9.4  | 19.5  | 19.8     | 2-Метилбутират 8.6      | 8.3               | 17.8  | 2.1        | 1.1                    | 1.1         | 1.1        |
| Бетаин + Ser | 0.18                | 11.2 | 12.0  | 23.5     | –                       | 9.9               | 11.6  | 1.1        | 1.1                    | 1.0         | –          |

Проведенные балансовые расчеты (колонки отношений субстрат/продукт в табл. 2) показали соответствие полученных нами отношений коэффициентам в вышеприведенном уравнении. Такое же соответствие получено нами и для серина, для которого не было обнаружено иных продуктов, кроме нижеперечисленных, и для которого известно следующее уравнение (Mouné et al., 1999):



После пионерской работы Naumann et al. (1983) было обнаружено, что среди видов рода *Clostridium* реакция Стикленда с бетаином довольно распространена (Möller et al., 1986), а позднее было выделено еще несколько таксономически разных анаэробов, способных к осуществлению этой реакции: *Peptoclostridium* (ранее *Eubacterium*) *acidaminophilum* (Zindel et al., 1988), *Clostridium halophilum* и *Peptoclostridium* (ранее *Clostridium*) *litorale* (Fendrich et al., 1990), *Haloanaerobacter salinarius* (Mouné et al., 1999), *Halanaerobacter lacunarum* (ранее *Halobacteroides lacunaris*) (La Cono et al., 2015), "*Oceanirhabdus seepicola*" (Li et al., 2021).

В анаэробных условиях деградация бетаина происходит тремя различными способами: 1) брожением; 2) использованием в качестве субстрата и донора электронов в окислительно-восстановительной реакции; 3) использованием в качестве акцептора электронов при росте на аминокислотах (реакция Стикленда) и других веществах-доноров, среди которых формиат, водород и другие, ключевые для микробного сообщества метабиотика.

К бродильщикам относятся *Eubacterium limosum* (Müller et al., 1981), *Sporomusa sphaeroides* и *S. ovata* (Möller et al., 1984), *Acetohalobium arabaticum* (Жилина, Заварзин, 1990), *Haloanaerobium alcaliphilum* (Tsai et al., 1995), а также алкалофильные штаммы *Natroniella* spp. (Sorokin, 2021), осуществляющие этот процесс в условиях содовых озер. Использование бетаина как донора с сульфатом в качестве акцептора электронов характерно, в частности, для видов *Desulfobacterium* (Heijthuisen, Hansen, 1989) и галоалкалофильной археи *Halalkaliarchaeum* sp. (Sorokin, 2021).

Таким образом, к началу наших исследований восстановление бетаина было продемонстрировано только для микроорганизмов, выделенных из пресноводных и соленых водоемов, но оставалось неизвестным для алкалофилов. Следовательно, *H. betaini* является первым организмом, осуществляющим эту реакцию в условиях высокой карбонатной щелочности.

Учитывая, что *H. betaini* был выделен из природного сообщества, можно предположить, что он является важным компонентом трофической

цепи, разлагающим глицинбетаин с образованием ТМА и ацетата — известных субстратов для метаногенных и сульфатредуцирующих бактерий.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д. б. н. Т.Н. Жилиной за предоставление штамма Z-7014<sup>T</sup> для работы.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Новая экстремально галофильная гомоацетатная бактерия *Acetohalobium arabaticum* gen. nov., sp. nov. // Доклады АН СССР. 1990. Т. 311. С. 745–747.
- Zhilina T.N., Zavarzin G.A. A new extremely halophilic homoacetate bacterium *Acetohalobium arabaticum* gen. nov., sp. nov. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1990. V. 311. P. 745–747.
- Alvarez-Coque M.C., Hernandez M.J., Camanas R.M., Fernandez C. Studies on the formation and stability of isoindoles derived from amino acids, o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine // Anal. Biochem. 1989. V. 180. P. 172–176.
- Annunziata M.G., Ciarmiello L.F., Woodrow P., Dell'Aversana E., Carillo P. Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses // Front. Plant. Sci. 2019. V. 10. P. 230.
- Boltanskaya Y.V., Kevbrin V.V., Grouzdev D.S., Detkova E.N., Koziaeva V.V., Novikov A.A., Zhilina T.N. *Halonatronomonas betaini* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic isolate from soda lake capable of betaine degradation, and proposal of *Halarsenatibacteraceae* fam. nov. and *Haloethermotrichaceae* fam. nov. within the order *Halanaerobiales* // Syst. Appl. Microbiol. 2022. (в печати).
- La Cono V., Arcadi E., La Spada G., Barreca D., Laganà G., Bellocco E., Catalfamo M., Smedile F., Messina E., Giuliano L., Yakimov M.M. A three-component microbial consortium from deep-sea salt-saturated anoxic Lake Thetis links anaerobic glycine betaine degradation with methanogenesis // Microorganisms. 2015. V. 3. P. 500–517.
- Drake H.L. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" pathway: past and current perspectives // Acetogenesis / Ed. Drake H.L. Chapman & Hall, N.Y., 1994. P. 3–60.

- Fendrich C., Hippe H., Gottschalk G. *Clostridium halophilum* sp. nov. and *C. litorale* sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction // Arch. Microbiol. 1990. V. 154. P. 127–132.
- Galinski E.A., Trüper H.G. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems // FEMS Microbiol. Rev. 1994. V. 15. P. 95–108.
- Grant W.D., Jones B.E. Bacteria, archaea and viruses of soda lakes // Soda Lakes of East Africa / Ed. Schagerl M. Springer International Publishing, Switzerland, 2016. P. 97–147.
- Heijthuisen J.H.F.G., Hansen T.A. Anaerobic degradation of betaine by marine *Desulfobacterium* strains // Arch. Microbiol. 1989. V. 152. P. 393–396.
- Li L., Zhang W., Zhang S., Song L., Sun Q., Zhang H., Xiang H., Dong X. Bacteria and archaea synergistically convert glycine betaine to biogenic methane in the Formosa cold seep of the South China Sea // mSystems. 2021. V. 6. P. e0070321.
- Möller B., Hippe H., Gottschalk G. Degradation of various amine compounds by mesophilic clostridia // Arch. Microbiol. 1986. V. 145. P. 85–90.
- Möller B., Oßmer R., Howard B.H., Gottschalk G., Hippe H. *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. // Arch. Microbiol. 1984. V. 139. P. 388–396.
- Mouné S., Manac'h N., Hirschler A., Caumette P., Willison J.C., Matheron R. *Haloanaerobacter salinarius* sp. nov., a novel halophilic fermentative bacterium that reduces glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen or serine as electron donors; emendation of the genus *Haloanaerobacter* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 103–112.
- Müller E., Fahlbusch K., Walther R., Gottschalk G. Formation of N,N-dimethylglycine, acetic acid, and butyric acid from betaine by *Eubacterium limosum* // Appl. Environ. Microbiol. 1981. V. 42. P. 439–445.
- Naumann E., Hippe H., Gottschalk G. Betaine: New oxidant in the Stickland reaction and methanogenesis from betaine and L-alanine by a *Clostridium sporogenes*–*Methanosarcina barkeri* coculture // Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 45. P. 474–483.
- Oren A. Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments // Antonie van Leeuwenhoek. 1990. V. 58. P. 291–298.
- Sorokin D.Y. Microbial utilization of glycine betain in hypersaline soda lakes // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 569–577.
- Tsai C.-R., Garcia J.-L., Patel B.K.C., Cayol J.-L., Baresi L., Mah R.A. *Haloanaerobium alcaliphilum* sp. nov., an anaerobic moderate halophile from the sediments of Great Salt Lake, Utah // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 301–307.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems // Science. 1982. V. 217. P. 1214–1222.
- Zimbro M.J., Power D.A. (eds.). Difco & BBL Manual. Sparks, MD: Becton, Dickinson and Company, 2003.
- Zindel U., Freudenberg W., Rieth M., Andreesen J.R., Schnell J., Widdel F. *Eubacterium acidaminophilum* sp. nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H<sub>2</sub> or formate. Description and enzymatic studies // Arch. Microbiol. 1988. V. 150. P. 254–266.
- Zou H., Chen N., Shi M., Xian M., Song Y., Liu J. The metabolism and biotechnological application of betaine in microorganism // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 3865–3876.

## Glycine Betaine Degradation via the Stickland Reaction by a Haloalkaliphilic Bacterium *Halonatronomonas betaini* Isolated from the Tanatar III Soda Lake

E. N. Detkova<sup>1</sup>, Yu. V. Boltanskaya<sup>1</sup>, and V. V. Kevbrin<sup>1</sup>, \*

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

\*e-mail: kevbrin@inmi.ru

Received June 7, 2022; revised June 14, 2022; accepted June 14, 2022

**Abstract**—The haloalkaliphilic microorganism *Halonatronomonas betaini* Z-7014<sup>T</sup> was found to use glycine betaine as an electron acceptor in the Stickland reaction, resulting in its subsequent degradation to trimethylamine and acetate. The electron donors used were leucine, alanine, valine, isoleucine, and serine, as well as unidentified oligopeptides present in such protein hydrolysates as yeast extract, tryptone, peptone, and soytone. The most pronounced growth stimulation by betaine was observed in the presence of yeast extract. The substrate/product ratios were determined for the combinations of amino acids and betaine, and the balance equations were obtained. This is the first report on betaine degradation in the Stickland reaction by alkaliphilic microorganisms from soda lake biocoenoses.

**Keywords:** betaine, amino acids, trimethylamine, Stickland reaction, haloalkaliphiles, soda lakes

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИСОСТАВ МИКРОБНЫХ ОБРАСТАНИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ПЛАСТИКОВ  
И СТАЛИ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ В ВОДОЕМЕ НА ПОЛИГОНЕ  
ТВЕРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ<sup>1</sup>© 2022 г. Т. П. Турова<sup>а</sup>, Д. Ш. Соколова<sup>а</sup>, Е. М. Семенова<sup>а</sup>, Д. М. Киреев<sup>б</sup>,  
А. Б. Лаптев<sup>с</sup>, Т. Н. Назина<sup>а</sup>, \*<sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Уфимский государственный нефтяной технический университет”, Уфа, 450064 Россия<sup>с</sup>Федеральное государственное унитарное предприятие “Всероссийский научно-исследовательский институт авиационных материалов” НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 105005 Россия

\*e-mail: nazina@inmi.ru

Поступила в редакцию 09.06.2022 г.

После доработки 05.07.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

Целью настоящей работы было исследование состава микробных сообществ, формирующихся на поверхности образцов полиэтилентерефталатных (ПЭТ), полистирольных (ПС) и стальных (СТ) материалов, которые экспонировались в небольшом водоеме, расположенном на территории полигона твердых бытовых отходов (ТБО). Таксономический состав бактерий и микроскопических грибов был определен методом высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК и ITS рибосомного оперона соответственно. В результате биоинформатического анализа было показано доминирование бактерий филумов *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*), *Actinomycetota*, *Bacteroidota* и *Bacillota* в обрастаниях на всех образцах. Наблюдались количественные изменения в составе доминирующих таксонов бактерий, связанные в основном со временем экспозиции, а не с материалом образцов. С использованием программы iVikodak были предсказаны функциональные характеристики бактерий в обрастаниях. Показана потенциальная способность исследуемых бактериальных сообществ осуществлять деградацию полимерных материалов и ксенобиотиков, а также коррозию стали. В сообществах грибов доминировали сапротрофные представители филумов *Ascomycota* и *Vasidiomycota*. Влияние условий водной среды на общий состав сообщества грибов в процессе экспозиции оказалось менее существенным, чем для бактерий, оно прослеживалось для отдельных родов грибов, так же, как и влияние материала образцов. В составе доминирующих грибов, выявлены виды потенциально способные к биодegradации полимеров и коррозии металлов. Микрофотографии подтвердили локальное разрушение исходных образцов материалов в результате экспозиции в водной среде. Выделены чистые культуры бактерий родов *Bacillus* и *Brevundimonas*, деградирующие алканы, жирные кислоты и фенолы.

**Ключевые слова:** полигоны твердых бытовых отходов, высокопроизводительное секвенирование, 16S рРНК, ITS, бактерии, грибы, полиэтилентерефталат, полистирол, сталь, ксенобиотики, функциональная активность, биодegradация

**DOI:** 10.31857/S0026365622600523

Вода и водные объекты являются наиболее значимыми условиями существования живых организмов, включая человека. Изучение экологического состояния пресноводных водоемов, а также изменения его в результате антропогенного воздействия является важнейшей задачей. Основными источниками загрязнения водных объек-

тов являются промышленные и бытовые сточные воды, хотя в современных условиях для их очистки все чаще применяется “экологически чистая” биологическая утилизация отходов. Основой таких очистных сооружений являются сообщества микроорганизмов, которые с течением времени подстраиваются по своему составу и ферментативному аппарату под перерабатываемые субстраты, в том числе, полимеры и токсичные ксенобиотики. Кроме того, для уменьшения объема промышленных сточных вод, требующих специ-

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622600523 для авторизованных пользователей.

альной очистки, широко применяют повторное использование воды, так называемые “оборотные воды”, циркулирующие в замкнутом цикле или используемые в других стадиях производства. Как показали проведенные нами ранее исследования, оборотные воды нефтехимического предприятия могут являться возможным источником бактерий – потенциальных деструкторов синтетических полимеров (Турова и соавт., 2020). При этом в оборотной воде наблюдалась селекция биодеструкторов, а их разнообразие и доля в сообществе возрастала (Lapteva et al., 2021).

Большую опасность для природных водоемов представляют также полигоны твердых бытовых отходов (ТБО), которые могут оказывать значительное негативное влияние на качество как подземных вод, так и наземных природных водных объектов. Воздействие ТБО на почву и водоемы обусловлено миграцией жидкого фильтрата, образующегося в результате процессов деградации отходов. В настоящее время ведутся активные исследования микробных сообществ, развивающихся как в массе ТБО (Stamps et al., 2016; Ke et al., 2022), так и в фильтрах, производимых разлагающимися отходами (Huang et al., 2005; Hugo et al., 2022). С использованием высокопроизводительного секвенирования и анализа гена 16S рРНК показано, что на свалках ТБО в целом и в производимых ими жидких фильтрах обитают функционально разнообразные микробные сообщества.

Значительную долю бытовых отходов составляют различные полимеры, в частности, полиэтиленотерефталат (ПЭТ) и полистирол (ПС), а также металлолом. Медленное разрушение полимеров в результате деполимеризации, фотохимических и химических процессов приводит к образованию ацетальдегида, производных терефталевой кислоты, стирола, а также органических соединений и металлов (цинка, свинца), которые могут переходить в фильтрат (Вайсман, 2012; Christensen et al., 2019). Кроме того, при деградации органических отходов, включающих растворители, лаки, краски, образуются токсичные соединения, такие как фенол, крезол, алкилбензолы, полифенолы, а также хлорсодержащие ароматические соединения. В толще отходов наблюдается также биокоррозия металлов, инициируемая микроорганизмами. Кроме того, кислоты, образующиеся при окислении органических соединений, способствуют снижению значений pH в жидкой фазе от 7.5–7 до 5–4 и растворению металлов, которые переходят в фильтрат (Milyutina et al., 2020). Токсичные ксенобиотики и окисленные формы металлов в результате миграции свалочного фильтрата могут поступать в водные объекты.

Целью настоящей работы было определение филогенетического и функционального разнообразия прокариот и микроскопических грибов в

обрастающих, формирующихся на поверхности полимеров и стали, экспонированных в водоеме на территории полигона ТБО, *in silico* поиск ферментов биodeградации полимеров и ксенобиотиков у выявленных прокариот, а также выделение бактерий, разлагающих ПЭТ, ароматические углеводороды и ксенобиотики.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Описание водоема и подготовка образцов.** Пресный водоем, на котором проводилось исследование, расположен на территории полигона ТБО в районе с. Черкассы (Башкирия, РФ). Площадь водоема – около 1.5 м<sup>2</sup> (рис. S1). Водоем находится у подножия природного холма, засыпанного мусором. Поверхностные и дождевые воды с основного массива свалки стекают по склону и наполняют этот водоем. Кроме того, водоем, по-видимому, подпитывается из подземных источников, поскольку никогда не высыхает полностью. Глубина водоема 1.2–1.5 м. На поверхности воды наблюдается маслянистая радужная пленка. Исследования проводили с использованием образцов полиэтиленотерефталата (ПЭТ), полистирола (ПС) и стали 20 (СТ). Размеры образцов составляли 100 мм × 10 мм × 2 мм. Образцы материалов экспонировали в период с 15 июня по 15 августа 2020 года, в течение 60 сут, с отбором двух партий образцов – после 10 и 60 сут экспозиции. По причине засушливого лета, уровень воды в этот период упал на 40–50 см, поэтому глубина погружения образцов в начале экспозиции составляла 80 см, а сняты они были с глубины 20–30 см. Температура воды в период экспозиции составляла 15–20°C.

**Химический состав воды** был определен в испытательном лабораторном центре Федерального бюджетного учреждения здравоохранения “Центр гигиены и эпидемиологии в республике Башкортостан” согласно сертифицированным методам исследования (табл. S1).

**Микроскопические методы.** При исследовании микробных обрастаний и поверхности образцов применяли сканирующий электронный микроскоп TESCAN VEGA 3 XMU (Чехия). Морфологию клеток бактерий изучали на живых препаратах, используя эпифлуоресцентный микроскоп Axio Imager.D1 (“Carl Zeiss”, Germany).

**Выделение ДНК, высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК и подготовка их к анализу** были проведены, как описано ранее (Турова и соавт., 2020). Для амплификации фрагментов V4 региона гена 16S рРНК бактерий была использована пара праймеров 541'F (Hugert et al., 2014) и Pro-mod-805R (Merkel et al., 2019), а для ITS региона – пара праймеров ITS86F и ITS4R (Bokulich, Mills, 2013).



**Анализ библиотек фрагментов гена 16S рРНК.** Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК бактериальных сообществ анализировали и классифицировали с использованием онлайн-ресурса RDP Release 11 (<http://pyro.cme.msu.edu>) и SILVA: r138.1 (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>). Для анализа библиотек последовательности предварительно объединяли в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с уровнем сходства 97%. Индексы разнообразия были рассчитаны с использованием программы EstimateS (<http://purl.oclc.org/estimates>). Онлайн-ресурс ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) был использован для создания графиков методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) и тепловых карт (heatmaps) бактериальных и грибных компонентов сообществ на родовом уровне. Используя данные о представленности таксонов в библиотеках и наиболее значимые различия условий экспозиции исследуемых образцов, были выявлены потенциальные функциональные характеристики бактериальных сообществ с использованием пакета программ iVikodak (Nagpal et al., 2019) на основании ресурсов базы данных KEGG (Kanehisa, Goto, 2000). Созданные по результатам этого анализа тепловые карты были построены с помощью онлайн-ресурса ClustVis. Основные функциональные характеристики грибных компонентов сообществ были получены с использованием программы FunGuild (Nguyen et al., 2016).

**Состав питательных сред.** Для получения накопительных культур, растущих на продуктах деградации ПЭТ, использовали минеральную среду (МС) (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6.78;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3.0;  $\text{NaCl}$  – 2.0;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1.0;  $\text{MgSO}_4$  – 0.2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.01;  $\text{FeSO}_4$  – 0.06; терефталат – 2.5; рН 7.5. Первичные посевы для получения накопительных культур инкубировали в течение 2 месяцев при 17–19°C и затем использовали в качестве посевного материала для выделения чистых культур. Культуры выделяли методом последовательных пересевов колоний на агаризованной среде R2A, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт – 0.5; пептон – 0.5; казеиновые кислоты – 0.5; глюкоза – 0.5; крахмал – 0.5; Na пируват – 0.3;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.05;  $\text{NaCl}$  – 2.0; агар-агар – 15.0. Рост на углеводородах, ксенобиотиках и органических кислотах определяли на минеральной среде МС с оптимальным для каждого штамма содержанием  $\text{NaCl}$ , добавляя по 0.2% об./об. смеси *n*-алканов или фенол или натриевые соли уксусной, бензойной и масляной кислот (по 5 г/л). Посевы инкубировали в течение 14 сут при 23°C.

**Депонирование.** Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК бактерий и ITS фрагментов рибосомных оперонов грибов из микробных обрастаний образцов, полученные в результате секвенирования, депонированы в NCBI SRA, биопроект

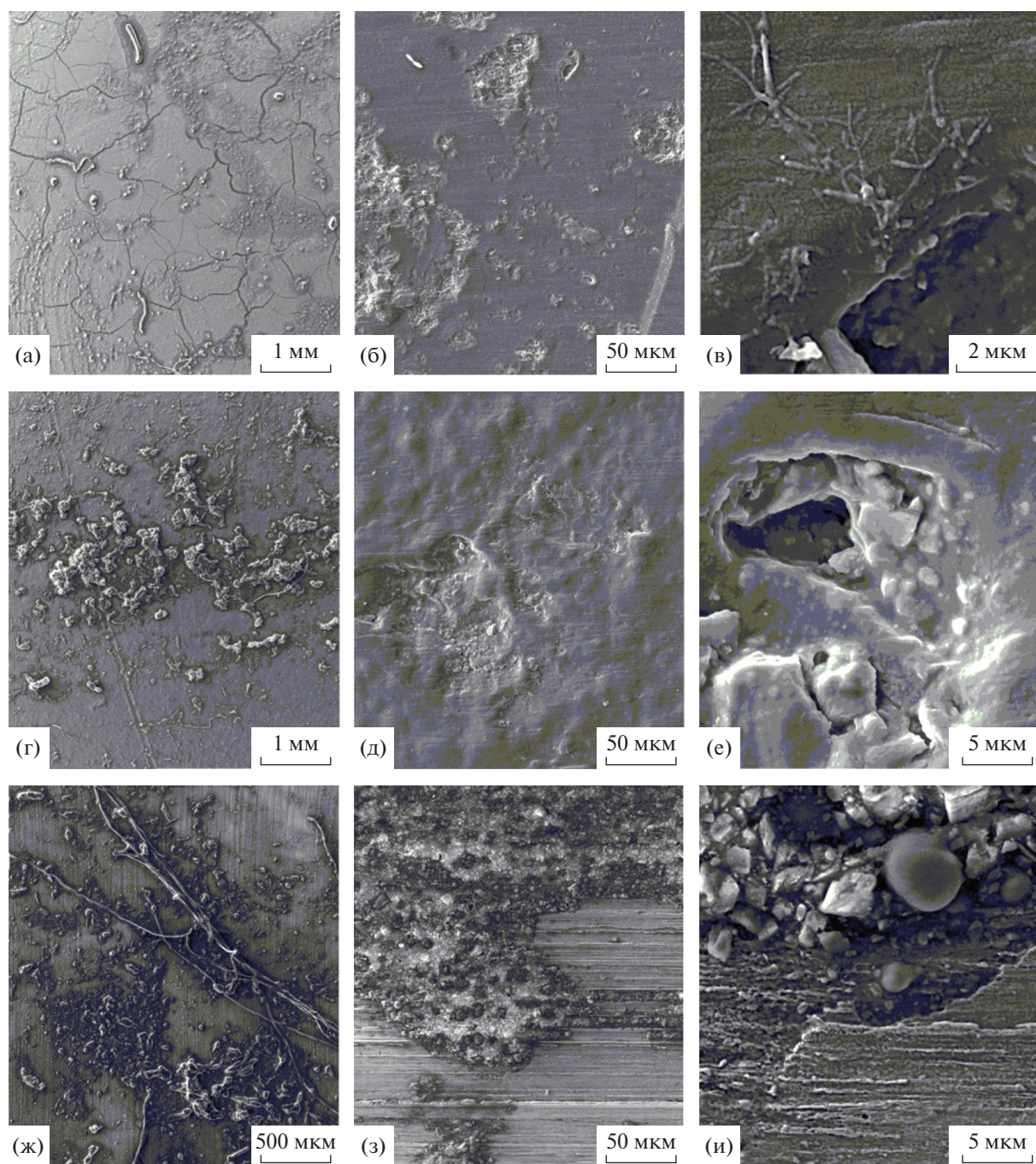
PRJNA845963. Гены 16S рРНК выделенных штаммов бактерий депонированы в Генбанк под номерами ON679634–ON679636.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Физико-химические характеристики водной среды.** Анализ основных показателей воды свидетельствует о наличии загрязнителей в исследуемом водоеме (табл. S1). Органолептические показатели исследуемой воды оказались значительно хуже нормы. Показатель мутности превышал предельные значения в 9 раз, а показатель цветности – в 3 раза. Мутность природных вод вызывается присутствием тонкодисперсных примесей, обусловленных нерастворимыми или коллоидными неорганическими и органическими веществами различного происхождения. Ослабление интенсивности света с глубиной в мутной воде приводит к большему поглощению солнечной энергии вблизи поверхности. Нагревание верхнего слоя воды уменьшает перенос кислорода из воздуха в воду, снижает плотность воды и может приводить к стратификации водоемов на аэробную и анаэробную зону. Цветность природных вод обусловлена главным образом присутствием гумусовых веществ и соединений трехвалентного железа, а также сточных вод различного происхождения. Кроме того, вода имела запах до 4 баллов, что также превышало норму. По-видимому, в воде было велико содержание органических примесей, которые могут обуславливать повышенный уровень органолептических показателей. Подтверждением этому могут служить повышенные показатели перманганатной окисляемости (в 5.4 раза превышающие ПДК). Из неорганических веществ в исследуемой воде отмечено превышение нормы по содержанию аммонийных форм азота (в 2 раза) и марганца (в 21 раз). Похожие данные о загрязненности воды, значительно превышающей ПДК по жесткости, химическому потреблению кислорода (ХПК), содержанию ионов аммония, марганца, а также нефтепродуктов, были получены ранее для ручья, стекающего с территории полигона ТБО г. Перми (Вайсман, 2012).

**Микроскопия микробных обрастаний на исследуемых образцах.** Образцы материалов после экспозиции их в водной среде в течение 10 сут были использованы для визуализации микробных обрастаний на их поверхности с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 1а–1и). Микробные обрастания на образце ПЭТ (рис. 1а) были представлены редкими колониями, не составляющими оформленную биопленку, а на образце ПС (рис. 1г) было значительно больше колоний, которые местами сливались в конгломераты. На образцах пластиков наблюдались также короткие нитевидные структуры, возможно, принадлежащие грибам. На стальном образце (рис. 1ж)





**Рис. 1.** Микрофотографии обрастаний на образцах полиэтилентерефталата (а), полистирола (г) и стали 20 (ж) после 10 сут экспозиции, а также отмытых от обрастаний образцов ПЭТ (б, в), ПС (д, е) и СТ (з, и) при разном масштабе съемки.

кроме конгломератов бактериальных колоний видны хорошо сформированные нити грибного мицелия. Однако при этом и на стальном образце биопленка не покрывала всю поверхность образца, и видны участки свободной поверхности. Для обнаружения возможной деструкции образцов после 10 сут экспозиции они были отмыты от обрастаний. На микрофотографиях образцов пла-

стика видны микроскопические локальные, но глубокие разрушения, что хорошо прослеживается при уменьшении масштаба фотографий (рис. 1б, 1в, 1д, 1е, 1з, 1и). Несмотря на короткий период инкубации, повреждения стального образца занимали значительную площадь поверхности, а при уменьшении масштаба становилась заметной и глубина разрушений.

**Статистический анализ разнообразия прокариот и грибов в обрастаниях на образцах пластика и стали.** В результате высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК прокариот и ITS региона рРНК оперона грибов было получено по шесть библиотек, содержащих 176988 и 435329 ридов соответственно. Из них было сформировано 26194 ОТЕ (филотипов) бактерий и 1477 ОТЕ грибов с уровнем сходства последовательностей  $\geq 97\%$ .

Уровень покрытия для всех библиотек фрагментов гена 16S рРНК был относительно невысоким и составлял от 71 до 90%, что свидетельствовало о том, что максимальная репрезентативность библиотек не была достигнута (табл. S2). Этому заключению соответствовали и высокие значения индексов Чао 1. Индексы разнообразия Шеннона–Уивера и обратного Симпсона для этих библиотек оказались высокими (5.7–6.9 и 54.5–134.7), а индексы доминирования Бергера–Паркера, наоборот, низкими (0.04–0.09), независимо от типа материала и времени экспозиции.

Уровень покрытия ITS региона рРНК оперона грибов для всех библиотек был почти максимальным (от 99.5 до 99.9%), что подтверждалось низкими значениями индекса Чао 1, приближавшимися к количеству выявленных в библиотеках ОТЕ, и свидетельствовало о полной репрезентативности библиотек. Индексы разнообразия Шеннона–Уивера и обратного индекса Симпсона для библиотек грибов оказались значительно ниже (3.6–4.4 и 16.8–23.0), чем для библиотек генов 16S рРНК бактерий, а индексы доминирования Бергера–Паркера, наоборот, выше (0.1–0.4), независимо от типа материала и времени экспозиции.

Группирование библиотек на уровне ОТЕ для бактерий и грибов методом главных компонент свидетельствовало о том, что бактериальные сообщества достоверно различались между собой только согласно времени экспозиции, но не по материалу образцов (рис. 2а, 2б). На начальном уровне экспозиции (10 сут) бактериальные сообщества на разных материалах мало различались между собой, в отличие от сообществ на конечном этапе, формировавшихся в течение 60 сут. Для грибного компонента микробного сообщества обрастаний не обнаружено достоверного группирования образцов ни по времени экспозиции, ни по материалу образца (рис. 2в, 2г).

*Таксономический состав прокариот и грибов в обрастаниях на поверхности образцов пластика и стали*

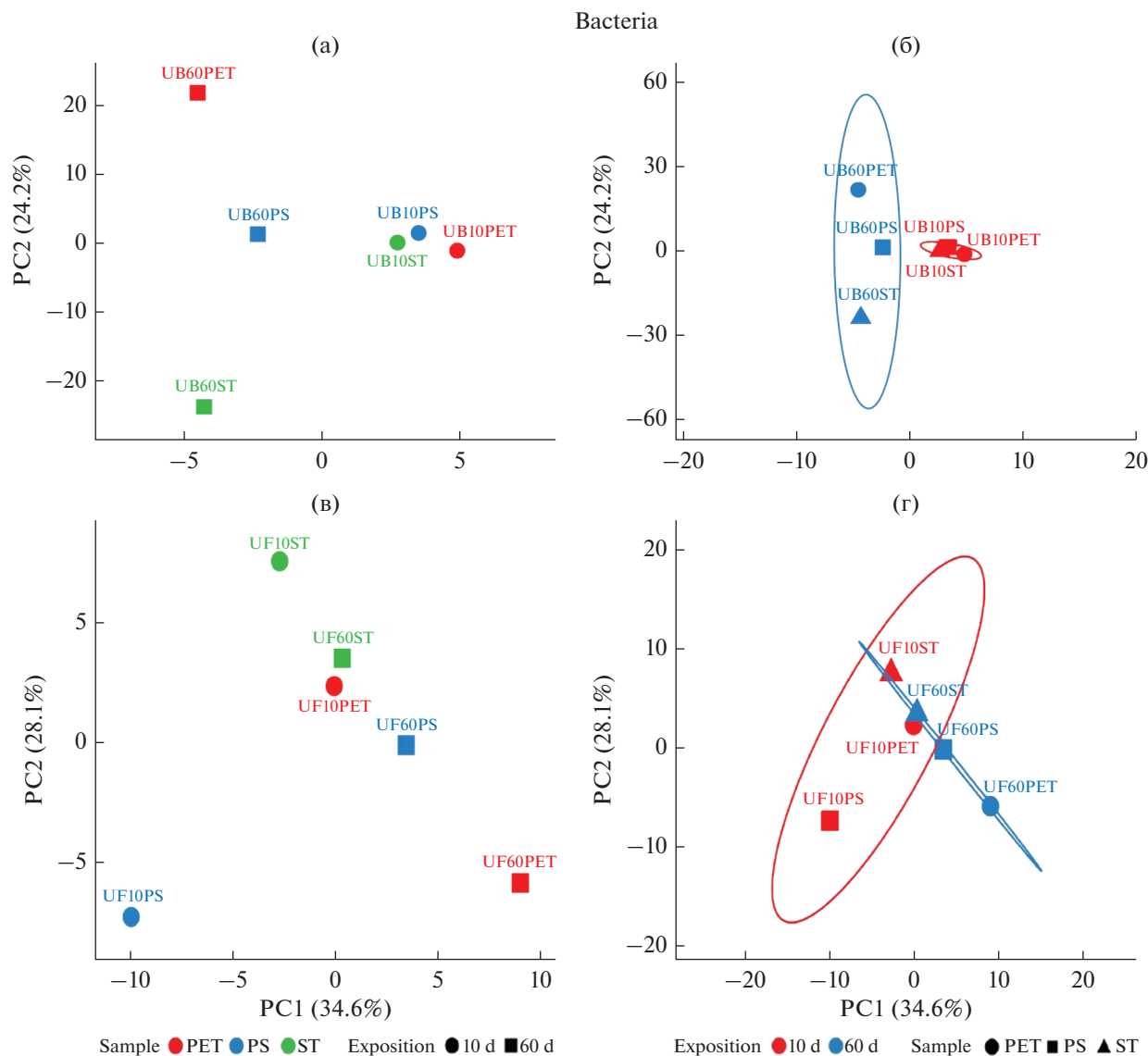
**Прокариоты.** Общее количество последовательностей (ридов) фрагментов гена 16S рРНК прокариот для шести библиотек после исключения неидентифицированных ридов, а также еди-

ничных ридов, представленных только в одной или двух библиотеках, составило 147903. Из них было сформировано 3754 ОТЕ (филотипа) с уровнем сходства последовательностей  $\geq 97\%$ . В библиотеках были выявлены только последовательности бактерий; архейный компонент не был обнаружен. Таксономическое распределение филотипов бактерий на уровне филумов, а для *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) – на уровне классов, показано на рис. S2а.

Состав высших таксонов бактерий был сходным для всех анализируемых библиотек, при этом представленными в библиотеках и доминирующими в большинстве из них были бактерии филумов/классов *Betaproteobacteria* (11.8–38.0%), *Actinomycetota* (5.4–23.9%), *Gammaproteobacteria* (4.7–22.5%), *Alphaproteobacteria* (6.6–13.6%), *Bacteroidota* (6.6–12.3%) и *Bacillota* (5.3–23.3%). Наблюдалось количественные изменения в составе доминирующих таксонов, связанные в основном со временем экспозиции, а не с материалом образцов. По сравнению с библиотеками начального периода (10 сут) при увеличении времени экспозиции до 60 сут возрастала доля *Gammaproteobacteria* (с max 12.2 до 22.5%) и *Bacillota* (с max 14.7 до 29.1%). Наиболее заметные изменения наблюдались для *Deltaproteobacteria*, доля которых на начальном этапе экспозиции была заметной для пластика (7.4–7.8%) и значительной для стали (37.2%) и существенно снижалась к концу экспозиции (0–1.6%). В качестве минорных компонентов (<1%) в анализируемых сообществах встречались представители филумов *Planctomycetota*, *Chloroflexota*, *Spirochaetota* и *Mycoplasmata*.

В результате классификации ОТЕ в общем составе шести библиотек фрагментов гена 16S рРНК были выявлены представители 290 семейств и 855 родов бактерий. Тепловые карты распределения всех семейств и родов бактерий, созданные с использованием программы ClustVis, позволили проследить распределение библиотек по двум параметрам, а именно, типу материала образца и по времени экспозиции. На тепловых картах бактерий, как на уровне семейств (рис. S3а), так и на уровне родов (рис. S4а), видны две четко различающиеся области, коррелирующие со временем экспозиции образцов. Такое распределение библиотек свидетельствует о заметных изменениях в составе бактериальных сообществ при длительном экспонировании образцов в водной среде.

На тепловой карте 25 родов, преобладающих в общем составе библиотек, также можно отметить формирование этих двух областей (рис. 3а), хотя бактерии родов *Aquabacterium*, *Planococcus*, *Polaromonas* и *Acidovorax* были представлены на обоих этапах экспозиции. На начальном этапе преобладали сульфатовосстанавливающие бактерии (СВБ) родов *Desulfobulbus* и *Desulfomicrobium*, которые



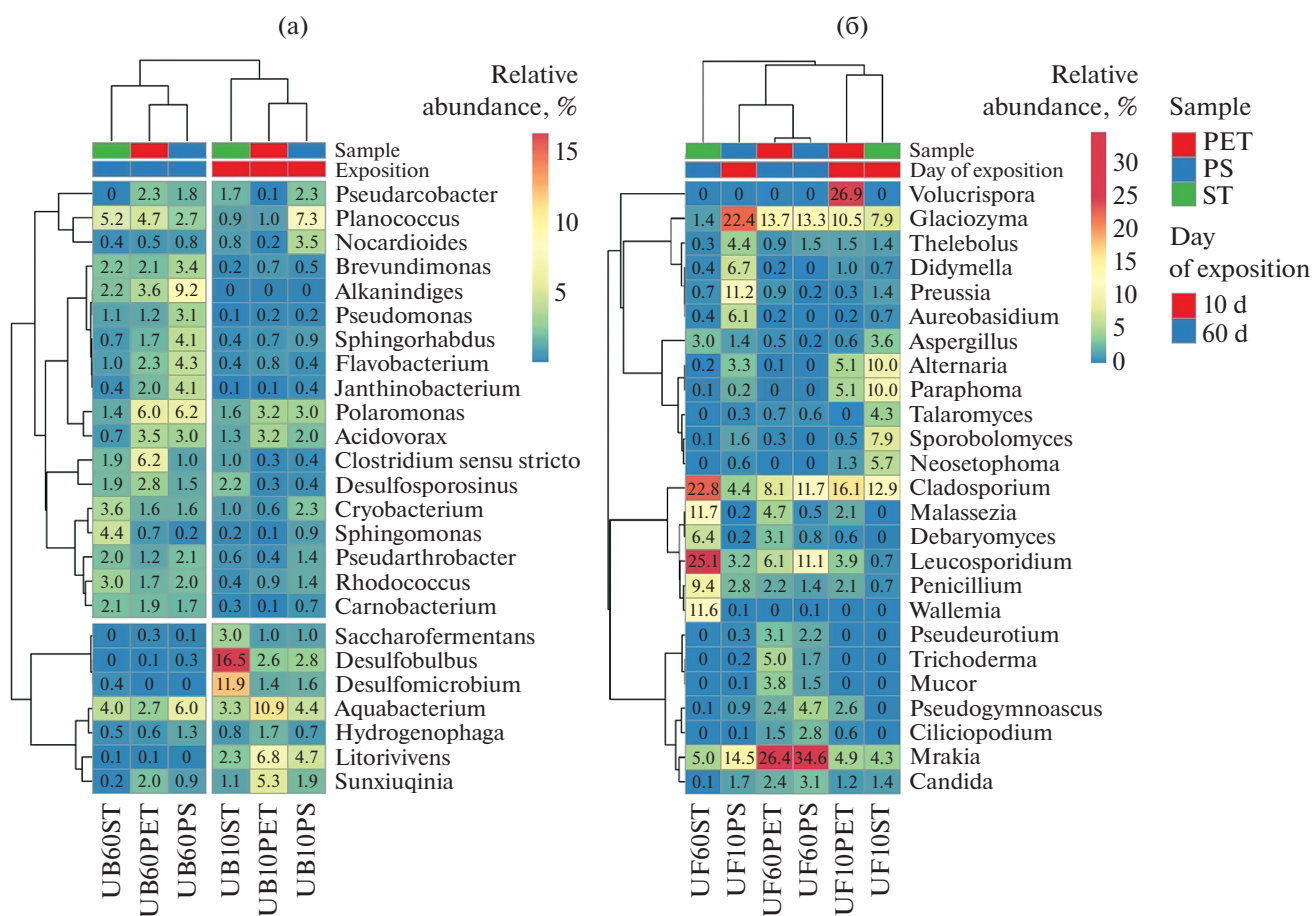
**Рис. 2.** График, показывающий группирование ОТЕ в библиотеках гена 16S рРНК бактерий и ITS рибосомного оперона грибов по материалу образцов – ПЭТ (PET), ПС (PS) и СТ (ST) (а, в) и периоду экспозиции в водной среде 10 и 60 сут (б, г), полученный методом главных компонент (Principal Components Analysis, PCA) с использованием параметра SVD в программе ClustVis. Эллипсы обозначают достоверно различающиеся области группирования с доверительным интервалом 0.95.

были наиболее представлены в сообществе на стальном образце. Известно, что сульфатвосстанавливающие бактерии вызывают биокоррозию металлов в различных природных и промышленных средах (Anandkumar et al., 2016; Loto, 2017). Эти бактерии являются строгими анаэробами и практически полное уменьшение доли этих бактерий в конце экспозиции, по-видимому, было связано с пересыханием водоема в летний период, уменьшением его глубины и соответствующим повышением концентрации кислорода в придонной зоне водоема. На конечном этапе экспозиции, микробные сообщества на образцах материалов стали более разнообразными, чем на на-

чальном этапе, однако не было выявлено значительного преобладания отдельных родов или каких-либо зависимостей их представленности от материала образцов.

**Грибы.** Общее количество последовательностей (ридов) грибов в шести библиотеках после исключения неидентифицированных ридов и единичных и двойных ридов, представленных только в одной библиотеке, составило 200325, из которых было сформировано 482 ОТЕ (филотипа) с уровнем сходства последовательностей  $\geq 97\%$ . В анализируемых сообществах доминировали представители классов *Dothideomycetes* (13.0–45.7%) и



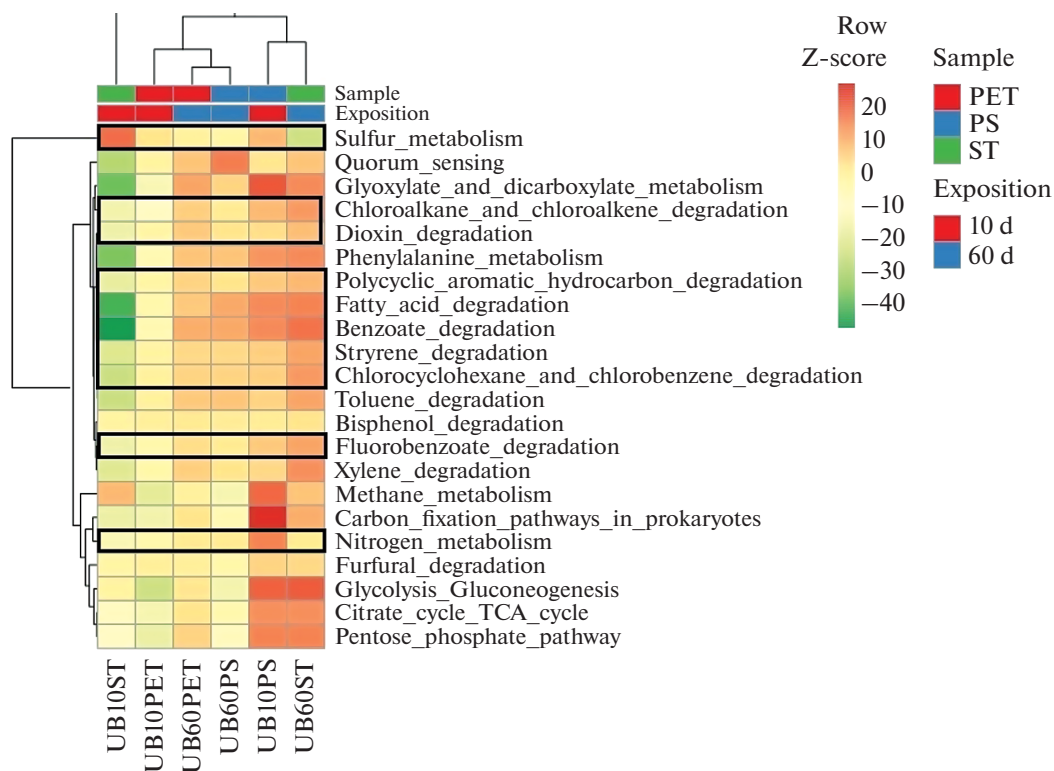


**Рис. 3.** Тепловые карты (heatmap) распределения 25 доминантных родов бактерий (а) и грибов (б) по 6 библиотекам, представляющим микробные сообщества с образцов полиэтилентерефталата (PET), полистирола (PS) и стали 20 (ST). Представленность родов рассчитана как отношение количества родов, принадлежащих представителям данного рода, к общему количеству родов в соответствующей библиотеке. Как строки, так и столбцы были сгруппированы с использованием параметров correlation distance и average linkage программы ClustVis. Сравнительное количество фрагментов последовательностей гена 16S рРНК бактерий и ITS рибосомных оперонов грибов определенных родов в библиотеках показано цветом.

*Leotiomyces* (0–31.0%) филума *Ascomycota*, а также классов *Microbotryomycetes* (14.9–26.7%) и *Tremellomycetes* (5.1–27.7%) филума *Basidiomycota* (рис. S26). Так же, как и для бактерий, наблюдались количественные изменения в составе доминирующих классов грибов, однако при этом диапазон различий был значительно шире, чем для высших таксонов бактерий. Кроме того, были заметны различия, связанные как со временем экспозиции, так и с материалом образцов. Доля наиболее представленных грибов класса *Dothideomycetes* была высокой во всех сообществах на начальном этапе экспозиции (31.3–45.7%), но заметно падала на конечном этапе (13.0–24.9%). Доля представителей *Leotiomyces* была значительно выше в обрастаниях на полиэтилентерефталате на начальном этапе экспозиции (31.3%) по сравнению с остальными сообществами (0–8.7%). Доля *Microbotryomycetes* возрастала к концу экспозиции на образцах ПЭТ (с 14.9 до 20.3%) и СТ (с 16.4 до 26.8%) и оставалась примерно

одинаковой для образцов ПС (27.2–24.7%), а доля представителей *Tremellomycetes*, наоборот, значительно возрастала к концу экспозиции для образцов ПЭТ (с 7.7 до 27.7%) и ПС (15.9–36%), а в обрастаниях на стальном образце оставалась примерно на одном уровне (5.7–5.1%). Таким образом, хотя влияние изменения условий среды в результате пересыхания водоема к концу экспозиции на общий состав сообщества грибов оказалось менее существенным, чем для бактерий, оно прослеживалось для отдельных родов грибов, так же, как и влияние материала образцов.

В результате классификации ОТЕ в общем составе библиотек фрагментов ITS были выявлены последовательности грибов, принадлежащих к 79 семействам и 115 родам. Тепловые карты распределения грибов на уровне семейств (рис. S36) и родов (рис. S46), созданные с использованием программы ClustVis, так же, как и график PCA, не



**Рис. 4.** Тепловая карта, показывающая кластеризацию образцов материалов на основе относительного процента функциональных профилей бактериального сообщества в программе iVikodak. Метаболические пути деградации ксенобиотиков и продуктов деполимеризации полимеров, а также биокоррозии стали, предположительно представленные у бактерий в обрастаниях, отмечены черной рамкой.

выявили четкого группирования образцов ни по типу материала образца, ни по времени экспозиции (рис. S3б), так же, как и тепловая карта 25 преобладающих родов (рис. 3б). Некоторые роды доминирующих грибов были представлены во всех библиотеках, однако их представленность в сообществе изменялась разнонаправленно для сравниваемых библиотек в зависимости от времени экспозиции и материала образцов. Из этих родов на начальном этапе экспозиции доминировали только представители рода *Glaciozyma* на образце ПС (22.4%). На конечном этапе экспозиции доминировали представители рода *Mrakia* на образцах ПЭТ (26.4%) и ПС (34.6%), рода *Cladosporium* – на образцах ПЭТ (16.1%) и СТ (22.8%) и рода *Leucosporidium* – на образце СТ (22.8%). В то же время, представители некоторых родов присутствовали заметных количествах только на одном образце, в частности, представители рода *Volucrispora* обнаруживались только на образце ПЭТ на начальном этапе экспозиции (26.9%), а рода *Wallemia* – только на образце СТ в конце экспозиции (11.6%), но в остальных библиотеках не были выявлены. Тепловая карта 20 преобладающих видов грибов (табл. S3), уточняя выше описанную тепловую карту на родовом уровне (рис. 3б). Во всех сообществах доминировали четыре вида грибов: *Mra-*

*kia frigida*, *Glaciozyma antarctica*, *Cladosporium cladosporioides* и *Leucosporidium fragarium* (уровень идентичности последовательностей ITS 99–100% с типовыми штаммами соответствующих видов), хотя представленность их была различной в зависимости от времени экспозиции и типа материала образцов.

**Потенциальная способность бактерий к осуществлению процессов метаболизма в обрастаниях на пластике и стали.** Программа iVikodak позволяет на основании таксономического состава исследуемых бактериальных сообществ предсказывать их функциональные характеристики, используя геномные базы данных (Nagpal et al., 2019). На рис. 4 с использованием модуля программы “Global Mapper” представлен результат сравнительного анализа вклада исследуемых бактериальных сообществ в осуществление путей метаболизма согласно базе данных KEGG (Kanehisa, Goto, 2000). Были проанализированы основные пути энергетического метаболизма, а также пути деградации ксенобиотиков, представленные в этой базе, и выявленные программой у представителей изучаемых сообществ.

Представленность путей метаболизма у бактерий исследуемых сообществ изменялась в зависимости от времени экспозиции, однако эти измене-

ния были различными для каждого типа материала (рис. 4). Функциональное разнообразие бактерий на образцах ПЭТ и представленность ферментов основных путей углеводного и энергетического метаболизма были заметно выше в конце экспозиции (60 сут) (рис. 4). Для ПС, наоборот, представленность основных путей метаболизма уменьшалась в конце экспозиции (60 сут), а представленность большинства ферментов деградации ксенобиотиков была примерно одинакова в начале и конце экспозиции. Представленность ферментов всех путей метаболизма у бактериального сообщества на образцах стали значительно увеличивалась в конце экспозиции за исключением серного метаболизма, ферменты метаболизма которого были, наоборот, в основном представлены в начале экспозиции (10 сут). Отметим, что представленность ферментов пути “Quorum sensing”, способствующих формированию биопленок, заметно возрастала также к окончанию экспозиции всех исследуемых материалов.

**Потенциальная способность к деградации материалов образцов.** В наших предыдущих работах рассматривалась представленность ферментов путей деградации ПС, ПЭТ и стали (Турова и соавт., 2020; Tourgova et al., 2020). Использование модуля “Local Mapper” программы iVikodak позволяет оценить представленность ферментов, участвующих в путях (картах) метаболизма, связанных с процессами биодеградации (рис. S5–S15).

Показано, что ферменты деградации ПЭТ, включенные в состав пути метаболизма “Деградация полициклических ароматических углеводородов”, у бактерий в обрастаниях на образцах из полиэтилентерефталата не были выявлены (рис. S5). Это согласуется с отсутствием в анализируемых сообществах бактерий рода *Ideonella*, в клетках которых эти ферменты были достоверно обнаружены (Yoshida et al., 2016). Однако в результате анализа было предсказано наличие у бактерий в обрастаниях на поверхности ПЭТ двух ферментов этого пути, терефталат 1,2-диоксигеназы [ЕС:1.14.12.15] и 1,2-дигидрокси-3,5-циклогексадиен-1,4-дикарбоксилат дегидрогеназы [ЕС:1.3.1.53], катализирующих превращение терефталевой кислоты (основного метаболита деградации ПЭТ) в протокатеховую кислоту. Причем эти ферменты были наиболее представлены у бактерий на образцах ПЭТ на конечном этапе экспозиции. Кроме того, в основном в конце экспозиции у бактерий были представлены ключевые ферменты, лактальдегид редуктаза [ЕС:1.1.1.77], метаболизма другого продукта деградации ПЭТ – этиленгликоля в составе пути “Метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата” (рис. S6).

Два ключевых фермента аэробной деградации мономера ПС – стирола, стирол монооксигеназа [ЕС:1.14.14.11] и стирол оксидизомераза [ЕС:5.3.99.7],

катаболизирующие стирол до фенилацетальдегида, были преимущественно представлены в обрастаниях на образце ПС на начальном этапе экспозиции (рис. S7).

Результаты многочисленных исследований процессов микробной коррозии стали свидетельствуют об участии в них сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ) (Gieg et al., 2011; Anandkumar et al., 2016; Loto, 2017). В нашем исследовании для стальных образцов была проанализирована представленность ферментов серного метаболизма (рис. S8). Так, было предсказано наличие сульфат аденилил трансферазы [ЕС:2.7.7.4], катализирующей восстановление сульфата до аденилил сульфата в процессе сульфатредукции, а также ферментов восстановления аденилил сульфата до сульфита в ассимиляционной и диссимиляционной сульфатредукции. Диссимиляционное восстановление сульфат-иона, представленное преимущественно на начальном этапе экспозиции, вероятно, связано с доминированием СВБ, содержащих аденилилсульфат редуктазу [ЕС:1.8.99.2]. Более низкая представленность этого фермента у бактерий в конце экспозиции, по-видимому, была связана со значительным уменьшением доли СВБ в сообществе. Аденилилсульфат киназа [ЕС:2.7.1.25] и фосфоаденозин фосфосульфат редуктаза [ЕС:1.8.4.8], восстанавливающие сульфит до сульфида в ассимиляционном процессе, были представлены примерно одинаково на обоих этапах экспозиции.

**Потенциальная способность к деградации ароматических соединений и ксенобиотиков.** Бензоат является центральным метаболитом деградации ароматических соединений, в том числе, продуктов разрушения пластиков (в частности, терефталата) и многих токсичных ксенобиотиков. Деградация бензоат-иона (далее бензоата) предположительно осуществлялась на обоих этапах экспозиции бактериями, обладающими двумя ключевыми ферментами пути аэробной деградации бензоата (“Benzoate degradation I”), бензоат-1,2-диоксигеназой [ЕС:1.14.12.10] и дигидрооксициклогексадиен карбоксилат дегидрогеназой [ЕС:1.3.1.25], катализирующими образование катехола из бензоата (рис. S9). Предсказано также присутствие во всех сообществах бактерий, имеющих ферменты катаболизма катехола, как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА. Кроме того, был представлен фермент бензоат-КоА-лигаза [ЕС:6.2.1.25], катализирующий превращение бензоата в бензоил-КоА – интермедиат биодеградации многих ароматических соединений, и большинство ферментов второго пути деградации бензоата (“Benzoate degradation II”), преимущественно используемого анаэробными бактериями. Однако все предполагаемые ферменты и соответственно функционирование этого пути выявлены только на начальном этапе экспозиции, что соот-

ветствует предположению об анаэробных условиях среды на этой стадии. Кроме того, на обоих этапах экспозиции предполагается представленность ферментов деградации бензола.

На обоих этапах экспозиции у бактерий были представлены ключевые ферменты пути деградации фторбензоата — бензоат/толуат диоксигеназа [ЕС:1.14.12.10] и дигидроксициклогексадиенкарбоксилат дегидрогеназа [ЕС:1.3.1.25], катализирующие превращение 2-, 3- и 4-фторбензоата до фторкатехола, который впоследствии включается в путь деградации бензоата через промежуточный метаболит малеилацетат (рис. S10). Кроме того, в этом же цикле пестицид бромоксинил катаболизируется до малеилацетата с помощью фермента пентахлорфенол монооксигеназы [ЕС:1.14.13.50].

В составе пути деградации хлорциклогексанов и хлорбензолов предположительно был представлен фермент 2,4-дихлорфенол 6-монооксигеназа [ЕС:1.14.13.20], катализирующий превращение 4-хлорфенола до 4-хлоркатехола, который в дальнейшем включается в путь деградации бензоата через малеилацетат (рис. S11).

В составе пути деградации хлоралканов и хлоралкенов были предсказаны ферменты, катаболизирующие несколько хлорсодержащих ксенобиотиков. У бактерий на всех этапах экспозиции всех исследованных типов материалов были представлены ферменты путей метаболизма 1,2-дихлорэтана до гликолата, а также формальдегида до формиата (рис. S12). Менее представлены были ферменты катализирующие превращение трихлорэтана до формиата или глиоксилата, а также дихлорметана до формальдегида. Все эти промежуточные метаболиты в дальнейшем включаются в различные процессы катаболизма.

В составе пути деградации диоксинов на всех образцах и на обоих этапах экспозиции был представлен набор ферментов катаболизма бифенила и 4-хлорбифенила, ключевым ферментом которого является бифенил-2,3-диоксигеназа [ЕС:1.14.12.18] (рис. S13). Продукты деградации этих соединений, бензоат и 4-хлорбензоат, впоследствии через промежуточный метаболит 2-оксопент-4-еноат включаются в дальнейшие реакции до ацетил-КоА, с помощью набора ферментов, который предположительно представлен у бактерий во всех изучаемых сообществах.

Согласно полученным результатам, ферменты путей деградации ксилола, толуола, бисфенола и фурфурола не составляли полных путей деградации этих ароматических соединений, что свидетельствует об отсутствии бактерий-деструкторов этих ксенобиотиков в изучаемых сообществах.

Деградация токсичных нитросоединений происходит в составе пути метаболизма азота (рис. S14). В воде исследуемого водоема не обнаружено превышение нормы для нитрат- и нит-

рит-ионов. Однако у бактерий анализируемых сообществ предсказано наличие ферментов катаболизма нитрата и нитрита в процессах ассимиляционной и диссимиляционной нитратредукции с участием нитратредуктаз [ЕС:1.7.5.1; ЕС:1.7.99.4; ЕС:1.7.7.2], которые катализируют восстановление нитрата до нитрита, и нитритредуктаз [ЕС:1.7.7.1; ЕС:1.7.1.15; ЕС:1.7.2.2], завершающих этот процесс восстановлением нитрита до аммония. Кроме того, было предсказано функционирование ферментов полного пути денитрификации до молекулярного азота, включая ключевой фермент нитритредуктазу [ЕС:1.7.2.1], кодирующий восстановление нитрита до оксида азота. Катаболизм аммония, количество которого в воде было значительно выше нормы, потенциально активно осуществляется с помощью ферментов окислительных реакций с образованием глутамата. Представленность ферментов всех этих процессов на разных стадиях экспозиции и на разных материалах отличалась незначительно. Кроме того, в этом же пути метаболизма осуществляется катаболизм токсичных аминсоединений, таких как формамид; гидроксилламин и нитрил — до аммония, а нитроалкана — до нитрита. Промежуточные метаболиты впоследствии катаболизируются через другие пути метаболизма.

Кроме того, с помощью модуля “Local Mapper” была рассмотрена представленность ферментов деградации *n*-алканов. Углеводороды, вероятно, присутствовали в составе маслянистой пленки нефтепродуктов на поверхности изучаемого водоема. В KEGG ферменты деградации *n*-алканов включены в состав пути деградации жирных кислот. Основной фермент деградации *n*-алканов, алкан-1-монооксигеназа был представлен у бактерий в обрастаниях на всех образцах на обоих этапах экспозиции (рис. S15).

В целом можно заключить, что в составе сообществ, сформировавшихся на поверхности пластиков и стали в водоеме на полигоне ТБО, обитали бактерии, потенциально способные к деградации широкого круга ароматических соединений и ксенобиотиков.

**Потенциальный вклад бактерий в процессы деградации материалов образцов, ксенобиотиков и других субстратов.** Модуль “Local Mapper” программы iVikodac позволяет также оценить потенциальный вклад бактерий различных родов в осуществление анализируемых путей метаболизма. Состав основных родов бактерий потенциальных деструкторов материалов образцов, ксенобиотиков и других субстратов в обрастаниях на разных этапах экспозиции приведен в табл. S4.

Согласно полученным результатам на начальном этапе экспозиции на образцах полимеров, ПЭТ и ПС, наиболее представленными в процессах биodeградации как продуктов деполимеризации са-

мих полимеров, так и различных ксенобиотиков, предположительно являлись бактерии родов *Aquabacterium* и *Planomicrobium*, а для стального образца – родов *Desulfobulbus* и *Paracoccus*. Несмотря на сходство в составе предположительно активной микрофлоры между образцами полимеров, только для образцов на образце ПС и, в основном, в конце экспозиции были характерны бактерии рода *Alkanindiges*. На конечном этапе аналогичную роль для пластика играли бактерии родов *Polaromonas* и *Rhodococcus*, а для стали – родов *Sphingobium* и *Pseudomonas* (табл. S4).

Многие представители этих родов способны разлагать ряд ароматических и полициклических соединений, в том числе, бензол, катехол и различные ароматические соединения, а также *n*-алканы нефти (Labuzek et al., 2003; Aburto, Peimbert, 2010; Verma et al., 2014; Nogales et al., 2017; Kim, 2018). Бактерии родов *Aquabacterium* и *Polaromonas* были выявлены как потенциальные деструкторы углеводов в пресноводных водоемах (Reyes-Sosa et al., 2018). Известно, что некоторые штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, обладающие генами *alkB*, способны к деградации низкомолекулярного полиэтилена (Jeon, Kim, 2016). Штаммы родов *Sphingobium*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus* способны к деградации стирола (Thischler, 2015). Штаммы, способные к деградации бифенилов, встречаются среди бактерий родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и *Sphingobium* (Furukawa, 2000; Hu et al., 2015). Ранее было показано участие СВБ класса *Deltaproteobacteria* в интегрированных процессах восстановления сульфатов, автотрофной денитрификации и нитрификации, используемых для биологической очистки сточных вод от азотистых соединений (Hao et al., 2013).

Диссимиляционное восстановление сульфата, представленное преимущественно на начальном этапе экспозиции, вероятно, осуществляла доминирующая популяция СВБ родов *Desulfomicrobium* и *Desulfobulbus* (табл. S4). На начальном этапе в процессе деградации *n*-алканов на образцах ПЭТ предположительно участвовали бактерии рода *Aquabacterium*, на образцах ПС к ним добавились бактерии родов *Planomicrobium* и *Rhodococcus*, а на образцах стали – бактерии рода *Desulfobulbus*. Отметим, что у бактерий рода *Desulfobulbus* за окисление *n*-алканов отвечают ферменты, отличные от ферментов аэробных бактерий. В конце экспозиции потенциальными деструкторами *n*-алканов на образцах ПЭТ были бактерии родов *Polaromonas*, *Rhodococcus* и *Acidovorax*, на образцах ПС – бактерии родов *Aquabacterium*, *Rhodococcus* и *Alkanindiges*, а на образцах стали – бактерии родов *Sphingobium*, *Pseudomonas* и *Aquabacterium*. Таким образом, несмотря на смену анаэробных условий на аэробные в водоеме в процессе экспозиции образцов, в бактериальных сообществах на поверхности полимеров и стали поддерживались популяции бак-

терий, обладающих генами, детерминирующими алкан-1-монооксигеназу, и способных к деградации *n*-алканов нефти.

Можно отметить, что, несмотря на изменение таксономического состава микрофлоры в течение экспозиции, представленность наборов ферментов осуществляемых процессов катаболизма ксенобиотиков оставалась высокой.

**Предсказанные экологические характеристики грибов в исследуемых сообществах.** Результаты определения таксономической структуры сообщества грибов, полученные методом высокопроизводительного секвенирования ITS регионов рибосомных оперонов, были проанализированы с помощью программы FunGuild, что позволило оценить первичные экологические характеристики членов сообщества (рис. 5).

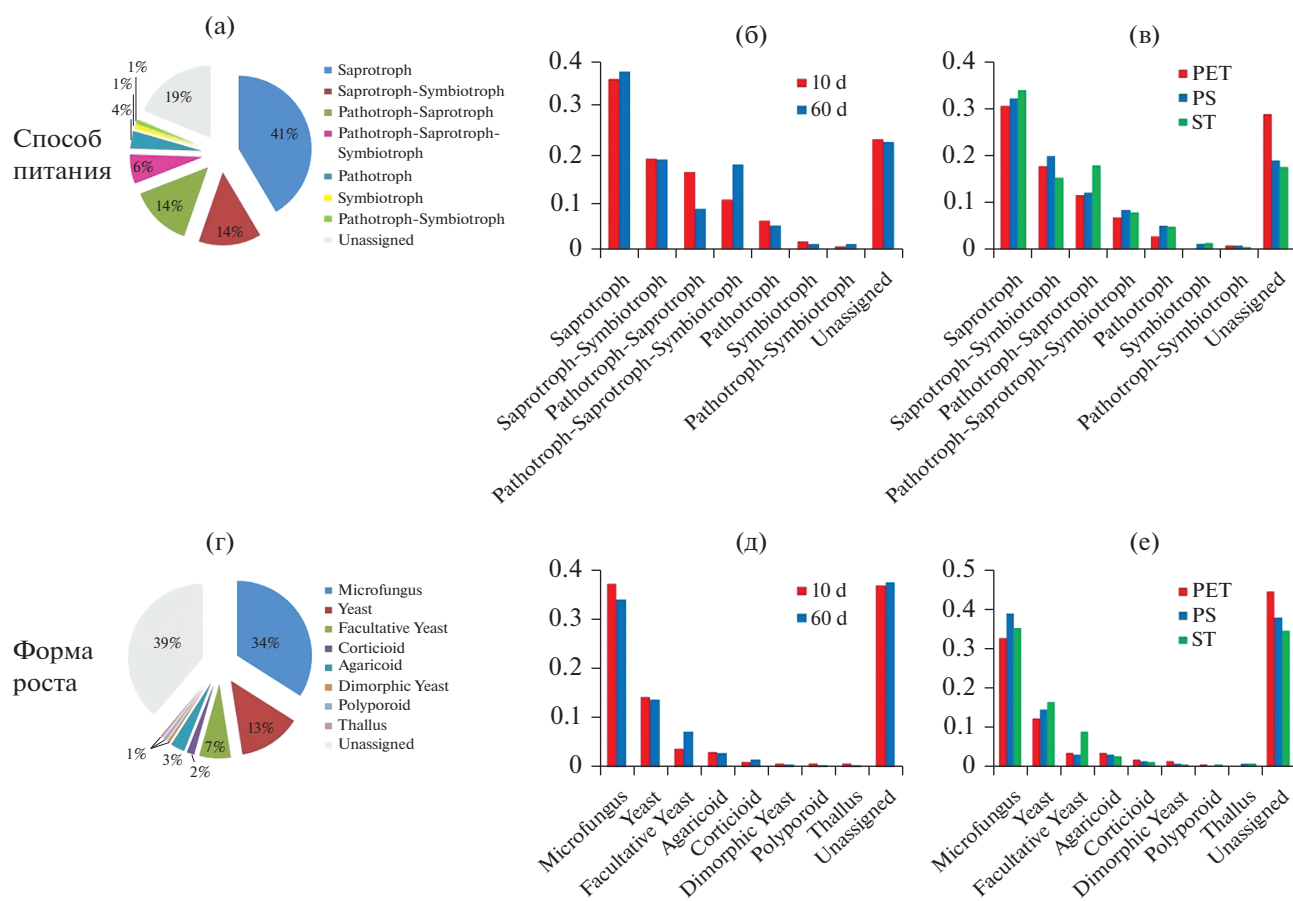
По способу питания основная часть грибов в обрастаниях относилась к сапротрофному типу (41%) и к смешанным типам (сапротрофному, паразитическому и симбиотическому в различных сочетаниях) (35%). Грибы с паразитическим и симбиотическим типами питания были минорными членами сообществ (1–4%). При сравнении способов питания представителей грибных сообществ как в зависимости от времени экспозиции, так и материала образцов, различия были минимальными. В конце экспозиции снизилась доля грибов с патотрофным-сапротрофным типом питания (с 15 до 8%) и выросла доля патотрофов-сапротрофов-симбиотрофов (с 9 до 16%). При этом большая доля патотрофов-сапротрофов была выявлена в сообществах на стальных образцах (18% против 12% на образцах пластика).

По форме роста в анализируемых сообществах доминировали микроскопические грибы (34%), дрожжи (14%) и факультативные дрожжи (7%) (рис. 5). Грибы с другими формами роста были минорными членами сообществ (1–3%). Увеличение их доли в конце экспозиции было выявлено только для факультативных дрожжей (3.9–7.4%), и при этом в основном для сообществ на стальных образцах (9% против 3–4% для пластика).

Экологические и ростовые характеристики коррелировали с составом доминирующих в сообществах видов грибов. Из 20 доминирующих видов, 10 видов относились к сапротрофам, и по 4 вида к патотрофам-сапротрофам и патотрофам-сапротрофам-симбиотрофам. По форме роста 10 видов относились к микроскопическим грибам, 6 видов – к дрожжам, 2 вида – к факультативным дрожжам и 1 вид – к диморфным дрожжам (табл. S3).

Обращает на себя внимание наличие в составе обрастаний грибов, способных к патотрофному типу питания. Недавно было показано, что грибы-патогены животных и растений концентрируются на микропластике в наземных бытовых отходах (Gkoutselis et al., 2021). Среди них обнаружены виды





**Рис. 5.** Распределение родов грибов по способу питания (а–в) и форме роста (г–е) согласно результатам программы FunGuild для общей суммы состава всех библиотек (а, г); при сравнении библиотек по времени экспозиции (б, д); при сравнении библиотек по материалу образцов (в, е).

*Cladosporium cladosporioides* и *Didymella glomerata*, которые относятся к доминирующим видам так же и в исследуемых нами сообществах. Авторы полагают, что микропластик в наземных бытовых отходах может служить селективной средой для накопления грибных патогенов и заражения ими почвы и водных сред.

В то же время, среди сапротрофных грибов были представлены потенциальные биодеструкторы полимеров, ксенобиотиков и металлов. К числу самых распространенных групп грибов-биодеструкторов пластических материалов относятся представители родов *Cladosporium*, *Penicillium* и *Alternaria* (Zeghal et al., 2021; Srikanth et al., 2022). *C. cladosporioides* способен к деградации детергентов и пестицидов (Chen et al., 2012; Jakovljević, Vrgić, 2018). *Cladosporium* sp. и *Penicillium chrysogenum* способны к деградации 2,4-дихлорфенола (Nikolaivits et al., 2020), а также к биокоррозии металлов (Okorie, Chukwudi, 2021). *Aureobasidium pullulans* способны разрушать ПС и участвовать в коррозии металлов (Okorie, Chukwudi, 2021; Castiglia, Kuhar, 2015). Отметим, что в нашем исследовании

последовательности грибов этого рода были детектированы в заметных количествах в библиотеке из образцов только на поверхности образца ПС (табл. S3). Доминирующие в сообществах виды дрожжей относятся к родам *Mrakia*, *Glaciozyma* и *Leucosporidium*, включающим психрофилов, обладающих широким набором ферментов, таких как липазы, гликозидазы, протеазы, хитиназы и эстеразы. Известно, что эстеразы играют важную роль в деградации промышленных загрязнителей, пластмасс и ряда токсичных химических веществ (Martorell et al., 2019). Таким образом, можно предположить, что многие виды грибов, доминирующих в исследуемых сообществах, могут участвовать в процессах деградации органических, химических и пластмассовых загрязнителей в водоеме.

**Выделение чистых культур бактерий из образцов на исследуемых образцах.** Образования с поверхности образцов каждого материала, экспонированных в водоеме 10 сут, были использованы для получения накопительных культур аэробных бактерий, разлагающих терефталат натрия, про-

межуточный метаболит одного из приоритетных загрязнителей – полиэтилентерефталата. Методом последовательных пересевов с жидкой на агаризованную среду из накопительных культур было выделено три штамма бактерий (табл. S5, рис. S15). Сходство последовательностей гена 16S рРНК изолятов составляло 100% с аналогичными генами типовых штаммов известных видов бактерий, представленных в GenBank. Это позволило отнести штаммы L4-1 и L12-1, выделенные с поверхности образцов пластика, к виду *Bacillus thuringiensis*, а штамм L13-2, выделенный с поверхности стального образца, к виду *Brevundimonas bullata*. Исследована способность выделенных штаммов к росту на различных субстратах, включая продукты деградации ПЭТ: терефталат и этиленгликоль. Несмотря на то, что накопительные культуры были получены на терефталате, выделенные чистые культуры не росли на этом субстрате. В то же время, все штаммы росли на *n*-алканах нефти, летучих жирных кислотах (ацетате и бутирате), *B. bullata* L13-2 рос еще на бензоате, а штаммы *B. thuringiensis* – на феноле.

Сравнение генов 16S рРНК выделенных чистых культур с последовательностями в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК образаний на полимерах и стали подтвердило присутствие флотипов, близких *Bacillus thuringiensis* и *Brevundimonas bullata*, во всех исследованных библиотеках (99–100% сходства последовательностей). Бактерии рода *Bacillus* присутствовали в исследуемых сообществах, хотя и составляли небольшую часть популяции (0.1–3.6%).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Небольшой водоем, расположенный непосредственно в зоне полигона ТБО, можно рассматривать как модельный объект по изучению таксономического состава микробных сообществ и их функционирования в природных поверхностных водных объектах, подверженных сильной антропогенной нагрузке. В связи с расширением площадей как официальных полигонов ТБО, так и нелегальных свалок, такие исследования могут стать весьма актуальными для оценки потенциальной возможности естественной биоремедиации таких водоемов.

В настоящей работе исследован состав прокариот и микроскопических грибов в обрастаниях на образцах пластиков (ПС и ПЭТ) и стали, экспонированных в водоеме на полигоне ТБО в течение 10 и 60 сут. В водоем поступают фильтраты деградации твердых бытовых отходов. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в водоеме обитает богатое и разнообразное сообщество бактерий и грибов. В наших предыдущих исследованиях микробных обрастаний на поверхности полимеров и стали в различных водных средах

(Турова и соавт., 2021) было показано, что состав микробных сообществ в обрастаниях в большей степени зависит от типа водной среды, чем от природы материала. Особенно значительными были различия в составе сообществ в морских и пресноводных местообитаниях. Но при этом состав сообществ различался и в пресных водах различного происхождения. В частности, в промышленной (оборотной) воде на образцах полимеров и стали прослеживалось накопление в сообществах бактерий рода *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*), которые признаются модельным объектом для изучения биодеградации ряда ароматических и полициклических соединений, в том числе, бензола, катехола и других. В природной воде Можайского водохранилища эта тенденция не прослеживалась, так же, как и в исследуемом в настоящей работе водоеме. При этом основным различием между ними было полное отсутствие среди таксонов, доминирующих в водоеме на ТБО, представителей цианобактерий, хотя при экспонировании аналогичных образцов в воде Можайского водохранилища они составляли значительную часть бактериального сообщества. В то же время, во всех пресноводных местообитаниях среди доминирующих родов присутствовали бактерии рода *Aquabacterium*, типичные обитатели пресных вод.

Основные изменения в составе исследуемых в настоящей работе микробных сообществ были связаны с длительностью экспозиции в водной среде, а не с природой материалов исследуемых образцов. При этом для бактерий зависимость состава сообществ от времени экспозиции была выражена более четко, чем для грибов. Вероятно, различия в таксономическом составе бактерий на разных этапах экспозиции были обусловлены изменением условий среды с анаэробными на аэробные из-за пересыхания водоема. Результатом этих изменений явилось уменьшение сульфатредуцирующих дельтапротеобактерий, доминирующих в составе сообщества на начальном этапе экспозиции. Такая динамика особенно заметна для обрастаний на стальных образцах.

Микробные сообщества, сформировавшиеся на образцах полимеров и стали, экспонированных в водоеме, потенциально способны осуществлять биодеградацию как продуктов деполимеризации самих полимеров (ПС и ПЭТ), так и различных ксенобиотиков. Потенциальная активность ферментов, которыми обладают бактериальные и грибные компоненты сообщества, предсказанная с помощью биоинформатических методов, свидетельствует о способности микроорганизмов деградировать ксенобиотики, углеводороды и другие органические поллютанты, в также осуществлять коррозию металлов. Деструкция полимеров с образованием локальных, но глубоких повреждений, а также довольно значительная

коррозия стали отмечены на микрофотографиях, что подтверждало биоинформатические данные. Кроме нитчатых грибов родов *Cladosporium* и *Penicillium*, для которых показано участие в биокоррозии стали (Okogie, Chukwudi, 2021), именно на начальном этапе экспозиции в бактериальном сообществе на стальном образце доминировали СВБ, которые считаются основными агентами биокоррозии стали (Anandkumar et al., 2016; Loto, 2017).

Таким образом, в водоемах, подвергающихся значительным загрязнениям бытовыми отходами, формируются микробные сообщества сложного состава, в которых возможен отбор микроорганизмов-деструкторов полимерных и металлических отходов, а также токсичных ксенобиотиков. Микробные сообщества, сформировавшиеся в водоемах на полигонах ТБО и в прилегающих водных объектах, могут осуществлять процессы их биоремедиации после рекультивации территорий полигонов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 18-29-05033).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вайсман Я.И. Управление отходами. Сточные воды и биогаз полигонов захоронения твердых бытовых отходов. Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2012. 259 с.
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Груздев Д.С., Лантев А.Б. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ с поверхности полиэтилентерефталатных материалов при экспозиции в водных средах // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 99–110. <https://doi.org/10.31857/S0026365620010152>
- Tourova T.P., Sokolova D.S., Nazina T.N., Grouzdev D.S., Laptev A.B. Phylogenetic diversity of microbial communities from the surface of polyethylene terephthalate materials exposed to different water environments // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 96–106. <https://doi.org/10.1134/S0026261720010154>
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Лантев А.Б. Сравнение таксономического состава бактериальных обрастаний, развивающихся на поверхности различных материалов, экспонированных в водных средах // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 400–412. <https://doi.org/10.31857/S0026365621040182>
- Tourova T.P., Sokolova D.Sh., Nazina T.N., Laptev A.B. Comparative analysis of the taxonomic composition of bacterial fouling developing on various materials exposed to aqueous environments // Microbiology. 2021. V. 90. P. 416–427. <https://doi.org/10.1134/S0026261721040159>
- Aburto A., Peimbert M. Degradation of a benzene–toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities // Ann. Microbiol. 2010. V. 61. P. 553–562. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0173-6>
- Anandkumar B., George R.P., Maruthamuthu S., Parvathavarthini N., Mudali U.K. Corrosion characteristics of sulfate-reducing bacteria (SRB) and the role of molecular biology in SRB studies: an overview // Corros. Rev. 2016. V. 34. P. 41–63. <https://doi.org/10.1515/corrrev-2015-0055>
- Bokulich N.A., David A. Mills D.A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 2519–2526. <https://doi.org/10.1128/AEM.03870-12>
- Castiglia V.C., Kuhar F. Deterioration of expanded polystyrene caused by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* // Rev. Argent. Microbiol. 2015. V. 47. P. 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.05.001>
- Chen S., Liu C., Peng C., Liu H., Hu M., Zhong G. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a new fungal strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01 // PLoS One. 2012. V. 7. e47205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.004720>
- Christensen T., Cossu R., Stiegmanner R. Landfilling of Waste: Leachate. Boca Raton: CRC Press, 2019. 540 p. <https://doi.org/10.1201/9781482288933>
- Furukawa K. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) // J. Gen. Appl. Microbiol. 2000. V. 46. P. 283–296. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.283>
- Gieg L.M., Jack T.R., Foght J.M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 92. P. 263–282. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3542-6>
- Gkoutselis G., Rohrbach S., Harjes J., Obst M., Brachmann A., Horn M.A., Rambold G. Microplastics accumulate fungal pathogens in terrestrial ecosystems // Sci. Rep. 2021. V. 11. 13214. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92405-7>
- Hu J., Qian M., Zhang Q., Cui J., Yu C., Su X., Shen C., Hashmi M.Z., Shi J. *Sphingobium fuliginis* HC3: a novel and robust isolated biphenyl- and polychlorinated biphenyls-degrading bacterium without dead-end intermediates accumulation // PLoS One. 2015. V. 10. e0122740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122740>
- Huang L.-N., Zhu S., Zhou H., Qu L.-H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 242. P. 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.021>
- Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxo-

- onomic-range PCR in microbial ecology studies // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 5116–5123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>
- Hugo V., Mendes dos Santos J., de Medeiros Engelmann P., Marconatto L., Luiz dos Anjos Borge L.G., de Lara Palhano P., Augustin A.H., Rodrigues L.F., Ketzer J.M.M., Giongo A. Exploratory analysis of the microbial community profile of the municipal solid waste leachate treatment system: A case study // *Waste Manage.* 2022. V. 141. P. 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.01.014>
- Jakovljević V.D., Vrvic M.M. Potential of pure and mixed cultures of *Cladosporium cladosporioides* and *Geotrichum candidum* for application in bioremediation and detergent industry // *Saudi J. Biol. Sci.* 2018. V. 25. P. 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.020>
- Jeon H.J., Kim M.N. Comparison of the functional characterization between alkane monooxygenases for low-molecular-weight polyethylene biodegradation // *Int. Biodeter. Biodegr.* 2016. V. 114. P. 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.012>
- Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Ke H., Li J., Zhang X., Hu J. Bacterial community structure and predicted metabolic function of landfilled municipal solid waste in China // *Sustainability.* 2022. V. 14. 3144. <https://doi.org/10.3390/su14063144>
- Kim D., Choi K.Y., Yoo M., Zylstra G.J., Kim E. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 28. P. 1037–1051. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017>
- Labuzek S., Hupert-Kocurek K.T., Skurnik M. Isolation and characterisation of new *Planococcus* sp. strain able for aromatic hydrocarbons degradation // *Acta Microbiol. Pol.* 2003. V. 52. P. 395–404. PMID: 15095927
- Lapteva A., Poltarukha O., Tourova T., Sokolova D., Golubev A., Golubev I. Specific features of biocorrosion of the circulation cooling system in the petrochemical industry // *E3S Web of Conferences.* 2021. V. 225. 01006. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202122501006>
- Loto C.A. Microbiological corrosion: mechanism, control and impact – a review // *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 2017. V. 92. P. 4241–4252. <https://doi.org/10.1007/s00170-017-0494-8>
- Martorell M.M., Ruberto L.A.M., de Figueroa L.I.C., Mac Cormack W.P. Antarctic yeasts as a source of enzymes for biotechnological applications // *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications* / Ed. Rosa L.H., Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019. P. 285–304. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_13)
- Merkel A.Yu., Tarnovetskii I.Yu., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // *Microbiology (Russian).* 2019. V. 88. P. 671–680. <https://doi.org/10.1134/S0026261719060110>
- Milyutina N.O., Smyatskaya Y.A., Politaeva N.A., Zelenkovsky P.S. MSW landfill leachate: formation, characterization and treatment // *Butlerov Communications.* 2020. V. 61. P. 79–85. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/20-61-3-79>
- 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. 3336. eCollection 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03336>
- Nikolaivits E., Agrafiotis A., Baira E., Le Goff G., Tsafantakis N., Chavanich S.A., Benayahu Y., Ouazzani J., Fokialakis N., Topakas E. Degradation mechanism of 2,4-dichlorophenol by fungi isolated from marine invertebrates // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. 3317. <https://doi.org/10.3390/ijms21093317>
- Nguyen N.H., Song Z., Bates S.T., Branco S., Tedersoo L., Menke J., Schilling J.S., Kennedy P.G. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild // *Fungal Ecol.* 2016. V. 20. P. 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- Nogales J., García J.L., Díaz E. Degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas*: A systems biology view // *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* / Ed. Rojo F. Springer, Cham., 2017. P. 1–49. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5\\_32-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_32-1)
- Okorie I.E., Chukwudi N.R. A review of fungal influenced corrosion of metals // *Zastita Materijala.* 2021. V. 62. P. 333–339. <https://doi.org/10.5937/zasmat21043330>
- Reyes-Sosa M.B., Apodaca-Hernández J.E., Arena-Ortiz M.L. Bioprospecting for microbes with potential hydrocarbon remediation activity on the northwest coast of the Yucatan Peninsula, Mexico, using DNA sequencing // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 642. P. 1060–1074. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.097>
- Srikanth M., Sandeep T.S.R.S., Sucharitha K., Godi S. Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review // *Bioresour. Bioprocess.* 2022. V. 9. 42. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4>
- Stamps B.W., Lyles C.N., Suflita J.M., Masoner J.R., Cozzarelli I.M., Kolpin D.W., Stevenson B.S. Municipal solid waste landfills harbor distinct microbiomes // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. 00534. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00534>
- Tischler D., Kermer R., Gröning J.A.D., Kaschabek S.R., van Berkel W.J.H., Schlömann M. StyA1 and StyA2B from *Rhodococcus opacus* 1CP: a multifunctional styrene monooxygenase system // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. P. 5220–5227. <https://doi.org/10.1128/JB.00723-10>
- Tourova T., Sokolova D., Nazina T., Grouzdev D., Kurshev E., Laptev A. Biodiversity of microorganisms colonizing the surface of polystyrene samples exposed to different aqueous environments // *Sustainability.* 2020. V. 12. 3624. <https://doi.org/10.3390/su12093624>
- Verma H., Kumar R., Oldach P., Sangwan N., Khurana J.P., Jack A Gilbert J.A., Lal R. Comparative genomic analysis of nine *Shingobium* strains: insights into their evolution and hexachlorocyclohexane (HCH) degradation pathways // *BMC Genomics.* 2014. V. 15. 1014. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1014>

Yoshida S., Hiraga K., Takehana T. Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y., Toyohara K., Miyamoto K., Kimura Y., Oda K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) // *Science*. 2016. V. 353. P. 759–759. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>

Zeghal E., Vaksmaa A., Vielfaure H., Boekhout T., Niemann H. The potential role of marine fungi in plastic degradation –

A review // *Front. Mar. Sci.* 2021. V. 8. 738877. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.738877>

Zhuang L., Tang Z., Ma J., Yu Z., Wang Y., Tang J. Enhanced anaerobic biodegradation of benzoate under sulfate-reducing conditions with conductive iron-oxides in sediment of Pearl River estuary // *Front Microbiol.* 2019. V. 10. 374.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00374>

## Composition of Microbial Fouling on the Surface of Plastics and Steel Exposed in a Pond at a Solid Waste Landfill

T. P. Tourova<sup>1</sup>, D. S. Sokolova<sup>1</sup>, E. M. Semenova<sup>1</sup>, D. M. Kireev<sup>2</sup>, A. B. Laptev<sup>3</sup>, and T. N. Nazina<sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Ufa State Petroleum Technological University”, Ufa, 450064 Russia

<sup>3</sup>All-Russian Scientific Research Institute of Aviation Materials, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 105005 Russia

\*e-mail: nazina@inmi.ru

Received June 9, 2022; revised July 5, 2022; accepted July 7, 2022

**Abstract**—The work was aimed at investigation of the composition of microbial communities formed on the surface of samples of polyethylene terephthalate (PET), polystyrene (PS) and steel (ST) materials that were exposed in a small pond located at the territory of a solid waste landfill. The taxonomic composition of bacteria and fungi was determined by high-throughput sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene and of the ITS ribosomal operon, respectively. Bioinformatic analysis revealed predominance of bacteria of the phyla *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, and *Bacillota* in the biofilms formed on all samples. The observed quantitative changes in the composition of the dominant bacterial taxa were associated mainly with the exposure time, rather than the material of the samples. The iVikodak program was used to predict the functional characteristics of bacteria in the biofilms. The studied bacterial communities were shown to be potentially able to cause the degradation of polymer materials and xenobiotics and corrosion of steel. The fungal communities were dominated by saprotrophic representatives of the phyla *Ascomycota* and *Basidiomycota*. The effect of the conditions of the aquatic environment on the overall composition of the fungal community during exposure turned out to be less significant than that observed for bacteria; similar to the effect of the sample material, it could be traced for certain fungal genera. Among the dominant fungi, species potentially capable of biodegradation of polymers and corrosion of metals were identified. Microscopy confirmed the local degradation of the initial samples of materials as a result of exposure to the aquatic environment. Pure bacterial cultures of the genera *Bacillus* and *Brevundimonas* were isolated, which degraded alkanes, fatty acids, and phenols.

**Keywords:** solid waste landfills, high-throughput sequencing, the 16S rRNA gene, ITS, bacteria, fungi, polyethylene terephthalate, polystyrene, steel, xenobiotics, functional activity, biodegradation

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ *PEZICULA RADICICOLA* В КЛУБЕНЬКАХ  
АКТИНОРИЗНЫХ РАСТЕНИЙ© 2022 г. Г. А. Кочкина<sup>а</sup>, \*, Н. Е. Иванушкина<sup>а</sup>, И. П. Пинчук<sup>а</sup>, С. М. Озерская<sup>а</sup><sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, 142290 Россия

\*e-mail: gak@dol.ru

Поступила в редакцию 13.05.2022 г.

После доработки 16.06.2022 г.

Принята к публикации 17.06.2022 г.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей регионов ITS, фрагментов генов LSU рДНК и культурально-морфологических признаков определена видовая принадлежность 6 штаммов микелиальных грибов, выделенных из клубеньков актиноризных растений субтропической зоны – кориарии миртолистной (*Coriaria myrtifolia*), восковницы восконосной (*Myrica cerifera*) и лоха колючего (*Elaeagnus pungens*). Изученные микромицеты идентифицированы как *Pezicula radicola*. Представители этого вида впервые найдены в клубеньках актиноризных растений. Обсуждаются возможные функции и экологическая роль микромицетов вида *Pezicula radicola* – микросимбионтов актиноризных растений.

**Ключевые слова:** *Frankia*, *Pezicula*, актиноризные клубеньки, ассоциативные симбионты, эндофитные грибы

DOI: 10.31857/S0026365622600419

Актиноризные растения представляют собой группу покрытосеменных растений, образующих корневые клубеньки, индуцируемые и населенные азотфиксирующими актиномицетами рода *Frankia*. Это преимущественно кустарниковые и древесные растения, которые входят в состав 24 родов, 8 семейств, 3 порядков и встречаются повсеместно. К ним, например, относятся широко распространенные в средней полосе ольха и облепиха, а также более редкие растения субтропической зоны. Способность образовывать азотфиксирующие клубеньки дает им конкурентное преимущество при освоении бедных и неплодородных почв за счет обогащения их азотом, что создает условия для дальнейшей колонизации этих почв другими видами растений (Ngom et al., 2016).

В последнее время произошли значительные изменения в представлениях о симбиозе между растениями и микроорганизмами. Сейчас уже ясно, что симбиотические ассоциации – многокомпонентные системы, в которых могут сосуществовать микроорганизмы, играющие существенную роль в функционировании симбиоза в целом (Khare et al., 2018; Tsiknia et al., 2021). Микромицеты и бактерии в этих ассоциациях составляют огромный по разнообразию и численности пул микроорганизмов. Как показывает молекулярно-генетический анализ микробных сообществ *in situ*, несоизмеримо большая часть эу- и прокариотных организмов, развивающихся в ассоциации с растениями, оста-

ется неисследованной или исследованной крайне слабо. Согласно предварительным оценкам, только около 1–2% всего спектра известных растений исследованы на предмет состава их эндофитов (Strobel, 2018). Среди наиболее изученных ассоциантов растений – микроорганизмы, привлекавшие внимание исследователей в связи с решением практических задач фитопатологии и сельского хозяйства.

Изучение грибов и бактерий, ассоциированных с актиноризными растениями, позволяет предположить, что одна из функций таких микроорганизмов в актиноридном симбиозе – деструкция многолетних симбиотических структур клубеньков и высвобождение пропагул актиномицетов рода *Frankia* для поддержания их инфекционного пула в почве (Ivanushkina et al., 1994). Однако возможно, что взаимовлияние микросимбионтов и, в частности, грибов в клубеньках значительно сложнее, чем кажется на первый взгляд.

В ходе эксперимента по изучению ассоциативных эндосимбионтов в клубеньках ольхи, развивающихся в растениях, искусственно инфицированных актиномицетами рода *Frankia*, нами было показано, что грибы отсутствовали в молодых клубеньках и появлялись лишь по мере развития последних. При этом состав грибов в клубеньках и в среде произрастания растения различался (Kochkina et al., 1994).

**Таблица 1.** Эндоефитные грибы, изолированные из корневых клубеньков актиноризных растений (отбор проб произведен в августе 1990 г.)

| Штамм      | Растение-хозяин                                      | Номер GenBank |
|------------|--|---------------|
| ВКМ F-4853 | Лох колючий ( <i>Elaeagnus pungens</i> )             | MT774097      |
| ВКМ F-4854 |  | MT774098      |
| ВКМ F-4855 | Восковница восконосная ( <i>Myrica cerifera</i> )    | MT774099      |
| ВКМ F-4856 |  | MT774100      |
| ВКМ F-3184 | Кориария миртолистная ( <i>Coriaria myrtifolia</i> ) | MT774096      |
| ВКМ F-4857 |  | MT774101      |

Изучение субтропических актиноризных растений, растущих на желтоземах, также подтвердило наличие специфического, по сравнению с почвенным, сообщества микромицетов внутри клубеньков. Для большинства выделенных микромицетов удалось определить видовую принадлежность (Ivanushkina et al., 1994).

Вместе с тем, была обнаружена большая группа грибов, которые не удалось идентифицировать по фенотипическим (культурально-морфологическим) признакам. Представители этой группы (штаммы ВКМ F-3184, ВКМ F-4853, ВКМ F-4854, ВКМ F-4855, ВКМ F-4856 и ВКМ F-4857) были помещены во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ) и поддерживались как грибы с невыясненным таксономическим положением.

Целью настоящей работы было таксономическое изучение вышеупомянутых микромицетов с использованием классических фенотипических и молекулярных методов, а также оценка возможной роли микромицетов-эндоефитов в микробном сообществе актиноризных клубеньков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эндоефитные грибы были выделены из клубеньков трех актиноризных растений, произрастающих в Сухумском Ботаническом саду (Грузия, СССР) на желтоземных почвах, – лоха колючего (*Elaeagnus pungens*), восковницы восконосной (*Myrica cerifera*) и кориарии миртолистной (*Coriaria myrtifolia*) (Kochkina et al., 1994) (табл. 1).

Изучение культурально-морфологических признаков грибов проводили на мальт-экстракт агаре (MEA), картофельно-глюкозном агаре (PDA), овсяном агаре (ОА) при различных температурах (5, 15, 20, 25, 30, 37°C) в течение 6 нед. Оценивались макроскопические (морфология колоний, цвет, диаметр) и микроскопические (репродуктивные структуры, форма и размер конидий) признаки на 14–30 сут роста. Цвет колоний определяли по специальным цветовым картам (Kornerup, Wanschler, 1978).

Для молекулярно-генетического изучения выделенных культур биомассу получали на среде PDA с целлофаном при 25°C. ДНК грибов выделяли с помощью набора Фитосорб (“Синтол”, Москва, Россия). Концентрацию ДНК измеряли с использованием флуориметра Qubit 3.0 (“Life Technologies”, Карлсбад, Калифорния, США).

Участок ДНК с увеличением длины секвенирования до 1500 п.н. (Vasilenko et al., 2018), включающий фрагмент гена малой субъединицы рРНК (SSU), регион ITS (ITS1, 5.8S рРНК, ITS2) и D1–D3 домены большой субъединицы рРНК (LSU) всех изолятов амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами ITS1F (Gardes, Bruns, 1993) и LR5 (Tedersoo et al., 2008).

Реакции ПЦР проводили в 25 мкл конечного объема с 5 мкл шаблонной ДНК (концентрация 20–70 мкг/мл), 0.5 мкл каждого праймера (10 пмоль/мкл), 1.5 мкл MgCl<sub>2</sub> (25 мМ), 10 мкл мастер-микса (Реакционная смесь для ПЦР-РВ, “Синтол”, Москва, Россия) и 7.5 мкл ddH<sub>2</sub>O. Параметры термоциклера (“Bio-Rad”, Hercules, CA, США) были следующими: первый период денатурации при 95°C в течение 5 мин, затем 34 цикла денатурации при 95°C в течение 30 с, отжига при 53°C в течение 30 с и удлинения при 72°C в течение 1 мин 30 с. Окончательное удлинение при 72°C в течение 5 мин завершало реакцию. Ампликоны очищали с помощью набора Cleanup Standard (“Евроген”, Москва, Россия). Автоматизированное секвенирование ДНК проводилось компанией “Синтол” (Москва, Россия) с использованием праймеров ITS1F, LR5, ITS3, ITS4, NL-3A0V.

Сборку последовательностей осуществляли с помощью программ BioEdit версии 7.1.11 (Hall, 1999), DNASTAR (SeqMan Pro v. 11.1.0). Все последовательности были депонированы в Генбанк (табл. 1).

Сходство последовательностей исследуемых культур и типовых/референтных штаммов (Chen et al., 2016) ближайших видов оценивали с использованием программы BLAST (NCBI). Филогенетическое древо строили по методу макси-

**Таблица 2.** Штаммы видов *Pezizula* и последовательности ДНК, использованные для филогенетического анализа

| Вид                            | Номер штамма    | Растение-хозяин                        | Номера в GenBank |           |
|--------------------------------|-----------------|--|------------------|-----------|
|                                |                 |  | ITS              | LSU       |
| <i>Neofabraea inaequalis</i>   | CBS 326.75, Тип | <i>Chamaecyparis</i> sp.               | KR859081         | NG_069280 |
| <i>Neofabraea malicorticis</i> | CBS 122030, Тип | <i>Malus</i> sp.                       | KR859086         | NG_068983 |
| <i>Pezizula acericola</i>      | CBS 239.38, Тип | <i>Acer spicatum</i>                   | KR859092         | KR858883  |
| <i>Pezizula brunnea</i>        | CBS 120291, Тип | <i>Gaultheria shallon</i>              | KR859103         | NG_067449 |
| <i>Pezizula carpinea</i>       | CBS 923.96, Тип | <i>Carpinus betulus</i>                | KR859108         | NG_067295 |
| <i>Pezizula cinnamomea</i>     | CBS 184.50, Тип | <i>Abies balsamea</i>                  | KR859115         | KR858906  |
| <i>Pezizula diversispora</i>   | CBS 185.50, Тип | <i>Picea abies</i>                     | KR859170         | KR858962  |
| <i>Pezizula ericae</i>         | CBS 120290, Тип | <i>Vaccinium membranaceum</i>          | KR859173         | NG_069888 |
| <i>Pezizula heterochroma</i>   | CBS 199.46, Тип | <i>Alnus crispa</i> var. <i>mollis</i> | KR859210         | NG_067297 |
| <i>Pezizula melanigena</i>     | CBS 898.97, Тип | <i>Quercus petraea</i>                 | KR859211         | NG_069281 |
| <i>Pezizula microspora</i>     | CBS 124641, Тип | <i>Berberis vulgaris</i>               | KR859212         | NG_067298 |
| <i>Pezizula radiculicola</i>   | CBS 640.94, Тип | <i>Quercus robur</i>                   | KR859236         | NG_069837 |
| <i>Pezizula radiculicola</i>   | CBS 681.83      | <i>Quercus robur</i>                   | KR859237         | KR859029  |
| <i>Pezizula rhizophila</i>     | CBS 109839, Тип | <i>Erica tetralix</i>                  | KR859238         | NG_067301 |
| <i>Pezizula sporulosa</i>      | CBS 224.96, Тип | <i>Larix decidua</i>                   | KR859261         | NG_069840 |

мального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) на основе модели замен семейства GTR (General Time Reversible Model) (Nei, Kumar, 2000) с использованием программного обеспечения MEGA X (Kumar et al., 2018). Для филогенетических построений использовали последовательности ITS и LSU, доступные из GenBank для всех референтных штаммов (табл. 2), и полученные нами нуклеотидные последовательности для грибов из актиноризных клубеньков (табл. 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение полученных последовательностей шести эндофитных штаммов грибов (табл. 1) показало, что они идентичны или практически идентичны (100 и 99.9%). По последовательностям ITS и LSU рДНК эндофиты были наиболее близки к организмам рода *Pezizula* (максимальный уровень сходства выявлен с *Pezizula radiculicola*). Величины сходства между *P. radiculicola* CBS 640.94 (типовой штамм вида) и штаммами из клубеньков по ITS (552 п.н.) достигали 99.82–100% (отличия по одному нуклеотиду или полная идентичность) и по LSU (877 п.н.) – 99.88–99.89%.

Сходство ITS исследуемых штаммов и другого наиболее близкого вида, *P. melanigena*, было 99.07–99.28%, что ниже предложенной границы разделения видов – 99.6% (Vu et al., 2019). Показатели сходства с другими видами были еще ниже.

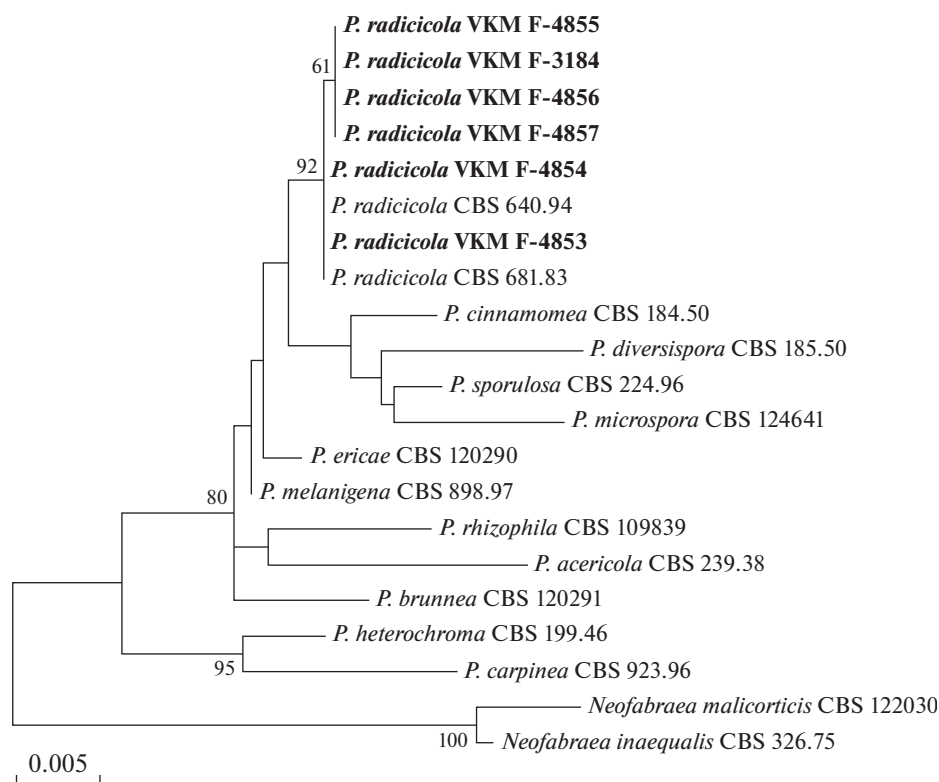
На филогенетическом древе, построенном на основе комбинированных последовательностей

ITS региона рДНК и фрагментов генов LSU рДНК, все изученные штаммы формировали монофилетическую группу в составе рода *Pezizula*, включающую также типовой штамм *P. radiculicola* CBS 640.94, и обособлялись от организмов других видов (рис. 1).

Результаты филогенетического анализа согласуются с данными фенотипического изучения культур. Известно (Kowalski, Bartnik, 1995; Verkley et al., 2003; Sigler et al., 2005), что для получения конидиогенных структур *in vitro* у изолятов *Pezizula* используется набор разнообразных условий культивирования (сред и температур). Установлено, что все шесть изученных штаммов росли в интервале температур от 5 до 30°C, при температуре 37°C рост отсутствовал.

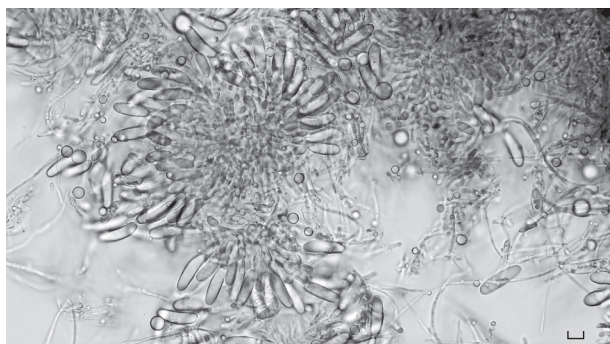
При оценке роста штаммов во всех изученных вариантах культивирования было отмечено, что культуральные признаки наиболее выражены на среде PDA при оптимальной для роста температуре культивирования 25°C. Диаметр колоний на PDA через 14 сут роста достигал: 76–84 мм (ВКМ F-4854, ВКМ F-4855, ВКМ F-4857) и 60–67 мм (ВКМ F-3184, ВКМ F-4853, ВКМ F-4856). Колонии плотные, войлочные, края ровные или лопастные, цвет варьировал от белого (3A1) до красноватого светло-коричневато-оранжевого (5C3), центры колоний были наиболее пигментированы. Цвет реверса варьировал от белого (3A1) до сернистого (4C5), оранжево-серого (5A2) и табачно-коричневого (5F6). Наиболее интенсивный цвет колоний был обнаружен у штаммов ВКМ





**Рис. 1.** Филогенетическое дерево изученных и типовых/референтных штаммов видов рода *Pezicula* на основе комбинированных последовательностей ITS и LSU ядерной рДНК, построенное по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood). Шкала соответствует 0.005 замены нуклеотидов на позицию.

F-3184, ВКМ F-4853 и ВКМ F-4857. Ни один штамм не образовал плодовые тела в чистой культуре. Штамм ВКМ F-4857 остался стерильным независимо от условий культивирования. Пять штаммов сформировали макроконидии (19–35 × 5.0–7.5 мкм), типичные по форме и размерам для *P. radiculicola*, как на одиночных конидиеносцах, так и в спородохиях разной формы – от полукруглой до сферической (рис. 2). Микроконидии (3.5–7.5 × 1.5–2.5 мкм), отмеченные при описании вида *P. radiculicola*, образовались только у штаммов ВКМ F-4853 и ВКМ F-4854. Сетаподобные гифы, опи-



**Рис. 2.** Конидиогенные структуры штамма ВКМ F-4853.

санные у *P. radiculicola*, удалось обнаружить только у штамма ВКМ F-3184, строму – у штамма ВКМ F-4853.

Фенотипические характеристики изученных штаммов достаточно сильно различаются по отдельным признакам, таким как интенсивность окраски колоний, наличие/отсутствие конидий, сетозных (жестких, толстостенных, темноокрашенных) гиф и стромы, однако в целом соответствуют описанию *P. radiculicola* (Kowalski, Bartnik, 1995). Ранее при описании видов рода *Pezicula* также отмечалась значительная фенотипическая вариабельность штаммов (Sigler et al., 2005).

Таким образом, на основании результатов сравнительного анализа последовательностей ITS, фрагментов LSU рДНК и фенотипических признаков изученные штаммы могут быть отнесены к виду *Pezicula radiculicola* (Т. Kowalski et С. Bartnik 1995) P.R. Johnston 2014, типовой штамм которого был выделен с корней дуба *Quercus robur*. В настоящее время грибы этого вида найдены на корнях осины (Wang et al., 2007), ясеня, ели (Stroheker et al., 2021) и других растений. Из клубеньков актиноризных растений субтропической зоны, где они являются одними из основных микосимбионтов, эти грибы были выделены впервые.

Для понимания экологической роли эндофитов *P. radiculicola* в клубеньках была оценена встре-

чаемость и доля представителей этого вида среди всех ассоциативных симбионтов, изученных нами ранее (Ivanushkina et al., 1994). Микобиота корневых клубеньков этих растений представлена анаморфами аскомицетов и базидиомицетов, а также большим количеством стерильного мицелия, как темного, так и светлоокрашенного. Большая часть всех идентифицированных штаммов принадлежала к видам рода *Cylindrocarpon*: *C. didymum*, *C. effusum*, *C. obtusisporum* и *C. theobromicola*. Хорошо известно, что представители этого рода являются патогенами растений (Carote et al., 2022), однако в нашем случае никаких видимых признаков заболевания обнаружено не было. Эндифиты вида *P. radicola* оказались вторыми по обилию (отношению числа штаммов данного рода к общему числу выделенных штаммов) и первыми по частоте встречаемости (отношение числа образцов, в которых встретился таксон к общему числу образцов) среди всех выделенных из клубеньков грибов. Частота встречаемости *P. radicola* оказалась выше 80%, что больше, чем у других ассоциативных микосимбионтов. Очень небольшое количество изолятов принадлежало родам *Fusarium*, *Acremonium*, *Zalerion* и некоторым другим (Ivanushkina et al., 1994).

Виды рода *Pezicula* обычно встречаются в умеренных регионах мира. Они могут быть сапротрофами на гниющей древесине и опаде, а также способны выступать как эндифитные грибы, локализуясь в разных частях растений.

Подробно спектр растений, из которых выделяются грибы этого рода, представлен в масштабном таксономическом труде, посвященном грибам рода *Pezicula* и близким родам (Chen et al., 2016), где было изучено 211 штаммов из крупнейшей коллекции грибов CBS (Collection of yeasts and filamentous fungi, The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute). Показано, что около трети всех штаммов было изолировано из растений порядка *Pinales* (сосновые) – это сосна, ель, лиственница и пихта. В отделе *Magnoliophyta* (цветковые) наибольшее число штаммов было выделено из порядков *Fagales* (буковые) и *Rosales* (розоцветные) – 16 и 14% соответственно. Штаммы выделяли с разных частей растений, но более всего – из корневой системы. Авторы отметили, что некоторые виды *Pezicula* могут быть слабыми патогенами растений, вызывающими заболевания исключительно у ослабленных хозяев.

Выделенные нами штаммы связаны с растениями лох колючий (*Rosales*, розоцветные), восковница восконосная (*Fagales*, буковые) и кориария миртолистная (*Cucurbitales*, тыквоцветные). С растений последнего порядка штаммы этого рода были выделены впервые.

Роль этих грибов в клубеньках актиноризных растений до конца не изучена. Однако известно, что эндифиты растений продуцируют целый пул

метаболитов с разнообразной структурой, которые активно участвуют в жизни растений и могут служить важнейшими ресурсами для разработки новых эффективных фунгицидов (Xu et al., 2019).

Грибы рода *Pezicula* – неисчерпаемые источники разнообразных вторичных метаболитов, полезных для растений. Они образуют различные биологически-активные вещества (Schulz et al., 1995), например, эхинокандины, представляющие собой противогрибные липопептиды, элиминирующие фитопатогенные грибы и позволяющие осуществлять защиту растений, и при этом сами не испытывают влияния микоцида вследствие уникального генетического механизма саморезистентности (Yue et al., 2018). Кроме того, эти грибы продуцируют и другие антибиотики, такие как меллеин, микоризин, криптоспориопсин, криптокандин (Chen et al., 2016). Они синтезируют летучие соединения, активные в отношении фитопатогенных грибов *Sclerotinia sclerotiorum* и *Setosphaeria turcica*, ингибирующие их развитие (Zhang et al., 2018). Недавно был выделен штамм *Pezicula* sp., образующий целый спектр метаболитов, активных в отношении различных фитопатогенных грибов, особенно против *Botrytis cinerea* и *Fulvia fulva*, что переводит эти грибы в разряд перспективных для биотехнологии (Wang et al., 2014). В США получен патент на способ производства средств для профилактики и борьбы с грибными заболеваниями растений на основе сложных эфиров грибов *Pezicula* sp. (Xu et al., 2019).

Изучение грибов, ассоциированных с микоризами, показало, что грибы рода *Pezicula* встречаются в корневой системе микоризных растений наряду с *Glomus* и другими эндомикоризными грибами. Предполагается, что это также связано с продукцией вторичных метаболитов, активных в отношении фитопатогенов. Но это только одна из функций. Все большее число исследований показывает, что немикоризные эндифитные грибы могут снабжать растение-хозяина фосфором, потенциально играя ту физиологическую роль, которая свойственна грибам микоризы (Almario et al., 2017; Toju, Sato, 2018).

Было сделано предположение, что грибы-эндифиты, связанные с различными таксономическими группами растений в широком географическом диапазоне, могут опосредовать косвенные взаимодействия между арбускулярными микоризными и эктомикоризными видами растений через подземные мицелиальные связи, создавая целые “метасообщества” (Toju et al., 2018). В Японии с помощью метагеномного секвенирования были получены данные о корневых ассоциациях грибов с растениями на территории восьми хвойных лесов Японского архипелага, включающие информацию о 150 видах деревьев и более 8000 ОТЕ грибов. Детальный сетевой анализ полученных сведений позволил выявить среди тысяч видов “метакоммуникативные” узловые виды грибов

(“hub” species), которые играют ключевую роль в синхронизации процессов масштаба “метасообщества” в растительно-микробных ассоциациях, способствуя росту растений-хозяев и устойчивости их к патогенам. Список “метакоммуникативных” эндофитных грибов не слишком велик, но включает грибы рода *Pezicula* (Toju et al., 2018).

Данный вывод согласуется с нашими исследованиями, которые показывают, что роль этих грибов в клубеньках актиноризных растений может не исчерпываться какой-то одной функцией и быть гораздо сложнее, чем взаимодействие растение–гриб. Проведенное нами изучение взаимоотношений между грибами рода *Pezicula* и основным симбионтом актиноризных клубеньков актиномицетами рода *Frankia* указывает на мутуалистические отношения между этими микроорганизмами. Известно, что актиномицеты рода *Frankia* образуют розовые или красно-коричневые пигменты, идентифицированные как бензо-нафта-хиноны, которые, как было показано, ингибируют рост некоторых грамположительных бактерий, дрожжей и грибов. Более детальное изучение состава антимикробных соединений, выделенных из штаммов *Frankia* (изоляты из *Alnus incana* и *Pinus sylvestris*), показало, что это антибиотические вещества кальцимицинового класса и пирозифириные ионофоры (Sarma et al., 2003). Нами показано, что пигмент, образованный актиномицетами *Frankia*, выделенными из тех же клубеньков, что и штаммы *Pezicula radiculicola*, положительно повлиял на развитие последних, увеличивая скорость роста в среднем на 40%. В то же время рост грибов *Fusarium oxysporum*, которые не встречались в клубеньках, но были обнаружены в желтоземах вокруг них, значительно замедлялся (Kochkina et al., 1995). Очевидно, что можно говорить о селективном воздействии пигмента на грибы из разных мест обитания.

Этот факт может быть подтверждением избирательности клубеньков по отношению к микромицетам, что выражается в наличии в клубеньке специфического комплекса микроорганизмов, в котором впервые найденные грибы рода *Pezicula* могут играть значительную роль.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1051.

#### 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

- Almarino J., Jeena G., Wunder J., Langen G., Zuccaro A., Coupland G., Buche M. Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis thaliana* and its contribution to plant phosphorus nutrition // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. E9403–E9412. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710455114>
- Capote N., Del Rio M.A., Herencia J.F., Arroyo F.T. Molecular and pathogenic characterization of *Cylindrocarpum*-like anamorphs causing root and basal rot of almonds // Plants. 2022. V. 11. P. 984. <https://doi.org/10.3390/plants11070984>
- Chen C., Verkley G.J.M., Sun G., Groenewald J.Z., Crous P.W. Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezicula* and related genera // Fungal Biol. 2016. V. 120. P. 1291–1322. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.013>
- Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts // Mol. Ecol. 1993. V. 2. P. 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acid. S. 1999. V. 41. P. 95–98.
- Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Ступарь О.С., Павлова О.С., Полянская Л.М. Специфика микромицетных комплексов прикорневой зоны и клубеньков актиноризных растений // Микробиология. 1994. Т. 63. С. 909–916.
- Ivanushkina N.E., Kochkina G.A., Stupar O.S., Pavlova O.S., Polyanskaya L.M. Specific features of micromycete complexes of the rhizosphere and nodules of actinorhizal plants // Microbiology (Moscow). 1994. V. 63. P. 511–515.
- Khare E., Mishra J., Arora N.K. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 2732. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>
- Kochkina G.A., Ivanushkina N.E. Effect of *Frankia* sp. pigment on growth of fungi from actinorhizal nodules // XII Congress of European Mycologists. Netherland, Wageningen. 1995. Abstracts. P. 31.
- Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Павлова О.С., Полянская Л.М. Видовой состав микромицетов актиноризных клубеньков ольхи // Микробиология. 1994. Т. 63. С. 699–705.
- Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Pavlova O.S., Polyanskaya L.M. Species composition of micromycetes of *Alder* actinorhizal nodules // Microbiology (Moscow). 1994. V. 63. P. 397–400.
- Kornerup A., Wanscher J.H. Methuen Handbook of Colour, 3rd edn. London: Eyre Methuen, 1978. 252 p.
- Kowalski T., Bartnik C. *Cryptosporiopsis radiculicola* sp. nov. from roots of *Quercus robur* // Mycol. Res. 1995. V. 99. P. 663–666. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80524-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80524-8)
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, N.Y., 2000. 352 p.

- Ngom M., Oshone R., Diagne N., Cissoko M., Svistoonoff S., Tisa L.S., Laplaze L., Sy M.O., Champion A. Tolerance to environmental stress by the nitrogen-fixing actinobacterium *Frankia* and its role in actinorhizal plants adaptation // Symbiosis. 2016. V. 70. № 1–3. P. 17–29.  
<https://doi.org/10.1007/s13199-016-0396-9>
- Sarma K.H., Sarma B.K., Tiwari S.C. A novel calcimycin antibiotic from Gram-positive actinomycete *Frankia* microsymbiont // Curr. Sci. 2003. V. 85. P. 1401–1403.  
[www.researchgate.net/publication/255621183](http://www.researchgate.net/publication/255621183)
- Schulz B., Sucker J., Aust H.J., Krohn K., Ludewig K., Jones P.G., Döring D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezicula* species // Mycol. Res. 1995. V. 99. P. 1007–1015.  
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80766-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80766-1)
- Sigler L., Allan T., Lim S.R., Berch S., Berbee M. Two new *Cryptosporiopsis* species from roots of ericaceous hosts in western North America // Stud. Mycol. 2005. V. 53. P. 53–62.  
<https://doi.org/10.3114/sim.53.1.53>
- Sirobel G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise // J. Fungi. 2018. V. 4. P. 57.  
<https://doi.org/10.3390/jof4020057>
- Siroheker S., Dubach V., Vogtli I., Sieber T.N. Investigating host preference of root endophytes of three European tree species, with a focus on members of the *Phialocephala fortinii*–*Acephala applanata* species complex (PAC) // J. Fungi. 2021. V. 7. P. 317.  
<https://doi.org/10.3390/jof7040317>
- Tedersoo L., Jairus T., Horton B.M., Abarenkov K., Suvi T., Saa I., Kõljalg U. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers // New Phytol. 2008. V. 180. P. 479–490.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02561.x>
- Toju H., Sato H. Root-associated fungi shared between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal conifers in a temperate forest // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 433.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00433>
- Toju H., Tanabe A.S., Sato H. Network hubs in root-associated fungal metacommunities // Microbiome. 2018. V. 6. P. 116.  
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0497-1>
- Tsiknia M., Tsikou D., Papadopoulou K., Ehaliotis C. Multi-species relationships in legume roots: From pairwise legume-symbiont interactions to the plant–microbiome–soil continuum // FEMS Microbiol. Ecol. 2021. V. 97. fiae222.  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiae222>
- Vasilenko O., Ivanushkina N., Starodumova I., Kochkina G., Danilogorskaya A., Pinchuk I., Telkov M., Ozerskaya S. The advantage of the usage of the long “boosted” fungal barcode that includes ITS1/2 region and D1/D3 domain of the 26S large subunit ribosomal DNA // XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections’ Organisation. Conference Proceedings. Russia, Moscow. 2018. P. 126–127.
- Verkley G.J.M., Zijlstra J.D., Summerbell R.C., Berendse F. Phylogeny and taxonomy of root-inhabiting *Cryptosporiopsis* species, and *C. rhizophila* sp. nov., a fungus inhabiting roots of several *Ericaceae* // Mycol. Res. 2003. V. 107. P. 689–698.  
<https://doi.org/10.1017/S0953756203007883>
- Yu D., Groenewald M., De Vries M., Gehrman T., Stielow B., Eberhardt U., Al-Hatmi A., Groenewald J.Z., Cardinali G., Houbraken J., Boekhout T., Crous P.W., Robert V., Verkley G.J.M. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation // Stud. Mycol. 2019. V. 92. P. 135–154.  
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
- Wang J., Wang G., Zhang Y., Zhen B., Zhang C., Wang L. Isolation and identification of an endophytic fungus *Pezicula* sp. in *Forsythia viridissima* and its secondary metabolites // World J. Microb. Biot. 2014. V. 30. P. 2639–2644.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1686-0>
- Wang W., Tsuneda A., Gibas C., Currah R.S. *Cryptosporiopsis* species isolated from the roots of aspen in central Alberta: identification, morphology and interactions with the host, *in vitro* // Can. J. Bot. 2007. V. 85. P. 1214–1226.  
<https://doi.org/10.1139/B07-086>
- Xu L., Duan X., Wei X., Xue J., Feng L., Wu P. Fungal trisaccharide ester compounds and use thereof in preparing agents for preventing and controlling plant fungal diseases. US Patent. № 0166835 A1. 2019.
- Yue Q., Li Y., Chen L., Zhang X., Liu X., An Z., Bill G.F. Genomics driven discovery of a novel self-resistance mechanism in the echinocandin producing fungus *Pezicula radicola* // Environ. Microbiol. 2018. V. 20. P. 3154–3167.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14089>
- Zhang X.H., Zhang D.J., Liu J.L., Pan H.Y., Qin J.C., Zhang Y.H. Antifungal effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis ericae* Cc-HG-7 isolated from *Coptis chinensis* Franch. // Biocontrol. Sci. Techn. 2018. V. 28. P. 496–508.  
<https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1460744>

## Endophytic Fungi *Pezicula radicola* in the Root Nodules of Actinorhizal Plants

G. A. Kochkina<sup>1, \*</sup>, N. E. Ivanushkina<sup>1</sup>, I. P. Pinchuk<sup>1</sup>, and S. M. Ozerskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences (PSCBR RAS), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

\*e-mail: [gak@dol.ru](mailto:gak@dol.ru)

Received May 13, 2022; revised June 16, 2022; accepted June 17, 2022

**Abstract**—Based on analysis of the nucleotide sequences of the ITS regions, LSU gene fragments of rDNA, and cultural and morphological characteristics, species affiliation of six strains of mycelial fungi isolated from root nodules of actinorhizal plants in the subtropical zone (*Coriaria myrtifolia*, *Myrica cerifera*, and *Elaeagnus pungens*) was determined. The micromycetes studied were identified as *Pezicula radicola*. Members of this species have not previously been revealed in the root nodules of actinorhizal plants. The possible functions and ecological role of *Pezicula radicola* as mycosymbionts of actinorhizal plants are discussed.

**Keywords:** *Frankia*, *Pezicula*, actinorhizal root nodules, associative symbionts, endophytic fungi

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИАНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ  
ИЗ МНОГОНОЖЕК *NEDYOPUS DAWYDOFFIAE* И *ORTHOMORPHA* SP.

© 2022 г. Т. А. Ефименко<sup>а</sup>\*, А. В. Якушев<sup>б</sup>, А. А. Карабанова<sup>а</sup>, А. А. Глухова<sup>а</sup>,  
М. В. Демьянкова<sup>а</sup>, Б. Ф. Васильева<sup>а</sup>, Ю. В. Бойкова<sup>а</sup>, Н. Д. Малкина<sup>а</sup>,  
Л. П. Терехова<sup>а</sup>, О. В. Ефременкова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков  
им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

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

\*e-mail: efimen@inbox.ru

Поступила в редакцию 18.04.2022 г.

После доработки 15.06.2022 г.

Принята к публикации 20.06.2022 г.

Из кишечников многоножек видов *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha* sp. (класс *Diplopoda*) и из их кормовых субстратов, представляющих собой растительные остатки, выделено и идентифицировано 72 штамма бактерий 25 родов. Среди исследованных актинобактерий наиболее многочисленной группой являются стрептомицеты, а также присутствуют представители 14 других родов актинобактерий. Отмечено высокое содержание обладающих антимикробной активностью актинобактерий, среди которых обнаружены представители “редких” родов *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Kitasatospora*, *Lechevalieria*, *Micromonospora*, *Nocardioopsis*, *Saccharopolyspora*. Впервые описана антимикробная активность у *Kitasatospora saccharophila* ИНА 01226 и *Nocardioopsis umidischolae* ИНА 01230. Показана гетерогенность по признаку антибиотикообразования в популяциях *Streptomyces pratensis* и *S. termitum*. Выявлены наиболее перспективные для химического изучения образуемых антибиотиков штаммы бактерий, проявившие активность в отношении метициллинрезистентного штамма *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA) и ванкомицинрезистентного штамма *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 (VRLM).

**Ключевые слова:** бактерии, актинобактерии, стрептомицеты, “редкие” роды, *Diplopoda*, *Nedyopus dawydoffiae*, *Orthomorpha* sp., эндобионты, продуценты антибиотиков, антибиотикорезистентность

**DOI:** 10.31857/S002636562260033X

Внедрение антибиотиков в медицинскую практику стало революционным событием, однако селективное давление на патогенные микроорганизмы вызвало ответную реакцию — возникновение антибиотикорезистентных форм. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) данная ситуация может привести к снижению эффективности антибиотиков и превращению инфекционных заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами, в одну из главных причин смертности в мире уже к 2050 г. (O'Neill, 2016). Одним из способов решения проблемы антибиотикорезистентности является поиск новых эффективных антимикробных соединений, которые могли бы пополнить арсенал лекарственных средств. Основными продуцентами антибиотиков являются актинобактерии и грибы, выделенные из сложных многокомпонентных биоценозов, главным образом, из почв (Bérdu, 2005). Это объясняется тем обстоятельством, что в ходе эволюции конкурентная борьба между микроорганизмами приве-

ла к выработке у них разнообразных антимикробных веществ как средств защиты. Микробиота кишечников животных также является многокомпонентным биоценозом, который можно рассматривать как источник продуцентов антибиотиков. С другой стороны, малоизученные среды обитания также перспективны в плане изыскания продуцентов новых антибиотиков (Donadio et al., 2007). Учитывая оба обстоятельства, можно предположить, что перспективной экологической системой для выделения бактерий — продуцентов антибиотиков являются кишечники беспозвоночных животных, в том числе многоножек (Kaltenpoth, 2009).

Бактериальное сообщество кишечников многоножек участвует в пищеварении, биосинтезе метана, поддерживает постоянство микробиома. Однако не все бактерии, выделяемые из кишечника многоножек класса *Diplopoda*, принадлежат к микробиому кишечника, многие из них являются транзитными видами, поглощенными с





Рис. 1. Многоножки *Nedyopus dawydoffiae* (вверху) и *Orthomorpha* sp. (внизу).

кормом. Применение сканирующей электронной микроскопии позволило убедиться, что стенка и кутикула кишечника, а также остатки перитрофической мембраны, колонизированы различными бактериями, в том числе актинобактериями, для которых кишечная среда оказалась благоприятной (Szabo et al., 1992; Полянская и соавт., 1996). На основании этого, можно сделать вывод, что часть высеваемых из кишечника бактерий составляют микробиом многоножек (Бызов и соавт., 1993; Бызов, 2005; König, Varma, 2006).

Представленное исследование является продолжением нашей работы по изучению антимикробных свойств бактерий, выделенных из кишечника тропической многоножки *Nedyopus dawydoffiae* (Glukhova et al., 2018).

Целью данной работы было изучение антибиотической активности штаммов, выделенных из кишечника тропических диплопод *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha* sp. и их кормовых субстратов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** Исследовали бактерии, выделенные из кишечника многоножек *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha* sp., принадлежащих к классу *Diplopoda*, и их кормового субстрата — гнилой древесины и листового опада соответственно (рис. 1). Многоножки были отобраны методом ручного сбора в национальном парке Кат Тьен, расположенном в муссонном коренном тропиче-

ском лесу на юге Вьетнама, и содержались в почвенных лабораторных микрокосмах на естественном субстрате, также служившем кормом. Бактерии были выделены в чистые культуры посевом содержимого кишечников и кормовых субстратов на агаризованную среду № 1 Гаузе.

**Тест-штаммы.** В качестве тест-штаммов для определения антибиотической активности были использованы грамположительные бактерии: метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), метициллинчувствительный *Staphylococcus aureus* FDA 209P (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA), *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. mycoides* 537, *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177, обладающий природной устойчивостью к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина (vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides*, VRLM); грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ); грибы: *Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259.

**Питательные среды.** Для культивирования исследуемых штаммов использовали агаризованные среды № 1 и № 2 Гаузе, овсяная, соевая. Полноценная питательная модифицированная среда № 2 Гаузе (%): глюкоза — 1.0, пептон — 0.5, NaCl — 0.5, триптон — 0.3, агар — 2.0, вода водопроводная; pH 7.2–7.4; № 1 Гаузе (%): крахмал растворимый — 2.0, KNO<sub>3</sub> — 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0.05, MgSO<sub>4</sub> — 0.05, NaCl — 0.05, FeSO<sub>4</sub> — 0.001, агар — 2.0; pH 7.2–7.4; овсяная (%): овсяная мука — 2.0, агар — 2.0, вода водопроводная; pH 7.2; соевая (%): соевая мука — 2.0, глюкоза — 1.0, NaCl — 0.5, агар — 2.0, вода водопроводная; pH 7.2.

Глубинное культивирование актинобактерий проводили в восьми жидких питательных средах, разработанных для актинобактерий — продуцентов антибиотиков в ФГБНУ «НИИНА»:

- (1) СТР (%): глюкоза — 1.0, пептон — 0.5, NaCl — 0.5, триптон — 0.3, вода водопроводная; pH 7.2–7.4;
- (2) А4 (%): глюкоза — 1, соевая мука — 1, NaCl — 0.5, CaCO<sub>3</sub> — 0.25; pH 6.8;
- (3) 6613 (%): крахмал — 2, кукурузный экстракт — 0.3, KNO<sub>3</sub> — 0.4, NaCl — 0.5, CaCO<sub>3</sub> — 0.5; pH 7.0–7.2;
- (4) Сахарозная (%): сахароза — 2, соевая мука — 1, NaCl — 0.3, CaCO<sub>3</sub> — 0.3; pH 6.8–7.0;
- (5) 2663 (%): глицерин — 3, соевая мука — 1.5, NaCl — 0.3, CaCO<sub>3</sub> — 0.3; pH 7.0;
- (6) 330 (%): сахароза — 2.1, крахмал — 0.85, гороховая мука — 1.5, CaCO<sub>3</sub> — 0.5, NaCl — 0.5, NaNO<sub>3</sub> — 0.5; pH 7.0;
- (7) 5539 (%): глицерин — 2, соевая мука — 0.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 0.15, NaCl — 0.3, CaCO<sub>3</sub> — 0.3; pH 6.8;

(8) Ам (%): сахароза – 4,  $K_2HPO_4$  – 0.1,  $Na_2SO_4$  – 0.1,  $NaCl$  – 0.1,  $(NH_4)_2SO_4$  – 0.2, дрожжевой экстракт сухой – 0.25,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.0001,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 0.0001,  $NaI$  – 0.00005,  $CaCO_3$  – 0.2; рН 6.5–6.7.

**Условия культивирования.** Тест-штаммы культивировали в течение 1 сут при температуре 28°C для грибных культур и *L. mesenteroides* и при 37°C для остальных бактериальных культур. Ферментацию культур актинобактерий проводили в условиях глубинного культивирования в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со 150 мл среды на роторной качалке со скоростью 220 об./мин при 28°C в два этапа. На первом этапе для получения посевного материала вырезали кусочек размером 1 см<sup>2</sup> овсяной питательной среды с исследуемой культурой и переносили в среду СТР, культивирование длилось 4 сут. На втором этапе 5 мл культуральной жидкости переносили в качестве посевного материала в колбы с семью различными средами.

**Видовая идентификация.** Видовую идентификацию актинобактерий проводили по морфологическим признакам и на основании анализа последовательности гена 16S рРНК. При морфологическом описании фиксировали строение спораносцев, пигментацию воздушного и субстратного мицелия, выделяемый в среду пигмент (Гаузе и соавт., 1983; Беркли и соавт., 1997). Для выделения ДНК использовали трехдневную биомассу, полученную в жидкой среде СТР. Выделение бактериальной геномной ДНК проводили с использованием набора PowerSoil DNA Kit (“MO BIO”, Карлсбад, Калифорния, США). Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием набора реагентов PCR Master Mix (“Thermo Scientific”, Фостер-Сити, Калифорния, США) с универсальными бактериальными праймерами 27f (aga gtt tga tcc tgg ctacg) и 1492r (tac ggy tac ctt gtg acg act t). ПЦР проводили на амплификаторе Thermal Cycler 2720 (“Applied Biosystems”, США) по программе: (1) 94°C – 5 мин, (2) 30 циклов с чередующимися температурными интервалами 94°C – 1 мин, 51°C – 1 мин, 72°C – 2 мин, (3) 72°C – 7 мин. Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле (с использованием *tris*-боратного буфера TBE) при напряженности электрического поля 7.6 В/см. Очистку продуктов ПЦР проводили путем переосаждения ДНК в мягких условиях с использованием 0.125 М ацетата аммония в 70% этаноле. Нуклеотидные последовательности определяли методом Сэнгера на автоматическом генетическом анализаторе 3500 (“Applied Biosystems”, Беверли, Массачусетс, США) с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f, 341f (cct acg gga ggc agc ag), 519r (gta tta ccg cgg ctg ctg), 785f (ggm tta gat acc tgg tag tcc), 907r (ccg tca att cct ttg agt tt), 1100r (ggg ttg cgc teg ttg), 1114f (gca acg agc gca acc c), 1392r (acg ggc ggt gtg trc)

и 1492r. Для сборки нуклеотидных последовательностей использовалась программа Mega 7. Полученные последовательности сравнивали с нуклеотидными последовательностями гена 16S рРНК типовых штаммов бактерий, полученных из баз данных GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) и Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

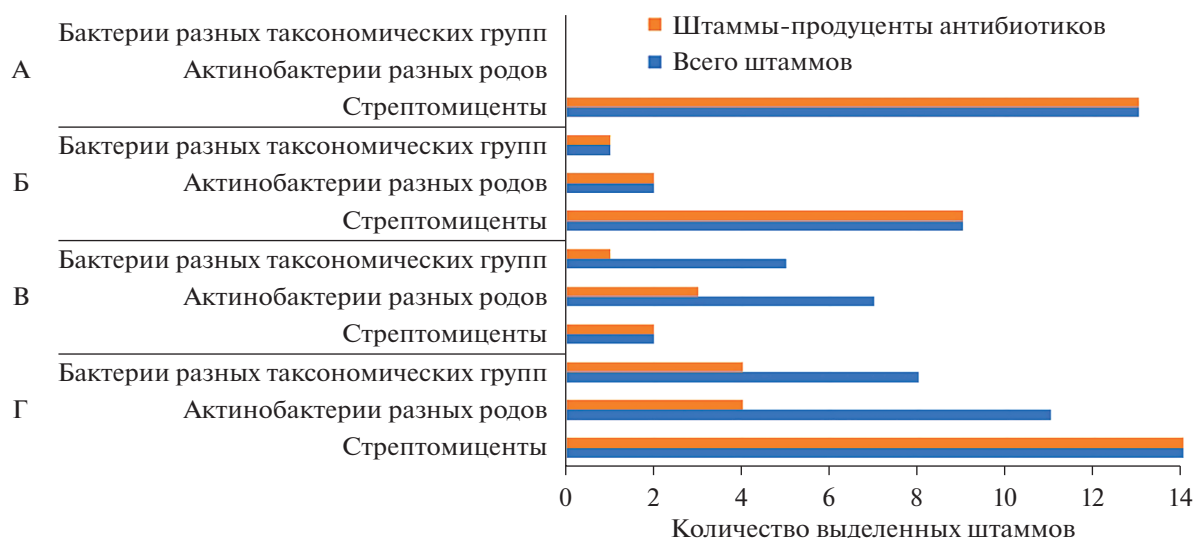
**Определение антибиотической активности.** Для определения антибиотической активности в чашках Петри с агаризованной средой № 2 Гаузе, инокулированной тест-микроорганизмами, делали лунки диаметром 9 мм и вносили по 0.1 мл культуральной жидкости исследуемых штаммов. Оценку антибиотической активности в культуральной жидкости проводили на 4 и 7 сут глубинного культивирования актинобактерий и на 2 и 4 сут у бактерий других таксономических групп. Результат представляли в виде диаметра (в мм) зоны подавления роста тест-штамма. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel 2016; оценку антибиотической активности в культуральной жидкости анализировали в 5-кратной повторности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего изучено 72 штамма бактерий, представленных в табл. 1. Среди исследованных актинобактерий преобладали стрептомицеты. Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК проводили с последовательностями типовых штаммов из базы данных RDP. Последовательности, которые совпадали не менее чем на 98%, были депонированы в базу данных GenBank. Видовая идентификация исследованных бактерий показала большое таксономическое разнообразие, а именно, выделены представители 25 родов, 16 из которых принадлежали к классу *Actinobacteria*.

Актинобактерии преобладают в бактериальном комплексе кишечника многоножек и являются второй по численности группой после  $\gamma$ -протеобактерий (König, Varma, 2006; Knapp et al., 2010). Согласно данным литературы в кишечнике *Diplopoda* наиболее многочисленным среди актинобактерий является род *Streptomyces* (Бызов и соавт., 1993). Кишечные актинобактерии многоножек участвуют в гидролизе содержимого кишечника, а их наибольшее скопление наблюдается в заднем отделе (Бызов и соавт., 1993; Звягинцев и соавт., 1996; Полянская и соавт., 1996). Последующие работы показывают большое разнообразие родов актинобактерий. Были выделены представители родов *Micromonospora*, *Actinomadura* и *Streptosporangium*, нокардиоподобные формы (König, Varma, 2006). Полученные нами данные согласуются с этими выводами.





**Рис. 2.** Распределение исследуемых штаммов по группам бактерий. А – кишечник *Nedyopus dawydoffiae*, Б – кормовой субстрат *Nedyopus dawydoffiae* (гнилая древесина), В – кишечник *Orthomorpha* sp., Г – кормовой субстрат *Orthomorpha* sp. (листовой опад).

Исследование антибиотической активности показало высокую долю активных штаммов среди исследуемых культур, перечисленных в табл. 1. Антимикробный спектр данных штаммов в отношении коллекционных тест-микроорганизмов представлен в табл. 2.

Из представленных в таблицах данных следует, что все выделенные стрептомицеты проявляют антибиотическую активность, что подтверждает накопленный опыт десятилетий золотой эры антибиотиков. Согласно данным, полученным из базы MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) средняя общая длина генома представителей рода *Streptomyces* составляет 9 Mb, при этом данный род занимает лидирующее положение по числу обнаруженных кластеров биосинтетических генов (BGCs), а именно, 637 (NCBI (Assembly), [www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly); MIBiG, <http://mibig.secondarymetabolites.org>). Известно, что представители рода *Streptomyces* являются продуцентами 70–80% вторичных метаболитов, но после них важными продуцентами антибиотиков являются представители “редких” родов актинобактерий (Bérdu, 2005; Ventura et al., 2007; Raja, Prabakarana, 2011). Нами в ходе данного исследования, помимо стрептомицетов, были выделены представители “редких” родов актинобактерий: *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Kitasatospora*, *Lechevalieria*, *Micromonospora*, *Nocardioopsis*, *Saccharopolyspora*, среди которых также обнаружены антибиотически активные штаммы. Обнаружение антимикробной активности у “редких” родов актинобактерий, которые менее исследованы, чем стрептомицеты, повышает вероятность выделения новых антибиотиков (рис. 2).

Поскольку антибиотики являются вторичными метаболитами, возможны внутривидовые флуктуации по признаку их биосинтеза. В табл. 2 представлены два штамма *S. pratensis*, отличающиеся антимикробной активностью в отношении трех штаммов бацилл и гриба *Aspergillus niger*: штамм ИНА 01179 активен в отношении *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. mycoides* 537, но не в отношении гриба, и, напротив, штамм ИНА 01182 не активен в отношении указанных бацилл, но проявляет антимикотическую активность. Другим примером являются два выделенных штамма *S. termitum*: штамм ИНА 01244 активен в отношении грамположительной бактерии *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 и в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli* ATCC 25922, но штамм ИНА 01245 такой активностью не обладает; в отношении других тестов эти штаммы проявляют равную активность (что свидетельствует о биосинтезе более одного антибиотика представителями данного вида). Ранее нами было показано, что популяция *S. antibioticus*, выделенная из гнезда черного садового муравья *Lasius niger*, гетерогенна по признаку образования антибиотиков актиномицинового комплекса (Efimenko et al., 2020). Гетерогенность по признаку антибиотикообразования обусловлена, с одной стороны, наличием конкурентов по биоценозу, с другой стороны – источником питательных веществ. В случае *S. termitum* при погруженном культивировании в двух средах у двух изолятов из одной популяции (листового опада) наблюдаются различия, как в уровне биосинтеза антибиотических веществ, так и по антимикробному спектру (рис. 3).

**Таблица 1.** Таксономическая принадлежность выделенных штаммов бактерий на основании анализа последовательности гена 16S рРНК

| Род, вид, штамм  | Длина, п.н. | Совпадение, % | GenBank  |
|--|-------------|---------------|----------|
| Бактерии, выделенные из кишечника <i>Nedyopus dawydoffiae</i>                              |             |               |          |
| Актинобактерии   |             |               |          |
| <i>Streptomyces griseoplanus</i> ИНА 01177   | 1485        | 99.2          | MH635265 |
| <i>S. hydrogenans</i> ИНА 01173  | 1116        | 100           | ON231534 |
| <i>S. hydrogenans</i> ИНА 01175  | 1387        | 100           | ON231535 |
| <i>S. pratensis</i> ИНА 01179  | 1436        | 99.4          | MH635263 |
| <i>S. pratensis</i> ИНА 01182  | 1424        | 98.4          | MH635266 |
| <i>S. setonii</i> ИНА 01178  | 1473        | 98.7          | ON231536 |
| <i>S. setonii</i> ИНА 01181  | 1493        | 100           | MH635267 |
| <i>S. spororaveus</i> ИНА 01183  | 1451        | 100           | MH635268 |
| <i>S. turgidiscabies</i> ИНА 01184   | 1309        | 96.5          | —        |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01174  | 551         | 100           | ON231537 |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01176  | 569         | 100           | ON231538 |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01180  | 568         | 99.3          | MH635264 |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01185  | 631         | 100           | ON231539 |
| Бактерии, выделенные из кормового субстрата <i>Nedyopus dawydoffiae</i> (гнилой древесины) |             |               |          |
| Актинобактерии   |             |               |          |
| <i>Kitasatospora saccharophila</i> ИНА 01226   | 1338        | 96.6          | —        |
| <i>Nocardopsis umidischolae</i> ИНА 01230  | 1371        | 100           | ON231540 |
| <i>S. gelaticus</i> ИНА 01231  | 1379        | 94.2          | —        |
| <i>S. gelaticus</i> ИНА 01233  | 1361        | 94.1          | —        |
| <i>S. hydrogenans</i> ИНА 01235  | 1015        | 100           | ON231541 |
| <i>S. olivochromogenes</i> ИНА 01229   | 1376        | 96.0          | —        |
| <i>S. parvulus</i> ИНА 01300   | 1373        | 100           | ON231544 |
| <i>S. scopuliridis</i> ИНА 01227   | 1003        | 95.7          | —        |
| <i>S. scopuliridis</i> ИНА 01232   | 1320        | 96.2          | —        |
| <i>S. seoulensis</i> ИНА 01234   | 985         | 100           | ON231542 |
| <i>S. seoulensis</i> ИНА 01228   | 1026        | 100           | ON231543 |
| Представители других таксономических групп   |             |               |          |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> ИНА 01299   | 1409        | 97.7          | —        |
| Бактерии, выделенные из кишечника <i>Orthomorpha</i> sp.                                   |             |               |          |
| Актинобактерии   |             |               |          |
| <i>Arthrobacter</i> sp. ИНА 01380  | 1257        | 98.3          | ON231545 |
| <i>Micrococcus aloeverae</i> ИНА 01381   | 1260        | 98.8          | ON231546 |
| <i>Micromonospora aurantiaca</i> ИНА 01238   | 1381        | 98.0          | ON231547 |
| <i>Micromonospora tulbaghiae</i> ИНА 01239   | 1350        | 98.4          | ON231548 |
| <i>Mycobacterium hodleri</i> ИНА 01382   | 1269        | 98.3          | ON231549 |
| <i>Plantactinospora mayteni</i> ИНА 01241  | 1412        | 95.2          | —        |
| <i>Saccharopolyspora dendranthemaе</i> ИНА 01240   | 1373        | 98.3          | ON231550 |
| <i>S. coelicoflavus</i> ИНА 01237  | 1372        | 100           | ON231551 |
| <i>S. prunicolor</i> ИНА 01236   | 1391        | 99.3          | ON231552 |

Таблица 1. Окончание

| Род, вид, штамм  | Длина, п.н. | Совпадение, % | GenBank  |
|--|-------------|---------------|----------|
| Представители других таксономических групп   |             |               |          |
| <i>Afipia birgiae</i> ИНА 01383  | 1234        | 99.5          | ON231553 |
| <i>Afipia birgiae</i> ИНА 01384  | 1237        | 100           | ON231554 |
| <i>Blastomonas</i> sp. ИНА 01385   | 1217        | 99.4          | ON231555 |
| <i>Peribacillus simplex</i> ИНА 01386  | 1452        | 98.5          | ON231556 |
| <i>Sphingopyxis panaciterrae</i> ИНА 01387   | 1232        | 96.7          | —        |
| Бактерии, выделенные из кормового субстрата <i>Orthomorpha</i> sp. (листового опада) |             |               |          |
| Актинобактерии   |             |               |          |
| <i>Actinoplanes capillaceus</i> ИНА 01251  | 1406        | 97.1          | —        |
| <i>Agrococcus citreus</i> ИНА 01388  | 1367        | 98.5          | ON231572 |
| <i>Amycolatopsis bullii</i> ИНА 01250  | 1368        | 99.2          | ON231557 |
| <i>Arthrobacter pascens</i> ИНА 01389  | 714         | 98.1          | ON231573 |
| <i>Arthrobacter pascens</i> ИНА 01390  | 641         | 100           | ON231574 |
| <i>Herbiconiux flava</i> ИНА 01391   | 1183        | 96.6          | —        |
| <i>Lechevalieria fradiae</i> ИНА 01246   | 1349        | 95.6          | —        |
| <i>Microbacterium oxydans</i> ИНА 01392  | 1372        | 97.8          | —        |
| <i>Micrococcus aloeverae</i> ИНА 01393   | 1279        | 98.7          | ON231575 |
| <i>Mycobacterium chubuense</i> ИНА 01394   | 779         | 92.5          | —        |
| <i>Nocardiopsis</i> sp. ИНА 01296  | 656         | 93.4          | —        |
| <i>S. albolongus</i> ИНА 01247   | 1370        | 99.0          | ON231558 |
| <i>S. atratus</i> ИНА 01297  | 1292        | 98.7          | ON231559 |
| <i>S. cinereoruber</i> ИНА 01242   | 1360        | 98.0          | ON231560 |
| <i>S. lavendulae</i> ИНА 01243   | 1359        | 98.5          | ON231561 |
| <i>S. microflavus</i> ИНА 01294  | 1383        | 100           | ON231562 |
| <i>S. omiyaensis</i> ИНА 01252   | 1388        | 99.1          | ON231563 |
| <i>S. seoulensis</i> ИНА 01291   | 1374        | 100           | ON231564 |
| <i>S. seoulensis</i> ИНА 01292   | 1415        | 99.5          | ON231565 |
| <i>S. seoulensis</i> ИНА 01295   | 1385        | 99.5          | ON231566 |
| <i>S. termitum</i> ИНА 01244   | 1375        | 99.7          | ON231567 |
| <i>S. termitum</i> ИНА 01245   | 1374        | 99.7          | ON231568 |
| <i>S. zaomyeticus</i> ИНА 01248  | 1373        | 98.9          | ON231569 |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01249  | 1432        | 99.5          | ON231570 |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01293  | 1387        | 100           | ON231571 |
| Представители других таксономических групп   |             |               |          |
| <i>Acinetobacter venetianus</i> ИНА 01395  | 610         | 98.8          | ON231576 |
| <i>Bacillus mycoides</i> ИНА 01396   | 1301        | 99.4          | ON231577 |
| <i>Bacillus toyonensis</i> ИНА 01397   | 1409        | 100           | ON231578 |
| <i>Brucella pseudogrignonensis</i> ИНА 01398   | 1342        | 99.0          | ON231579 |
| <i>Methylobacterium variabile</i> ИНА 01399  | 1244        | 100           | ON231580 |
| <i>Pseudomonas taiwanensis</i> ИНА 01400   | 1400        | 98.5          | ON231581 |
| <i>Stenotrophomonas bentonitica</i> ИНА 01401  | 1411        | 96.6          | —        |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> ИНА 01298   | 1410        | 98.1          | ON231582 |

Примечание. Данные по видовой идентификации актиномицетов на основании анализа последовательности гена 16S рРНК согласуются с морфологическими признаками.

Таблица 2. Спектры антимикробной активности штаммов описываемых бактерий

| Штамм   | Оптимальная среда (сутки)* | Тест-культуры                                 |                            |                                    |                         |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
|---|----------------------------|---|----------------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|--|---|------------------------------------|
|   |                            | <i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA) | <i>St. aureus</i> FDA 209P | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | <i>B. mycolides</i> 537 | <i>B. pumilus</i> NCTC 8241 | <i>Leiconostoc mesenteroides</i> ВКПМ В-4177 (VRLM) | <i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (MDR) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259 | <i>Aspergillus niger</i> ИНА 00760 |
| <b>Бактерии, выделенные из кишечника <i>Nedyopus dawydoffiae</i></b>                              |                            |   |                            |                                    |                         |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| Актинобактерии  |                            |   |                            |                                    |                         |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| <i>Streptomyces griseoplanus</i> ИНА 01177  | Сax (7)                    | -   | -                          | -                                  | -                       | -                           | -   | -                                   | -                                  | -  | -                                       | ++                                 |
| <i>S. hydrogenans</i> ИНА 01173   | Ам (4), 5339 (7)           | +++   | +++                        | +++                                | ++                      | +++                         | ++  | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |
| <i>S. hydrogenans</i> ИНА 01175   | Ам (4)                     | +++   | +++                        | +++                                | +                       | +++                         | +   | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |
| <i>S. pratensis</i> ИНА 01179   | Сax (7), 2663 (7)          | -   | ++                         | ++                                 | ++                      | ++                          | ++  | ++                                  | +                                  | ++   | -                                       | +                                  |
| <i>S. pratensis</i> ИНА 01182   | Сax (4)                    | -   | ++                         | -                                  | -                       | ++                          | -   | ++                                  | -                                  | ++   | -                                       | +                                  |
| <i>S. setonii</i> ИНА 01178   | Сax (7)                    | -   | -                          | -                                  | -                       | ++                          | -   | ++                                  | -                                  | ++   | -                                       | +                                  |
| <i>S. setonii</i> ИНА 01181   | Ам (4), Сax (4)            | -   | -                          | -                                  | -                       | ++                          | -   | ++                                  | -                                  | ++   | -                                       | +                                  |
| <i>S. sporogaeus</i> ИНА 01183  | Ам (4), 5339 (7)           | +++   | +++                        | +++                                | +++                     | +++                         | +++   | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |
| <i>S. turgidiscabies</i> ИНА 01184  | Сax (4)                    | -   | -                          | -                                  | -                       | ++                          | -   | ++                                  | -                                  | ++   | -                                       | +                                  |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01174   | 5339 (4)                   | +++   | +++                        | +++                                | +++                     | +++                         | +++   | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01176   | Сax (7)                    | +++   | +++                        | +++                                | +++                     | +++                         | +++   | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01180   | 330 (7)                    | ++  | +                          | -                                  | -                       | ++                          | -   | ++                                  | +                                  | ++   | +                                       | ++                                 |
| <i>Streptomyces</i> sp. ИНА 01185   | 330 (4), Ам (7)            | -   | -                          | -                                  | -                       | ++                          | -   | ++                                  | +                                  | ++   | +                                       | ++                                 |
| <b>Бактерии, выделенные из кормового субстрата <i>Nedyopus dawydoffiae</i> (гнилая древесина)</b> |                            |   |                            |                                    |                         |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| Актинобактерии  |                            |   |                            |                                    |                         |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| <i>Kitatospora saccharophila</i> ИНА 01226  | А4 (4), 330 (4)            | -   | -                          | -                                  | -                       | ++                          | -   | ++                                  | -                                  | ++   | -                                       | +++                                |
| <i>Nocardopsis umidischolae</i> ИНА 01230   | Ам (7), Сax (7)            | ++  | ++                         | ++                                 | ++                      | ++                          | ++  | ++                                  | +                                  | ++   | +                                       | ++                                 |
| <i>S. gelaticus</i> ИНА 01231   | А4 (7)                     | +++   | +++                        | +++                                | ++                      | +++                         | ++  | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |
| <i>S. gelaticus</i> ИНА 01233   | 6613 (7)                   | ++  | ++                         | ++                                 | ++                      | ++                          | ++  | ++                                  | +                                  | ++   | +                                       | ++                                 |
| <i>S. hydrogenans</i> ИНА 01235   | Ам (4)                     | +++   | +++                        | +++                                | +++                     | +++                         | +++   | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |
| <i>S. olivochromogenes</i> ИНА 01229  | 330 (4), Ам (7)            | +++   | +++                        | +++                                | +++                     | +++                         | +++   | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |
| <i>S. parvulus</i> ИНА 01300  | 330 (4, 7)                 | +++   | +++                        | +++                                | +++                     | +++                         | +++   | +++                                 | +                                  | +++  | +                                       | +++                                |

Таблица 2. Продолжение

| Штамм  | Оптимальная среда (сутки)* | Тест-культуры                                 |                            |                                    |                        |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
|--|----------------------------|---|----------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|--|---|------------------------------------|
|  |                            | <i>Staphylococcus aureus</i> ИНА 00761 (MRSA) | <i>St. aureus</i> FDA 209P | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | <i>B. mycoides</i> 537 | <i>B. pumilus</i> NCTC 8241 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ВКПМ В-4177 (VRLM) | <i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (MDR) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259 | <i>Aspergillus niger</i> ИНА 00760 |
| <i>S. scopuliridis</i> ИНА 01227   | 330 (4), А4 (7)            | +++   | +++                        | +++                                | +++                    | +++                         | +++   | +++                                 | +++                                | +++  | +++                                     | +++                                |
| <i>S. scopuliridis</i> ИНА 01232   | Ам (4), 330 (4, 7)         | ++  | —                          | +++                                | +++                    | +                           | +++   | —                                   | —                                  | +++  | +++                                     | ++                                 |
| <i>S. seouliensis</i> ИНА 01228  | 5339(4), Ам (7)            | +++   | +++                        | +++                                | +++                    | +++                         | +++   | +++                                 | —                                  | +++  | +++                                     | ++                                 |
| <i>S. seouliensis</i> ИНА 01234  | 330 (7), 2663 (7)          | +++   | +++                        | +++                                | +++                    | +++                         | +++   | +++                                 | —                                  | +++  | +++                                     | +++                                |
| <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> ИНА 01299                                       | А4 (4), Ам (7)             | —   | —                          | —                                  | ++                     | —                           | +++   | —                                   | —                                  | —  | —                                       | +                                  |
| Представители других таксономических групп   |                            |   |                            |                                    |                        |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| Бактерии, выделенные из кишечника <i>Orthomorpha</i> sp.                           |                            |   |                            |                                    |                        |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| Актинобактерии   |                            |   |                            |                                    |                        |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| <i>Microtonospora aurantiaca</i> ИНА 01238   | Ам (4)                     | +++   | +++                        | +++                                | +++                    | +++                         | +++   | +++                                 | +++                                | +++  | +++                                     | —                                  |
| <i>Microtonospora tulbaghiae</i> ИНА 01239   | Ам (4)                     | +++   | +++                        | +++                                | +++                    | +++                         | +++   | +++                                 | +++                                | +++  | +++                                     | —                                  |
| <i>Saccharopolyspora dendranthemaе</i> ИНА 01240                                   | Ам (4), Сах (4)            | —   | —                          | —                                  | —                      | —                           | —   | —                                   | —                                  | —  | —                                       | +                                  |
| <i>S. coelicoflavus</i> ИНА 01237  | 330 (4, 7)                 | —   | —                          | +++                                | +++                    | +++                         | +++   | +++                                 | —                                  | —  | —                                       | +                                  |
| <i>S. prunicolor</i> ИНА 01236   | 330 (4, 7)                 | +++   | +++                        | +++                                | +++                    | +++                         | +++   | +++                                 | +++                                | +++  | +++                                     | —                                  |
| Представители других таксономических групп   |                            |   |                            |                                    |                        |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| <i>Peribacillus simplex</i> ИНА 01386  | СТР (4)                    | +++   | —                          | —                                  | —                      | —                           | —   | —                                   | —                                  | —  | —                                       | —                                  |
| Бактерии, выделенные из кормового субстрата <i>Orthomorpha</i> sp. (листовой опад) |                            |   |                            |                                    |                        |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| Актинобактерии   |                            |   |                            |                                    |                        |                             |   |                                     |                                    |  |   |                                    |
| <i>Actinoplanes capillaceus</i> ИНА 01251  | А4 (4), Ам (7)             | —   | —                          | —                                  | —                      | —                           | —   | —                                   | —                                  | —  | —                                       | +++                                |
| <i>Amycolatopsis bullii</i> ИНА 01250  | Ам (7)                     | +++   | +++                        | +++                                | +++                    | +++                         | +++   | +++                                 | +++                                | +++  | +++                                     | —                                  |
| <i>Arthrobacter pascens</i> ИНА 01389  | СТР (4)                    | —   | —                          | —                                  | —                      | —                           | —   | —                                   | —                                  | —  | —                                       | —                                  |
| <i>Lechevalieria fradiae</i> ИНА 01246   | 5339 (4), 330 (7)          | —   | —                          | +++                                | +++                    | —                           | —   | —                                   | —                                  | —  | —                                       | +++                                |



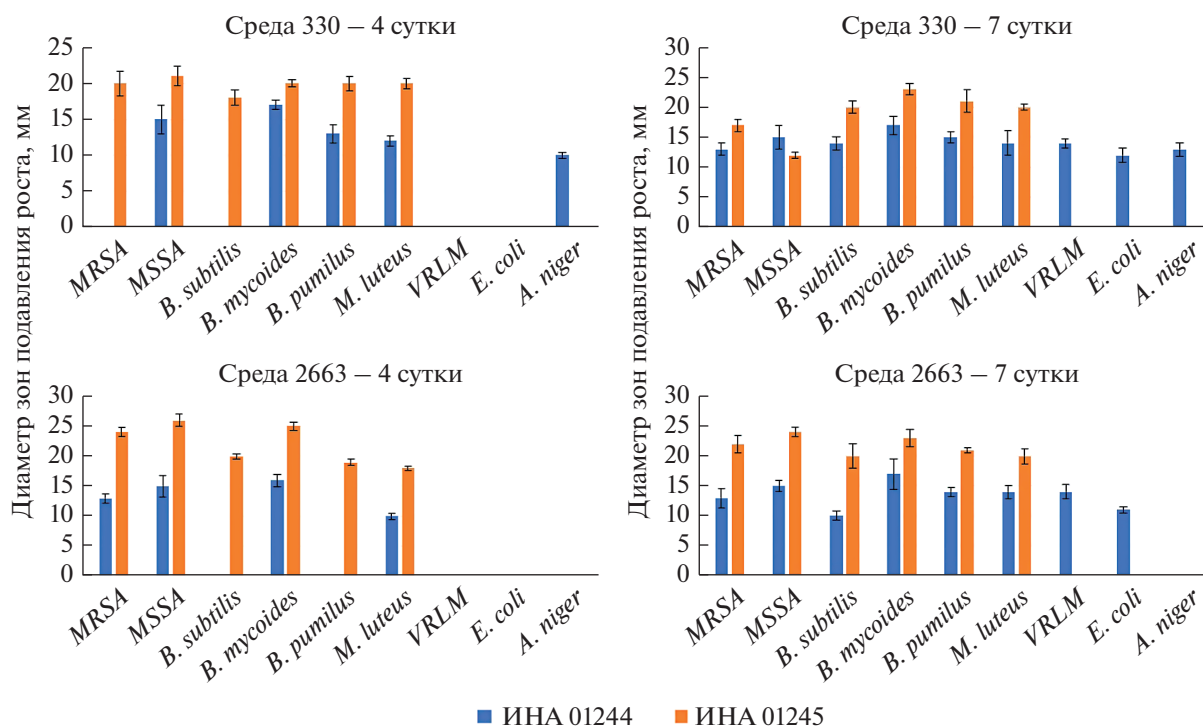


Рис. 3. Гистограммы спектров антибиотической активности штаммов *S. termitum* на средах 330 и 2663 на 4 и 7 сут культивирования.

При определении антимикробных спектров выявленных продуцентов, особое внимание нами было уделено тест-штаммам *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *E. coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, которые относятся к видам, входящим в списки ВОЗ по проблеме антибиотикорезистентности (O'Neill, 2016; Tassone, 2017; Ефименко, 2019). В данной работе среди выявленных штаммов “редких” родов актинобактерий обнаружены продуценты антибиотиков, активных в отношении отмеченных выше тест-штаммов, и при этом с ранее не описанной антимикробной активностью. К примеру, вид *Kitasatospora saccharophila* описан как новый в 2009 г. (Li et al., 2009). Однако анализ литературы не показал наличия описанных для данного вида антибиотиков. В нашем исследовании штамм *Kitasatospora saccharophila* ИНА 01226 образует антимикробные вещества, активные в отношении *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 (VRLM), *Micrococcus luteus* NCTC 8340 и гриба *Aspergillus niger* ИНА 00760. Известно, что вид *Nocardiopsis umidischolae* выделен впервые в 2001 г. из пыли в помещении школы, пострадавшей от затопления, и описан типовым штамм *Nocardiopsis umidischolae* 66/93 (=DSM 44362 = NRRL В-24122) (Peltola et al., 2001). Антибиотиков, образуемых у данного вида, по анализу литературы не было выявлено. Штамм *Nocardiopsis umidischolae* ИНА 01230, выделенный нами из гнилой древесины – кормового субстрата *Nedyo-*

*pus dawydoffiae*, обладает активностью в отношении всех используемых в исследовании грамположительных тест-бактерий, включая метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), и в отношении дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259. Таким образом, для штаммов *Kitasatospora saccharophila* ИНА 01226 и *Nocardiopsis umidischolae* ИНА 01230 впервые описано наличие антимикробной активности, в том числе в отношении резистентных форм патогенных микроорганизмов.

Род *Micromonospora* является вторым после *Streptomyces* наиболее часто выделяемыми из природы богатым источником для изыскания продуцентов антибиотиков (Wagman, Weinstein, 1980). Для представителей рода *Micromonospora* первые сообщения об антибактериальной активности появились в 1942 г., а в 1963 г. был описан аминогликозид гентамицин, выделенный из *Micromonospora purpurea* (вид переклассифицирован в *Micromonospora echinospora* Luedemann, Brodsky, 1964), что далее привело к широкому скринингу данного “редкого” рода актинобактерий на наличие антибиотиков (Wagman, Weinstein, 1980). В 2019 г. из ферментационного бульона штамма *Micromonospora aurantiaca* 110В были выделены и идентифицированы три новых изофлавоноидных гликозида, дайдзеин-4'-(2-дезоксид- $\alpha$ -1-фукопиранозид), дайдзеин-7-(2-дезоксид- $\alpha$ -1-фукопиранозид) и дайдзеин-4',7-ди-(2-дезоксид- $\alpha$ -1-фукопиранозид). Установлено, что три соединения



проявляют цитотоксическую активность, но при этом не обладают активностью в отношении *Candida albicans*, MRSA и *E. coli* (Wang et al., 2019). В 2020 г. был получен полный геном *M. aurantiaca* sp. 01, который по анализу гена 16S рРНК имел совпадение с типовым штаммом *M. aurantiaca* ATCC 27029<sup>T</sup> – 99.28%. Анализ нуклеотидных последовательностей выявил у штамма *M. aurantiaca* sp. 01 в геноме 77 кластеров генов, связанных с биосинтезом вторичных метаболитов. Было предсказано, что они участвуют в выработке поликетидов, нерибосомальных пептидов, бактериоцинов и многих других соединений. Среди них 42 кластера генов были аннотированы к 37 известным вторичным метаболитам, включая антибиотики. Из антибиотиков, предсказанных по анализу генома, с помощью направленного MS/MS анализа был обнаружен канамицин, впервые полученный из штамма *M. aurantiaca*. При этом организация кластеров генов для биосинтеза вторичных метаболитов выявила 21 кластер, кодирующий выработку антибиотиков, что выше, чем у других видов *Micromonospora* (Hu et al., 2020). В нашем исследовании штамм *Micromonospora aurantiaca* ИНА 01238, выделенный из кишечника *Orthomorpha* sp., обладает высокой активностью в отношении всех грамположительных тест-бактерий, включая MRSA, и в отношении дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259. Таким образом, антибиотическая активность выделенного штамма отличается от описания активности у выделенных антибиотиков для данного вида, и планируется дальнейшее изучение химической природы антибиотика(ов).

Вид *Micromonospora tulbaghia* впервые описан в 2010 г., типовой штамм TVU1<sup>T</sup> (=DSM 45142<sup>T</sup> = NRRL B-24576<sup>T</sup>) был выделен из листьев дикого чеснока (*Tulbaghia violacea*). Для данного штамма описана умеренная активность в отношении штамма *Mycobacterium aurum* A+ и отсутствие активности в отношении *Enterococcus faecium* (VanA), *E. coli* ATCC 25922, и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Kirby, Meyers, 2010). Нами описана активность штамма *Micromonospora tulbaghia* ИНА 01239 в отношении всех грамположительных тест-бактерий, включая метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), и в отношении дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259, что отличается от вышеописанной активности.

В 2000 г. Fukami и соавт. описали антибиотик, выделенный из *Actinoplanes capillaceus* и активный в отношении *B. subtilis*, *S. cerevisiae* и *E. coli* (Fukami et al., 2000). Антимикробный спектр выделенного нами штамма *A. capillaceus* ИНА 01251 отличается от описанного и обладает активностью в отношении *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 (VRLM) и *Aspergillus niger* ИНА 00760. Соответственно, штамм ИНА 01251 можно рассматривать

как перспективный в плане химического изучения образуемого соединения.

Для двух видов “редких” родов актинобактерий *Amycolatopsis bullii* и *Saccharopolyspora dendranthema*, описанных в последнее десятилетие, информация об образовании антибиотиков отсутствует (Zucchi et al., 2012; Zhang et al., 2013). В данной работе показано, что штамм *Amycolatopsis bullii* ИНА 01250 обладает высокой антибиотической активностью в отношении всех тестируемых грамположительных бактерий и в отношении *S. cerevisiae* RIA 259, а штамм *Saccharopolyspora dendranthema* ИНА 01240 проявляет активность в отношении *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177, обладающего природной устойчивостью к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина, и в отношении *S. cerevisiae* RIA 259.

Среди прокариот других таксономических групп наиболее известными продуцентами являются представители класса *Bacilli* (Bérduy, 2005). В нашем исследовании наиболее перспективными продуцентами являются штаммы *Peribacillus simplex* ИНА 01386 и *Bacillus toyonensis* ИНА 01397, активные в отношении MRSA. Несмотря на то, что *Bacilli* являются хорошо изученным источником продуцентов антибиотиков, описание новых антимикробных веществ продолжают (Wang et al., 2020a, 2020b). Два штамма *Stenotrophomonas rhizophila* (ИНА 01299 и ИНА 01298) выделены из листового опада и гнилой древесины. Эти штаммы отличаются по антимикробной активности: штамм ИНА 01298 обладает активностью в отношении MSSA, а штамм ИНА 01299 активен в отношении VRLM и проявляет незначительную активность в отношении *Aspergillus niger* ИНА 00760. Ранее нами было показано, что *Stenotrophomonas rhizophila* ИНА 01137 – эндобионт базидиального гриба *Coprinellus micaceus*, активен в отношении штаммов золотистого стафилококка и кишечной палочки, а также в отношении *Aspergillus niger* ИНА 00760 (Ефименко и соавт., 2016). По данным литературы было установлено, что *Stenotrophomonas rhizophila* образует активные вещества в отношении ряда фитопатогенных грибов и патогена человека *Candida albicans* (Wolf et al., 2002).

Бактерии, выделенные из кишечника многоножек, а также из их пищевых субстратов, отличаются как большим видовым разнообразием, так и по спектрам антибиотической активности. Среди выделенных штаммов преобладают актинобактерии, относящиеся не только к роду *Streptomyces*, но и к 14 другим родам класса актинобактерий (*Actinoplanes*, *Agrococcus*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Herbiconiux*, *Kitasatospora*, *Lechevalieria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *No-cardiopsis*, *Plantactinospora*, *Saccharopolyspora*). Среди них есть виды, у которых ранее не были описаны антибиотические вещества или которые отли-

чаются по антимикробному спектру. Впервые описано наличие антимикробной активности, в том числе в отношении антибиотикорезистентных форм патогенных микроорганизмов, для видов *Amycolatopsis bullii*, *Kitasatospora saccharophila*, *Nocardiosis umidischolae* и *Saccharopolyspora dendranthemaе*. Для двух видов рода *Micromonospora* (*Micromonospora aurantiaca* и *M. tulbaghiaе*) впервые описана антимикробная активность в отношении метициллинрезистентного штамма *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), а для вида *Actinoplanes capillaceus* – в отношении ванкомицинрезистентного штамма *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 (VRLM). Активность в отношении антибиотикорезистентных тест-культур метициллинрезистентного штамма *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA) и ванкомицинрезистентного штамма *L. mesenteroides* ВКПМ В-4177 (VRLM) делает ряд штаммов перспективными для выделения антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость.

Высокое число штаммов с антимикробной активностью, выделенных из кишечника многоножек, не уступает по численности активным штаммам, выделенным из разрушающихся растительных остатков, и, по-видимому, не связано с влиянием кишечной среды. Предположительно это обусловлено климатическими условиями среды обитания (Дещеревская и соавт., 2013; Чернов и соавт., 2019). В предшествующих исследованиях показано, что число копий рибосомальных генов в образцах тропических почв под слабонарушенными муссонными лесами заповедника Кат Тьен характеризуются высокой численностью микроорганизмов, сравнимой с наиболее богатыми почвами умеренных широт, например, черноземами (Setenov et al., 2018; Чернов и соавт., 2019). Обилие микроорганизмов способствует их острой конкуренции, в которой биосинтез антибиотиков является важным эволюционным приспособлением (Gause, 1934).

Богатое видовое разнообразие актинобактерий из кишечника тропических диплопод и их кормовых субстратов, а также проявленная ими высокая антибиотическая активность, дают основания для дальнейшего исследования бактерий из данной природной экосистемы. Выделенные и отобранные актинобактерии подлежат дальнейшему химическому изучению как возможные продуценты новых антибиотиков.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ирине Игоревне Семенюк за сбор многоножек.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа А.В. Якушева в части выделения мицелиальных актинобактерий выполнена в рамках темы государ-

ственного задания “Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”, № 121040800174-6 и в части выделения одноклеточных бактерий при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 075-15-2021-1396.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беркли Р., Бок Э., Бун Д., Бреннер Д., Васильева Л.В., Видель Ф., Грант У., Гудфеллоу М., Джоунз Д., Заварзин Г.А., Камминз С., Кастенхольц Р., Кенен Дж., Кениг Г., Коулман Г., Кросс Т., Купс Г.-П., Ларкин Дж., Лешевалье Х., Лоцци Р., Маккарти А., Мэстроухан Г., Пфенниг Н., Рейхенбах Г., Робертсон Л., Стеттер К. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. М.: Мир, 1997. 800 с.
- Бызов Б.А., Зенова Г.М., Бабкина Н.И., Добровольская Т.Г., Третьякова Е.Б., Звягинцев Д.Г. Актиномицеты в пище, кишечнике и экскрементах почвенных многоножек *Rahyulis flavipes* С.Л. Koch. // Микробиология. 1993. Т. 62. С. 916–927.
- Бызов Б.А. Зоомикробные взаимодействия в почве. М.: ГЕОС, 2005. 214 с.
- Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешикова М.Л., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 244 с.
- Дещеревская О.А., Авиллов В.К., Динь Б.З., Чан К.Х., Курбатова Ю.А. Современный климат национального парка Кат Тьен (Южный Вьетнам): использование климатических данных для экологических исследований // Геофизические процессы и биосфера. 2013. Т. 12. № 2. С. 5–33.
- Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Васильева Б.Ф., Глухова А.А., Сумарукова И.Г., Бойкова Ю.В., Малкина Н.Д., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Антибиотическая активность бактерий – эндобионтов плодовых тел базидиальных грибов // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 740–747.
- Efimenko T.A., Malanicheva I.A., Vasil'eva B.F., Glukhova A.A., Sumarukova I.G., Boikova Y.V., Malkina N.D., Terekhova L.P., Efremenkova O.V. Antibiotic activity of bacterial endobionts of basidiomycete fruit bodies // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 752–758.
- Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий // Антибиотики и химиотерапия. 2019. Т. 64. № 5–6. С. 64–68.
- Efimenko T.A., Terekhova L.P., Efremenkova O.V. Current state the problem of antibiotic resistance of pathogens //

- Antibiot. Chemother. 2019. V. 64. № 5–6. P. 64–68. (In Russ.)
- Звягинцев Д.Г., Полянская Л.М., Зенова Г.М., Бабкина Н.И. Динамика длины актиномицетного мицелия и численности прокариотных клеток в кишечном тракте беспозвоночных животных // Микробиология. 1996. Т. 65. С. 269–276.
- Zvyagintsev D.G., Polyanskaya L.M., Zenova G.M., Babkina N.I. Dynamics of the length of actinomycete mycelium and prokaryotic cell number in the invertebrate intestinal tract // Microbiology (Moscow). 1996. V. 65. P. 238–245.
- Полянская Л.М., Бабкина Н.И., Зенова Г.М., Звягинцев Д.Г. Судьба актиномицетов в кишечном тракте почвенных беспозвоночных животных, поедающих споры стрептомицетов // Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 493–498.
- Polyanskaya L.M., Babkina N.I., Zenova G.M., Zvyagintsev D.G. Fate of actinomycetes in the intestinal tract of soil invertebrates fed on streptomycete spores // Microbiology (Moscow). 1996. V. 65. P. 493–498.
- Чернов Т.И., Железова А.Д., Тхакыхова А.К., Бгажба Н.А., Зверев А.О. Микробиомы целинных почв тропических лесов Южного Вьетнама // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 479–489.
- Chernov T.I., Zhelezova A.D., Tkhakakhova A.K., Bgazhba N.A., Zverev A.O. Microbiomes of virgin soils of Southern Vietnam tropical forests // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 489–498.
- Bérdy J. Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. 2005. V. 58. P. 1–26.
- Donadio S., Brandi L., Monciardini P., Sosio M., Gualerzi C.O. Novel assays and novel strains – promising routes to new antibiotics? // Expert Opin. Drug Discov. 2007. V. 2. P. 789–798.
- Efimenko T.A., Glukhova A.A., Demiankova M.V., Boykova Y.V., Malkina N.D., Sumarukova I.G., Vasilieva B.F., Rogozhin E.A., Ivanov I.A., Krassilnikov V.A., Efremenkova O.V. Antimicrobial activity of microorganisms isolated from ant nests of *Lasius niger* // Life. 2020. V. 10. P. 91.
- Fukami A., Nakamura T., Kawaguchi K., Rho M.C., Matsumoto A., Takahashi Y., Shiomi K., Hayashi M., Komiyama K., Omura S. A new antimicrobial antibiotic from *Actinoplanes capillaceus* sp. K95-5561T // J. Antibiot. (Tokyo). 2000. V. 53. P. 1212–1214.
- Gause G.F. The Struggle for Existence. Baltimore, 1934. 163 p.
- Glukhova A.A., Karabanova A.A., Yakushev A.V., Semenyuk I.I., Boykova Yu.V., Malkina N.D., Efimenko T.A., Ivankova T.D., Terekhova L.P., Efremenkova O.V. Antibiotic activity of Actinobacteria from the digestive tract of millipede *Nedyopus dawydoffiae* (Diplopoda) // Antibiotics (Basel). 2018. V. 7. № 4. P. 94.
- Hu D., Sun C., Jin T., Fan G., Mok K.M., Li K., Lee S.M. Exploring the potential of antibiotic production from rare Actinobacteria by whole-genome sequencing and guided MS/MS analysis // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 1540.
- O'Neill J. The review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016. Available online: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- Kaltenpoth M. Actinobacteria as mutualists: general health-care for insects? // Trends Microbiol. 2009. V. 17. P. 529–535.
- Kirby B.M., Meyers P.R. *Micromonospora tulbaghiae* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 1328–1333.
- Knapp B.A., Seeber J., Rief A., Meyer E., Insam H. Bacterial community composition of the gut microbiota of *Cylindroiulus fulviceps* (Diplopoda) as revealed by molecular fingerprinting and cloning // Folia Microbiol. 2010. V. 55. P. 489–496.
- König H., Varma A. (Eds.) Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. 484 p.
- Li B., Furihata K., Kudo T., Yokota A. *Kitasatospora saccharophila* sp. nov. and *Kitasatospora kazusanensis* sp. nov., isolated from soil and transfer of *Streptomyces atroaurantiacus* to the genus *Kitasatospora* as *Kitasatospora atroaurantiaca* comb. nov. // J. Gen. Appl. Microbiol. 2009. V. 55. P. 19–26.
- Peltola J.S., Andersson M.A., Kämpfer P., Auling G., Kropfenstedt R.M., Busse H.J., Salkinoja-Salonen M.S., Rainey F.A. Isolation of toxigenic *Nocardioopsis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardioopsis* species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischolae* sp. nov. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4293–4304.
- Raja A., Prabakarana P. Actinomycetes and drug-an overview // Am. J. Drug Discov. Dev. 2001. V. 1. P. 75–84.
- Semenov M.V., Chernov T.I., Tkhakakhova A.K., Zhelezova A.D., Ivanova E.A., Kolganova T.V., Kutovaya O.V. Distribution of prokaryotic communities throughout the Chernozem profiles under different land uses for over a century // Appl. Soil Ecol. 2018. V. 127. P. 8–18.
- Szabo I.M., Nasser El-G. A., Striganova B., Rakhmo Y.R., Jager K., Heydrich M. Interactions among Millipedes (*Diplopoda*) and their Intestinal Bacteria // Berichte des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck, 1990. S. 10. P. 289–296.
- Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Oueltte M., Outtersson K., Patel J., Cavalieri M., Cox E.M., Houchens C.R., Grayson M.L., Hansen P., Singh N., Theuretzbacher U., Magrini N. WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis // Lancet Infect. Dis. 2018. V. 18. P. 318–327.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chaier K.F., van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2007. V. 71. P. 495–548.
- Wagman G.H., Weinstein M.J. Antibiotic from *Micromonospora* // Annu. Rev. Microbiol. 1980. V. 34. P. 537–557.
- Wang R.J., Zhang S.Y., Ye Y.H., Yu Z., Qi H., Zhang H., Xue Z.L., Wang J.D., Wu M. Three new isoflavonoid glycosides from the mangrove-derived actinomycete *Micromonospora aurantiaca* 110B // Mar. Drugs. 2019. V. 17. Art. 294.

Wang W., Park K.H., Lee J., Oh E., Park C., Kang E., Lee J., Kang H. A new thiopeptide antibiotic, micrococcin p3, from a marine-derived strain of the bacterium *Bacillus stratosphericus* // *Molecules* (Basel, Switzerland). 2020. V. 25. Art. 4383.

Wang T., Lu Q., Sun C., Lukianov D., Osterman I.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A., Hu X., You X., Liu S., Wu G. Hetiamacin E and F, new amicoumacin antibiotics from *Bacillus subtilis* PJS using MS/MS-based molecular networking // *Molecules*. 2020. V. 25. Art. 4446.

Wolf A., Fritze A., Hagemann M., Berg G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with

antifungal properties // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 1937–1944.

Zhang Y.J., Zhang W.D., Qin S., Bian G.K., Xing K., Li Y.F., Cao C.L., Jiang J.H. *Saccharopolyspora dendranthema* sp. nov., a halotolerant endophytic actinomycete isolated from a coastal salt marsh plant in Jiangsu, China // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P. 1369–1376.

Zucchi T.D., Bonda A.N., Frank S., Kim B.Y., Kshetrimayum J.D., Goodfellow M. *Amycolatopsis bartoniae* sp. nov. and *Amycolatopsis bullii* sp. nov., mesophilic actinomycetes isolated from arid Australian soils // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012. V. 102. P. 91–98.

## Antimicrobial Activity of Bacteria Isolated from the Millipedes *Nedyopus dawydoffiae* and *Orthomorpha* sp.

T. A. Efimenko<sup>1</sup> \*, A. V. Yakushev<sup>2</sup>, A. A. Karabanova<sup>1</sup>, A. A. Glukhova<sup>1</sup>, M. V. Demiankova<sup>1</sup>, B. F. Vasilieva<sup>1</sup>, Y. V. Boykova<sup>1</sup>, N. D. Malkina<sup>1</sup>, L. P. Terekhova<sup>1</sup>, and O. V. Efremenkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

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

\*e-mail: efimen@inbox.ru

Received April 18, 2022; revised June 15, 2022; accepted June 20, 2022

**Abstract**—From the intestines of millipedes of the species *Nedyopus dawydoffiae* and *Orthomorpha* sp. (class *Diplopoda*) and from their food substrates (plant residues), 72 bacterial strains belonging to 25 genera were isolated and identified. Among the studied strains, actinobacteria predominated, among which streptomycetes were the most numerous, although representatives of 14 other genera of actinobacteria were also present. High abundance of actinobacteria with antimicrobial activity was noted, including members of the “rare” genera *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Kitasatospora*, *Lechevalieria*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, and *Saccharopolyspora*. This is the first report on antimicrobial activity in *Kitasatospora saccharophila* INA 01226 and *Nocardiopsis umidischolae* INA 01230. Heterogeneity in terms of antibiotic formation in the populations of *Streptomyces pratensis* and *S. termitum* was shown. The most promising bacterial strains chosen for the chemical study of antibiotics formed exhibited activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* INA 00761 (MRSA) and vancomycin-resistant strain *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-4177 (VRLM).

**Keywords:** bacteria, actinobacteria, streptomycetes, “rare” genera, *Diplopoda*, *Nedyopus dawydoffiae*, *Orthomorpha* sp., endobionts, antibiotic producers, antibiotic resistance

ВЛИЯНИЕ ФТОРИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СУРЬМЫ НА ПОЧВЕННУЮ  
МИКРОФЛОРУ И МЕТОДЫ ИХ ДЕТОКСИКАЦИИ© 2022 г. И. В. Киселева<sup>а, \*</sup>, А. Н. Холомейдик<sup>б</sup>, Л. Н. Шапова<sup>а</sup>, А. Е. Панасенко<sup>б</sup><sup>а</sup>Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты  
Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия<sup>б</sup>Институт химии ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

\*e-mail: kiseleva-iv@inbox.ru

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 28.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Установлено токсическое действие  $SbF_3$  и  $NaSbF_4$  в концентрации 50 и 100 мг/л на почвенную микрофлору. При внесении 50 мг/л в питательную среду (МПА) единично обнаруживались бактерии и микроскопические грибы. Дозировка 100 мг/л полностью подавляла рост бактерий в исследованных почвах. Микроскопические грибы более устойчивы к действию исследованных соединений. При добавлении 0.1 М раствора  $NaH_2PO_4$  к растворам  $SbF_3$  и  $NaSbF_4$  наблюдалось уменьшение концентрации растворенных ионов  $Sb^{3+}$  в 5.7–6.9 раз, но на численность почвенных микроорганизмов такой раствор по-прежнему оказывал токсическое действие. Показано, что в отличие от реагентной очистки, метод сорбционного извлечения  $Sb(III)$  был более эффективен. Водные растворы с концентрацией сурьмы 5000 мг/л, использованные для разведения почвенной суспензии, губительно воздействовали на весь спектр микроорганизмов, развивающихся на среде МПА. После сорбционной очистки концентрация сурьмы снижалась до 201.3 мг/л, отмечался рост микроорганизмов.

**Ключевые слова:** почва, бактерии, сурьма, тяжелые металлы, токсичность, сорбция, экстракция**DOI:** 10.31857/S0026365621100724

В настоящее время проблема загрязнения окружающей среды различными тяжелыми металлами стоит остро в различных регионах. При этом основным источником загрязнения являются месторождения, при разработке которых металлы попадают в окружающую среду и мигрируют, главным образом, с водными потоками, представляя опасность для микроорганизмов, растений, животных и человека. За счет способности большинства тяжелых металлов образовывать нерастворимые соли и оксиды, их накопление происходит преимущественно в почве. Одним из металлов, обладающих токсическим действием по отношению к различным типам живых организмов, является сурьма. Этому элементу уделяется мало внимания в работах почвоведов, доля упоминания  $Sb$  в публикациях составляла всего 0.9% (Водяницкий, 2012).

В КНР, в провинции Хунань, где расположено одно из крупнейших в мире месторождений сурьмы Сигуаньшань (Xiguangshan), в результате его разработки наблюдается масштабное загрязнение почвы и грунтовых вод сурьмой (Wang, 2011; Fu, 2016). В России в Приморском крае в XX в. активно разрабатывались месторождения угля, содер-

жащего в виде примеси сурьму. В настоящее время в Партизанском и Надеждинском районах Приморского края обнаружено загрязнение сурьмой шахтных вод, которые имеют контакт с грунтовыми водами и выходят в реки, использующиеся для водоснабжения нескольких городов и поселков.

Известно, что соединения сурьмы обладают, в зависимости от природы вещества и его концентрации, либо токсическим, либо стимулирующим действием по отношению к морским и патогенным микроорганизмам, клеточным культурам, растениям и животным (Ковалева, Земнухова, 2019). Таким образом, почвенная микрофлора может служить индикатором загрязненности почв поллютантами, в частности, сурьмой. Согласно общесанитарному показателю (влияние на самоочищающую способность почв и почвенный микробиоценоз) ПДК сурьмы в почве составляет 50 мг/кг (МУ 2.1.7.730-99, 1999).

Цель работы – оценить токсическое действие сурьмы(III) на микроорганизмы, выделенные из почв Приморского края, установить диапазон токсичности и найти физико-химические методы снижения концентрации  $Sb(III)$  до приемлемого уровня.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При проведении исследований использовались образцы бурозема типичного (*Haplic Cambisol*), отобранные в районе Академгородка под дубовым лесом и серогумусовой техногенной почвы (*Folic Technosol*) взятые на территории бывшего военного аэродрома в районе ст. Седанка под разнотравьем (Приморский край, г. Владивосток).

Отбор почвенных образцов проводился в начале ноября 2020 г. из верхнего (0–10 см) горизонта в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 (2008). Названия почв приведены согласно российской (Шишов и соавт., 2004) и международной классификации (IUSS Working Group WRB..., 2014). Для почвы, формирующейся на территории заброшенного аэродрома, использована классификация, предложенная Прокофьевой и соавт. (2014).

Определение органического углерода проведено мокрым сжиганием по Тюрину, рН вод – потенциметрически (Аринушкина, 1970). Общую численность почвенной аммонифицирующей микрофлоры учитывали методом высева почвенной суспензии различной степени разведения на среду, содержащую мясо-пептонный агар (МПА). Эту среду применяют для выделения широкого спектра почвенных микроорганизмов (Методы почвенной микробиологии..., 1991).

В работе было исследовано влияние различных концентраций сурьмы: 1, 10, 50 и 100 мг/л при добавлении в питательную среду, а так же 5000 и 201.3 мг/л при разведении почвенной суспензии. В качестве модельных соединений были использованы растворимые соединения, способные к миграции в природных средах – фторид сурьмы ( $SbF_3$ ) и комплексное соединение тетрафтороантимонат натрия ( $NaSbF_4$ ). В качестве контрольного варианта использована среда МПА без внесения соединений сурьмы.

Для реагентной очистки растворов  $SbF_3$  и  $NaSbF_4$  использовали 0.1 М раствор дигидрофосфата натрия ( $NaH_2PO_4$ ) в стехиометрическом количестве.

В качестве сорбентов исследовали кремнийсодержащие материалы различного состава. Используя в качестве источника кремния биогенное сырье – шелуху риса, путем пиролиза в бескислородных условиях был получен углеродсодержащий материал (образец 1) и окислительным обжигом – высокочистый биогенный аморфный кремнезем (образец 2) (Земнухова, 2005). На основе соломы риса был получен алюмосиликат натрия (образец 3), проявляющий высокие сорбционные свойства по отношению к органическим красителям (Панасенко, 2019). С использованием биогенного кремнезема из шелухи риса был получен композиционный железосодержащий материал (образец 4) (Панасенко, 2017). Для оценки воз-

можности извлечения соединений сурьмы исследуемыми образцами были построены кривые извлечения ионов  $Sb^{3+}$  из водных растворов  $SbF_3$  с концентрацией металла 20–800 мг/л в статических условиях. Концентрацию сурьмы в растворах определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре SOLAAR M6 (“Thermo”, США).

Статистическая обработка результатов анализа проведена в программе Statistica.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность микроорганизмов в почве зависит от времени года, содержания органического вещества, плотности сложения почв, кислотности, влажности, температуры и других факторов. Исследованные почвы формируются в разных условиях. Для бурозема типичного характерны слабокислая реакция среды (рН вод 5.5) и высокое содержание органического углерода (8.0%). Серогумусовой почве свойственна нейтральная реакция среды (рН вод 6.7) и низкое содержание  $C_{орг}$  (3.9%). Влажность исследованных почв составляла 23–26%.

Все это обуславливает изначально различное количество микроорганизмов (млн КОЕ на 1 г почвы) в контрольных вариантах исследованных почв:  $3.9 \pm 0.21$  в буроземе и  $10.1 \pm 1.1$  в серогумусовой почве. Для бурозема типичного отмечен рост грибов (до 32% от общего числа микроорганизмов на среде МПА).

Выявлена небольшая разница между численностью микроорганизмов в контроле и при внесении 1 и 10 мг/л  $SbF_3$  и  $NaSbF_4$ . Однако эта разница находится в пределах ошибки.

Токсическое действие обоих соединений для двух типов почв обнаружено при концентрации 50 и 100 мг/л (рис. 1). При внесении 50 мг/л в посевах единично обнаруживаются бактерии и микроскопические грибы. Дозировка 100 мг/л полностью подавляет рост бактерий в исследованных почвах, развиваются только грибы, но их численность незначительна.

Аммонифицирующим микроорганизмам принадлежит ведущая роль в разложении содержащих азот сложных соединений. Резкое сокращение их численности может привести к серьезным экологическим последствиям. Важнейшим почвенно-микробиологическим процессом, определяющим наличие и содержание гумуса в почве, является деструкция растительного опада. В связи с этим, при попадании сурьмы в почву, может происходить снижение ее плодородия.

Известен реагентный способ очистки техногенных и природных вод, при котором воду обрабатывают растворами веществ, которые разрушают поллютанты, либо связывают их в неактивные формы.

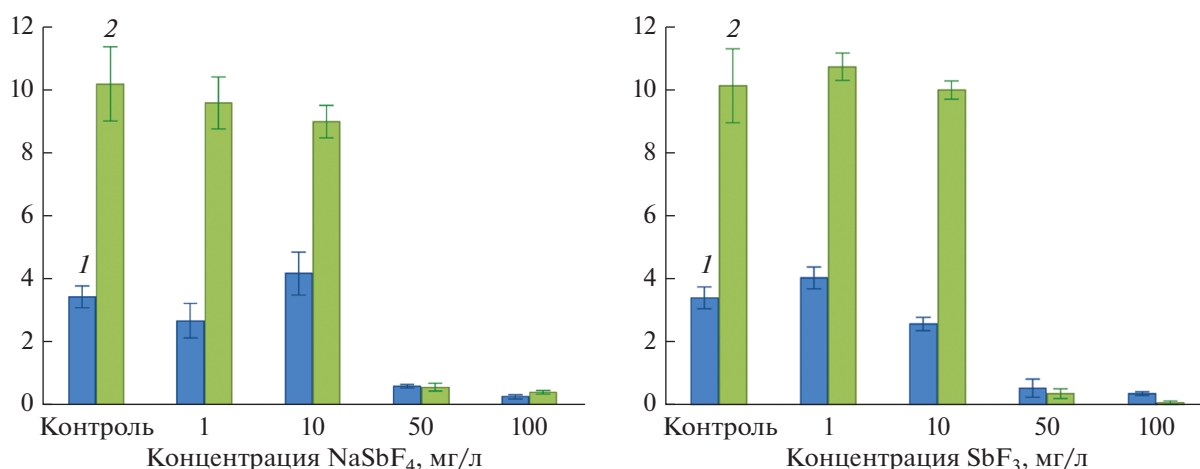


Рис. 1. Численность микроорганизмов (млн КОЕ) в зависимости от концентрации соединений Sb(III): 1 – бурозем типичный (*Haplic Cambisol*); 2 – серогумусовая техногенная почва (*Folic Technosol*).

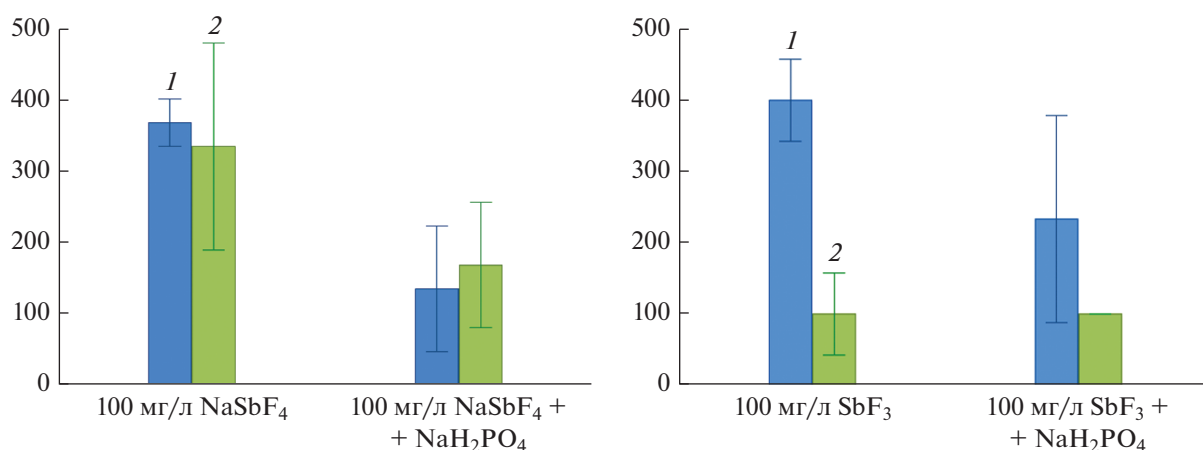


Рис. 2. Численность микроорганизмов (тыс. КОЕ) при концентрации соединений Sb(III) 100 мг/л и с внесением дигидрофосфата натрия: 1 – бурозем типичный (*Haplic Cambisol*); 2 – серогумусовая техногенная почва (*Folic Technosol*).

В случае сурьмы одним из способов перевести растворенные ионы  $Sb^{3+}$  в форму нерастворимого осадка является взаимодействие с фосфат-ионами  $PO_4^{3-}$ , поскольку фосфат сурьмы  $SbPO_4$  – нерастворимое соединение (Bolan, 2022). При добавлении 0.1 М раствора дигидрофосфата натрия  $NaH_2PO_4$  к растворам  $SbF_3$  и  $NaSbF_4$  наблюдается опалесценция, что свидетельствует об образовании частиц  $SbPO_4$  коллоидных размеров ( $10^{-7}$ – $10^{-9}$  м). По данным атомно-абсорбционной спектрометрии концентрация растворенных ионов  $Sb^{3+}$  в растворе при такой реagentной обработке уменьшается в 5.7–6.9 раз. Однако на численность почвенных микроорганизмов такой раствор по-прежнему оказывает токсическое действие (рис. 2). По-видимому, на микроорганизмы токсическое действие

оказывают не только растворенные ионы  $Sb^{3+}$ , но и коллоидные частицы фосфата сурьмы  $SbPO_4$ .

Применение сорбентов является одним из наиболее эффективных способов извлечения поллютантов из раствора. Для ионов тяжелых металлов высокими сорбционными характеристиками обладают кремнийсодержащие оксидные сорбенты – диоксид кремния, силикаты и алюмосиликаты (Yarusova, 2017). Также высокие сорбционные свойства по отношению к ионам сурьмы проявляют углеродные материалы и оксиды железа. Среди известных сорбентов для извлечения сурьмы в исследованном диапазоне концентраций большинство демонстрируют сорбционную емкость порядка 100–250 мг/г, а наилучший известный материал – бернессит показывает емкость 759 мг/г (Zhang, 2021).



**Таблица 1.** Характеристика образцов сорбционных материалов

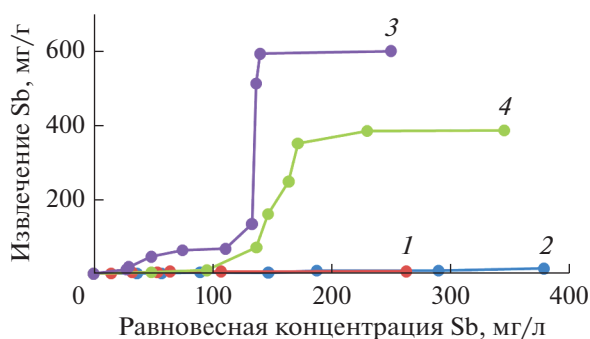
| Образец | Состав, %   | $S_{уд}$ , $m^2/g$ |
|---------|---|--------------------|
| 1       | $SiO_2$ – 53.90; C – 39.05                          | 300                |
| 2       | $SiO_2$ – 99.90                                     | 295                |
| 3       | $SiO_2$ – 51.09; $Al_2O_3$ – 39.78; $Na_2O$ – 13.53 | 470                |
| 4       | $SiO_2$ – 92.50; $Fe_2O_3$ – 3.13                   | 56.7               |

Примечание.  $S_{уд}$  – удельная площадь поверхности (BET surface).

В настоящей работе оценивали возможность использования для очистки водных сред от ионов сурьмы(III) четырех сорбционных материалов различной природы (табл. 1), которые проявляют высокие сорбционные свойства по отношению к другим поллютантам – органическим красителям (метиленовый синий), радионуклидам (Cs, Sr, Co) и тяжелым металлам (Pb).

Кривые извлечения сурьмы (рис. 3) из модельных растворов  $SbF_3$  показывают, что наибольшей эффективностью обладает образец 3 – биогенный алюмосиликат натрия из соломы риса (емкость 596 мг/г, степень извлечения сурьмы из растворов – до 76%) (Холомейдик, 2021).

Для исследования реальной эффективности сорбционной очистки в отношении микрофлоры почв был использован раствор с высокой концентрацией  $SbF_3$  (5000 мг/л) и такой же раствор после сорбционной очистки биогенным алюмосиликатом натрия. Концентрация сурьмы после фильтрации через сорбент составила 201.3 мг/л (степень извлечения 96–96.7%). В данном случае исследованные растворы после стерилизации использовали для разведения почвенной суспензии с последующим высевом на чистую питательную среду МПА. Установлено, что раствор с концентрацией в 5000 мг/л оказывает губительное воздействие на весь спектр микроорганизмов, развивающихся на среде МПА. После сорбционной



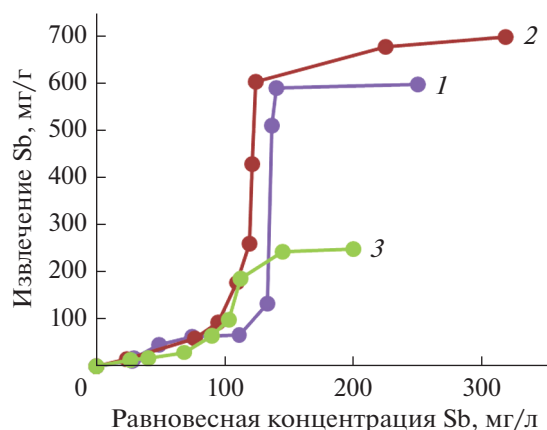
**Рис. 3.** Изотермы извлечения сурьмы из растворов  $SbF_3$  кремнийсодержащими материалами (нумерация образцов по табл. 1).

очистки отмечен рост микроорганизмов на среде МПА до 9–11 тыс. КОЕ/г почвы.

Дополнительно были исследованы сорбционные свойства алюмосиликата натрия по извлечению сурьмы из почвенных водных вытяжек (рис. 4). Установлено, что эффективность сорбента меняется в зависимости от типа почвы. Относительно модельного раствора  $SbF_3$  в случае вытяжки из серогумусовой техногенной почвы сорбционная емкость снижается на 59%, однако для бурозема – повышается на 16%.

Таким образом, установлено токсическое действие  $SbF_3$  и  $NaSbF_4$  в концентрации 50 и 100 мг/л на почвенную микрофлору. Концентрация соединений сурьмы(III) в питательной среде в дозе 50 мг/л резко снижает численность аммонификаторов в почве, 100 мг/л – практически полностью уничтожает аммонифицирующие микроорганизмы, которым принадлежит ведущая роль в разложении содержащих азот сложных соединений. Установлено, что микроскопические грибы более устойчивы к действию исследованных соединений.

При реагентном способе очистки с использованием 0.1 М раствор дигидрофосфата натрия ( $NaH_2PO_4$ ) отмечено токсическое действие полу-



**Рис. 4.** Изотермы извлечения сурьмы из почвенных вытяжек биогенным алюмосиликатом натрия: 1 – водный раствор  $SbF_3$ ; 2 – вытяжка из бурозема +  $SbF_3$ ; 3 – вытяжка из серогумусовой почвы +  $SbF_3$ .

ченного раствора на численность почвенных микроорганизмов.

Показано, что в отличие от реагентной очистки, метод сорбционного извлечения Sb(III) эффективен и позволяет извлекать из водных растворов до 96.7% растворенной сурьмы. Водные растворы с высокой концентрацией сурьмы (5000 мг/л), использованные для разведения почвенной суспензии, губительно воздействовали на весь спектр микроорганизмов, развивающихся на среде МПА. После сорбционной очистки биогенным алюмосиликатом натрия концентрация сурьмы снижалась до 201.3 мг/л, отмечался рост микроорганизмов, что позволяет говорить об эффективности использования такого метода очистки для реальных природных систем.

Дешевый и экологически чистый сорбент – биогенный алюмосиликат натрия при извлечении сурьмы из почвенных вытяжек обладает емкостью до 700 мг/г, что сопоставимо с наилучшими из известных сорбционных материалов. Также для очистки водных сред от сурьмы представляет интерес железосодержащий композиционный материал, обладающий магнитными свойствами.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках госзадания ИХ ДВО РАН 0205-2021-0002 тема 2, раздел 5 и ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН 0207-2021-0004.

#### 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

*Аринишуккина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. М.: МГУ, 1970. 487 с.

*Водяницкий Ю.Н.* Нормативы содержания тяжелых металлов и металлоидов в почвах // Почвоведение. 2012. № 3. С. 368–375.

*Vodyanitskii Y.N.* Standards for the contents of heavy metals and metalloids in soils // Euras. Soil Sci. 2012. V. 45. P. 321–328.  
<https://doi.org/10.1134/S1064229312030131>

ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. Введ. 01.01.1986 г. М.: Стандартинформ, 2008. 8 с.

*Земнухова Л.А., Федорищева Г.А., Егоров А.Г., Сергиенко В.И.* Исследования условий получения, состава примесей и

свойств аморфного диоксида кремния из отходов производства риса // Журн. прикладной химии. 2005. Т. 78. С. 324–328.

*Ковалева Е.В., Земнухова Л.А.* Экотоксикологические свойства комплексных фторидных соединений сурьмы(III) // Вестн. Томского гос. ун-та. Химия. 2019. № 13. С. 28–41.  
<https://doi.org/10.17223/24135542/13/4>

Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.

*Панасенко А.Е., Борисова П.Д., Арефьева О.Д., Земнухова Л.А.* Алюмосиликаты из соломы риса: получение и сорбционные свойства // Химия растительного сырья. 2019. № 3. С. 291–298.

*Панасенко А.Е., Ткаченко И.А., Квач А.А., Земнухова Л.А.* Магнитные свойства композиционных материалов на основе аморфного кремнезема растительного и минерального происхождения // Журн. неорганической химии. 2017. Т. 62. С. 972–976.

Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест: Методические указания. МУ 2.1.7.730-99. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. 1999. 38 с.

*Прокофьева Т.В., Герасимова М.И., Безуглова О.С., Бахматова К.А., Гольева А.А., Горбов С.Н., Жарикова Е.А., Матинян Н.Н., Наквасина Е.Н., Сивцева Н.Е.* Введение почв и почвоподобных образований городских территорий в классификацию почв России // Почвоведение. 2014. Т. 47. № 10. С. 1155–1164.

*Prokof'eva T.V., Gerasimova M.I., Bezuglova O.S., Bakhmatova K.A., Gol'eva A.A., Gorbov S.N., Zharikova E.A., Matinyan N.N., Nakvasina E.N., Sivtseva N.E.* Inclusion of soils and soil-like bodies of urban territories into the Russian soil classification system // Euras. Soil Sci. 2014. V. 47. P. 959–967.  
<https://doi.org/10.1134/S1064229314100093>

*Холомейдик А.Н., Панасенко А.Е.* Извлечение ионов Sb<sup>3+</sup> кремнийсодержащими материалами из шелухи и соломы риса // Химия и химическое образование: 8-й международный симпозиум, 04–06 октября 2021 г.: сборник науч. трудов. Владивосток: Изд-во Дальневост. фед. ун-та, 2021. 188 с. С. 144–146.  
<https://doi.org/10.24866/7444-4121-0>

*Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И., Герасимова М.И.* Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.

*Bolan N., Kumar M., Singh E., Kumar A., Singh L., Kumar S., Keerthanan S., Hoang S.A., El-Naggar A., Vithanage M., Sarkar B., Wijesekara H., Diyabalanage S., Sooriyakumar P., Vinu A., Wang H., Kirkham M.B., Shaheen S.M., Rinklebe J., Siddique K.H.M.* Antimony contamination and its risk management in complex environmental settings: a review // Environ. Int. 2022. V. 158. Art. 106908.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106908>

*Fu Z., Wu F., Mo C., Deng Q., Meng W., Giesy J.P.* Comparison of arsenic and antimony biogeochemical behavior in water, soil and tailings from Xikuangshan, China // Sci. Total Environ. 2016. V. 539. P. 97–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.146>

IUSS Working Group WRB, World Reference Base for Soil Resources, International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps, World

Soil Resources Reports No. 106. Food and Agriculture Organization, Rome, 2014.

Wang X., He M., Xi J., Lu X. Antimony distribution and mobility in rivers around the world's largest antimony mine of Xikuangshan, Hunan Province, China // *Microchem. J.* 2011. V. 97. P. 4–11.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.05.011>

Yarusova S.B., Gordienko P.S., Krishna R., Azarova Yu.A., Suponina A.P., Perfilev A.V., Sharma Y.C. Sorption charac-

teristics of economically viable silicate sorbents for sequestration of lead ions from aqueous solutions // *Resource-Efficient Technol.* 2017. V. 3. P. 213–221.

<https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.05.002>

Zhang X., Xie N., Guo Y., Niu D., Sun H. Yang Y. Insights into adsorptive removal of antimony contaminants: Functional materials, evaluation and prospective // *J. Hazard. Mater.* 2021. V. 418. Art. 126345.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126345>

## Impact of Antimony Fluoride Compounds on Soil Microflora and Methods of Their Detoxification

I. V. Kiseleva<sup>1, \*</sup>, A. N. Kholomeidik<sup>2</sup>, L. N. Shchapova<sup>1</sup>, and A. E. Panasenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch,  
Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*

\*e-mail: [kiseleva-iv@inbox.ru](mailto:kiseleva-iv@inbox.ru)

Received November 25, 2021; revised April 28, 2022; accepted May 4, 2022

**Abstract**—Solutions of  $\text{SbF}_3$  and  $\text{NaSbF}_4$  (50 and 100 mg/L) were found to have a toxic effect on soil microflora. At the final concentration of 50 mg/L, bacteria and microscopic fungi were detected sporadically in the medium (MPA). At 100 mg/L, bacterial growth in the studied soils was completely suppressed. Microscopic fungi were found to be more resistant to the action of the studied compounds. Addition of 0.1 M sodium dihydrophosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) solution to  $\text{SbF}_3$  or  $\text{NaSbF}_4$  solutions resulted in a 5.7–6.9-fold decrease the concentration of dissolved  $\text{Sb}^{3+}$  ions. However, this solution still had a toxic effect on the number of soil microorganisms. In contrast to reagent purification, the method of sorption extraction of  $\text{Sb(III)}$  was shown to be efficient. A solution containing 5000 mg/L antimony, which was used to dilute the soil suspension, completely suppressed the growth of microflora. After sorption treatment, the concentration of antimony decreased to 201.3 mg/L, and growth of microorganisms was noted.

**Keywords:** soil, bacteria, antimony, heavy metals, toxicity, sorption, extraction

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯМИКОЦИНОТИПИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ  
“САМОСТОЯТЕЛЬНЫХ” ВИДОВ РОДА *CANDIDA*

© 2022 г. В. И. Голубев\*

Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии  
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ Пушчинский научный центр  
биологических исследований РАН, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

\*e-mail: wig@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 23.02.2022 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 11.04.2022 г.

Изученные типовые штаммы филогенетически обособленных (“самостоятельных”) видов *Candida* нечувствительны к микоцинам семи родов аскоспорных дрожжей, часть из которых активны против типовых штаммов *C. albicans*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*. Полученные данные могут быть полезны для оценки таксономического положения видов дрожжей обширного полифилетического рода *Candida*.

**Ключевые слова:** микоцинотипирование, филогения, самостоятельные (unaffiliated) виды

**DOI:** 10.31857/S0026365622100111

Род *Candida* Berkhout включает около 300 видов аскомицетных дрожжевых грибов (Lachance et al., 2011), у которых не достигнуто образования аскоспор, что может быть обусловлено рядом причин: незнанием условий, индуцирующих и способствующих их формированию, гетероталлизмом или наличием мутаций, блокирующих этот процесс. В ряде случаев удалось индуцировать спорообразование, и было доказано, что виды *Candida* являются аспорогенными вариантами (анаморфами) аскоспорообразующих видов (телеоморф) известных родов. Так, например, установлено, что *C. pulcherrima* (Lindner) Windisch является анаморфой *Metschnikowia pulcherrima* Pitt et Miller, а *C. valida* (Leberle) van Uden et Buckley – *Pichia membranifaciens* (Hansen) Hansen.

На близость подавляющего большинства аспорогенных видов *Candida* к известным аскоспорным родам указывают и результаты филогенетического анализа на основе фрагментов генов рРНК (Lachance et al., 2011). Так, например, патогенный вид *C. glabrata* (Anderson) Meyer et Yarrow входит в филогенетический кластер рода *Nakaseomyces* Kurtzman, а *C. albicans* (Robin) Berkhout близок к видам рода *Lodderomyces* van der Walt. Однако имеется сравнительно небольшое число “самостоятельных” (unaffiliated) видов в составе рода *Candida*, которые образуют обособленные филогенетические группы, не примыкая ни к одному из известных родов. Эти виды весьма гетерогенны по морфологическим, физиолого-биохимиче-

ским и хемотаксономическим характеристикам. Например, одна из таких групп “самостоятельных” видов *Candida* была описана в качестве нового рода *Diutina* (Khunnamwong et al., 2015).

Ранее было установлено, что штаммы дрожжевых грибов могут секретировать антифунгальные белковые вещества, микоцины (киллер-токсины) (Golubev, 2006). Несмотря на то, что спектры действия разных микоцинов различаются, для большинства из них отмечена таксономическая специфичность: обычно они подавляют культуры, филогенетически близкие к микоциногенным штаммам и неактивны в отношении культур, филогенетически удаленные от продуцентов микоцинов (Golubev, 2006; Голубев, 2021). При этом синонимы, анаморфы и телеоморфы одного вида обычно демонстрируют практически идентичные спектры чувствительности (Голубев, 2021). Было также показано, что виды *Candida*, филогенетически близкие к определенным родам аскоспорных дрожжей, сходны с видами таких родов по чувствительности к определенным микоцинам (Голубев, 2021).

Исходя из сказанного, можно полагать, что “самостоятельные” (unaffiliated) виды *Candida*, скорее всего, нечувствительны к микоцинам, которые действуют на клинически значимые виды дрожжей. Соответственно, микоцинотипирование, выполненное в стандартных условиях с использованием релевантных микоцин-образующих штаммов, может быть полезно для предварительного разделе-

**Таблица 1.** Исследованные типовые штаммы “самостоятельных” видов *Candida*

| Название вида  | Номер штамма |
|--|--------------|
| <i>Candida anutae</i> Bab'eva et al.                                 | ВКМ Y-2868   |
| <i>C. aurita</i> Polyakova et Chernov                                | ВКМ Y-2910   |
| <i>C. blankii</i> Buckley et van Uden                                | ВКМ Y-2100   |
| Syn. <i>C. hydrocarbofumarica</i> Yamada et al.                      | ВКМ Y-2603   |
| <i>C. entomophila</i> Scott et al.                                   | ВКМ Y-2181   |
| <i>C. incommunis</i> Ohara et al.                                    | ВКМ Y-1515   |
| <i>C. insectalens</i> (Scott et al.) Meyer et Yarrow                 | ВКМ Y-2588   |
| <i>C. sake</i> (Saito et Oda) van Uden et Buckley ex Meyer et Ahearn | ВКМ Y-124    |
| Syn. <i>Torula lambica</i> Kufferath                                 | ВКМ Y-700    |
| Syn. <i>C. salmonicola</i> Komagata et Nakase                        | ВКМ Y-1463   |
| Syn. <i>C. vanriji</i> Capriotti                                     | ВКМ Y-1499   |
| <i>C. savonica</i> Sonck   | ВКМ Y-2187   |
| <i>C. silvanorum</i> van der Walt et al.                             | ВКМ Y-2185   |
| <i>C. sophiae-reginae</i> Ramirez et Gonzalez                        | ВКМ Y-2638   |
| <i>C. sorboxylosa</i> Nakase   | ВКМ Y-2076   |

**Таблица 2.** Используемые микоциногенные штаммы

| Название вида   | Номер штамма                                  |
|---|---|
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> (Niehaus) Shehata et al. ex Smith | ВКМ Y-132                                     |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> (Dombrowski) van der Walt         | ВКМ Y-1186                                    |
| <i>Ogataea pini</i> (Holst) Yamada et al.                     | ВКМ Y-899                                     |
| <i>Pichia membranifacins</i> (Hansen) Hansen                  | ВКМ Y-898                                     |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Lindner                      | ВКМ Y-1912                                    |
| <i>Starmera quercuum</i> (Phaff et Knapp) Kurtzman et al.     | ВКМ Y-1287 <sup>T</sup>                       |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> (Hansen) Kurtzman et al.      | ВКМ Y-140, ВКМ Y-159, ВКМ Y-1086 <sup>T</sup> |
| <i>W. ciferri</i> (Lodder) Kurtzman et al.                    | ВКМ Y-169 <sup>T</sup>                        |
| <i>W. silvicola</i> (Wickerham) Kurtzman et al.               | ВКМ Y-178 <sup>T</sup>                        |

Примечание. <sup>T</sup>: типовой штамм.

ния анаморфных морфологически и физиологически сходных аскомицетовых дрожжей и их отнесения к филогенетически удаленным видам.

Для проверки этого предположения на чувствительность к микоцинам были проверены 15 культур, включая типовые штаммы 11 “самостоятельных” видов *Candida* и носителей их синонимов (табл. 1). Микоциногенные штаммы включали представителей 9 видов из 7 родов аскоспоровых дрожжей (табл. 2), в том числе, *Wickerhamomyces* Kurtzman et al. и других родов, показавших активность в отношении типовых штаммов клинически значимых видов *C. tropicalis* (Castellani) Berkhout, *C. albicans* (Robin) Berkhout и *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron et Talice (Голубев, 2015). Все использованные в работе штаммы получены из ВКМ.

Для тестирования использовали среду с 0.05 М цитрат-фосфатным буфером (рН 4.5) следующего состава (г/л): глюкоза – 5, пептон – 2.5, дрожжевой экстракт – 2, NaCl – 30, агар – 20. На поверхность этой среды наносили 0.05 мл клеточной суспензии (10<sup>5</sup> кл./мл) обследуемой 2–3-суточной культуры, выращенной на сусло-агаре, и тщательно растирали шпателем. Затем штрихом наносили обильный инокулом 5–6-суточной культуры микоциногенного штамма. Засеянные таким образом чашки инкубировали при 18°C до появления роста газона, который должен быть равномерным и сплошным, но не обильным.

Результаты эксперимента показали, что все типовые штаммы обследованных видов *Candida* и носителей синонимов (табл. 1) нечувствительны к микоцинам, секретлируемым использованными

в работе культурами аскоспорных дрожжей (табл. 2). Полученные в настоящей работе данные предполагают, что одна из основных причин нечувствительности рассматриваемых видов *Candida* сразу к нескольким и разным микоцинам — их филогенетическая отдаленность от продуцентов данных микоцинов. Эти “самостоятельные” (unaffiliated) виды являются, по-видимому, представителями еще неописанных родов дрожжей.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1051).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голубев В.И. Микцинотипирование видов *Cyberlindnera* // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 223–225.
- Golubev W.I. Mycocinotyping of *Cyberlindnera* species // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 226–228.
- Голубев В.И. Антифунгальная активность *Wickerhamomyces silvicola* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 529–535.
- Golubev W.I. Antifungal activity of *Wickerhamomyces silvicola* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 610–615.
- Golubev W.I. Antagonistic interactions among yeasts // Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts / Eds. Rosa C.A., Peter G. Berlin: Springer-Verlag, 2006. P. 197–219.
- Khunnaamwong P., Lertwattanasakul N., Jindamorakot S., Limtong S., Lachance M.-A. Description of *Diutina* gen. nov., *Diutina siamensis* f.a. sp. nov., and reassignment of *Candida catenulate*, *Candida mesorugosa*, *Candida neorugosa*, *Candida pseudorugosa*, *Candida ranongensis*, *Candida rugosa* and *Candida scorzettiae* to the genus *Diutina* // Int. J. System. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 4701–4709.
- Lachance M.-A., Boekhout T., Scorzetti G., Fell J.W., Kurtzman C. *Candida* Berkhout (1923) // The Yeasts. A Taxonomic Study. 5th ed. Vol. 2 / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. London: Elsevier. 2011. P. 987–1278.

## Mycocinotyping of Some Unaffiliated *Candida* Species

W. I. Golubev\*

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

\*e-mail: wig@ibpm.pushchino.ru

Received February 23, 2022; revised March 15, 2022; accepted April 11, 2022

**Abstract**—The studied type strains from the phylogenetically unaffiliated *Candida* species are insensitive to mycocins of ascosporegenous yeasts of seven genera. The data obtained may be useful for assessing the taxonomic position of yeast strains within the large polyphyletic genus *Candida*.

**Keywords:** mycocinotyping, phylogeny, unaffiliated species

## ПОПРАВКА

DOI: 10.31857/S0026365622600614

**К статье: “ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЕСТЕСТВЕННЫЙ  
БИОКОНТРОЛЬ ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА  
AMР1-ПОДОБНЫМИ БАКТЕРИОФАГАМИ В АГРОЭКОСИСТЕМАХ”**

**А. В. Летаров, М. А. Летарова, Н. Лазар Адлер, Е. Е. Куликов, М. Клоки, А. Ю. Морозов, Э. Е. Галев  
(Микробиология. Т. 91, № 2, С. 226–233)**

В разделе “Финансирование” указана неполная информация об уникальных идентификаторах проекта.

Вместо:

“Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 13.2251.21.0090”

Следует читать:

“Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1006, государственный контракт № 13.2251.21.0090)”.