

СОДЕРЖАНИЕ

Том 91, номер 1, 2022

ОБЗОРЫ

Разнообразие термофильных прокариот в природных горячих источниках Российской Федерации

Т. В. Кочеткова, О. А. Подосокорская, А. Г. Ельченинов, И. В. Кубланов

3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Разнообразие новых некультивируемых прокариот в микробных сообществах минеральных подземных вод Эссентукского месторождения

*С. Н. Гаврилов, Е. Г. Потанов, М. И. Прокофьева, А. А. Ключина,
А. Ю. Меркель, А. А. Маслов, Д. Г. Заварзина*

32

Морфология и филогения микроводоросли *Coleochlamys apoda* (*Microthamniales, Chlorophyta*)

В. В. Редькина, А. Д. Темралева, Е. А. Портная, Р. Р. Шалыгина

50

Характеристика микобиоты почв Земли Франца-Иосифа методами микробиологического посева и ПЦР в реальном времени

Д. А. Никитин, М. В. Семенов

62

Видовое разнообразие фототрофного пикопланктона морей Карского и Лаптевых

Т. А. Белевич, И. А. Милютина

75

Разнообразие бактерий прикрепленных сообществ холодного высокосульфидного водоема европейской части России

М. Ю. Горбунов, Ю. А. Хлопко, В. Я. Катаев, М. В. Уманская

86

Бактерии-деструкторы бензойной кислоты семейства *Halomonadaceae*, выделенные из района солеразработок: видовое разнообразие и анализ *benA*-генов

А. А. Пьянкова, Е. Г. Плотникова

102

Скрининг образования биосурфактантов штаммами *Yarrowia lipolytica* и оценка их антибиопленочной и антиадгезивной активности против биопленок *Salmonella enterica* ser. Enteritidis

Ф. Шатила, Е. Уйар, Х. Т. Ялсин

116

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Исследование секреции вазопрессина и окситоцина микроорганизмами

Ю. В. Наточин, О. Г. Орлова, О. В. Рыбальченко, Е. И. Шахматова

125

Contents

Vol. 91, No. 1, 2022

Reviews

- Diversity of Thermophilic Prokaryotes Inhabiting Russian Natural Hot Springs
T. V. Kochetkova, O. A. Podosokorskaya, A. G. Elcheninov, and I. V. Kublanov 3
-

Experimental Articles

- Diversity of Novel Uncultured Prokaryotes in Microbial Communities of the Yessentukskoye Underground Mineral Water Deposit
S. N. Gavrilov, E. G. Potapov, M. I. Prokof'eva, A. A. Klyukina, A. Yu. Merkel, A. A. Maslov, and D. G. Zavarzina 32
- Morphology and Phylogeny of the Microalga *Coleochlamys apoda* (*Microthamniales, Chlorophyta*)
V. V. Redkina, A. D. Temraleeva, E. A. Portnaya, R. R. Shalygina 50
- Characterization of Franz Josef Land Soil Mycobiota by Microbiological Plating and Real-Time PCR
D. A. Nikitin and M. V. Semenov 62
- Species Diversity of Phototrophic Picoplankton in the Kara and Laptev Seas
T. A. Belevich and I. A. Milyutina 75
- Bacterial Diversity in Attached Communities of a Cold High-Sulfide Water Body in European Russia
M. Yu. Gorbunov, Y. A. Khlopko, V. Ya. Kataev, and M. V. Umanskaya 86
- Benzoate-Degrading Bacteria of the Family *Halomonadaceae* Isolated from a Salt Mining Area: Species Diversity and Analysis of the *benA* Genes
A. A. Pyankova and E. G. Plotnikova 102
- Screening of Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica* Strains and Evaluation of Their Antibiofilm and Anti-Adhesive Activities against *Salmonella enterica* ser. Enteritidis Biofilms
F. Shatila, E. Uyar, and H. T. Yalçın 116
-

Short Communications

- Vasopressin and Oxytocin Secretion by Microorganisms
Yu. V. Natochin, O. G. Orlova, O. V. Rybalchenko, and E. I. Shakhmatova 125
-
-

РАЗНООБРАЗИЕ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ПРОКАРИОТ В ПРИРОДНЫХ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

© 2022 г. Т. В. Кочеткова^а, *, О. А. Подосокорская^а, А. Г. Ельченинов^а, И. В. Кубланов^а

^аФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, 117312 Россия

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

Поступила в редакцию 25.08.2021 г.

После доработки 24.09.2021 г.

Принята к публикации 25.09.2021 г.

В обзоре представлены ключевые результаты изучения разнообразия термофильных прокариот, обитающих в природных горячих источниках Российской Федерации. Основная часть обзора посвящена обобщению данных классических микробиологических, радиоизотопных, молекулярно-экологических работ, проведенных за десятки лет исследований термофильных микробных сообществ на территории полуострова Камчатка, Курильских островов и района озера Байкал. Также представлены данные по недавно изученным гидротермам Восточно-Тувинского нагорья, Чукотки, острова Сахалин, Северного Кавказа. Собраны воедино таксономические данные обо всех описанных термофильных прокариотах, выделенных из горячих источников на территории России. Рассмотрены основные энергодающие процессы, базирующиеся, в первую очередь, на окислительно-восстановительных реакциях неорганических (прежде всего, серы и железа) и органических соединений. Уделено большое внимание термофильным прокариотам, участвующим в круговороте углерода: от ассимилирующих углекислоту хемолитоавтотрофных прокариот до деструкторов органического вещества. Отдельно обсуждаются пока некультивируемые группы термофильных бактерий и архей, присутствие которых, а порой и их доминирование в источниках, было выявлено только благодаря молекулярно-экологическим методам.

Ключевые слова: горячие источники, Россия, термофильные прокариоты, Камчатка, Курильские острова, Байкальская рифтовая зона, микробное разнообразие, гидротермы

DOI: 10.31857/S0026365622010062

ВВЕДЕНИЕ

Горячие (или термальные) источники – это выходы на поверхность подземных вод, температура в которых выше среднегодовой климатической температуры в регионе (Кейльгак, 1935). Тем не менее в данном обзоре будут обсуждаться только природные источники с температурой воды выше 45–50°C, так как эта температура считается нижней границей оптимума роста термофильных микроорганизмов. Горячие источники встречаются по всему миру и приурочены к зонам геотермальной активности. Большой интерес микробиологов к горячим источникам возник в 60-х годах XX века после опубликования работ американского исследователя Т. Брока (Т. Brock), обнаружившего в гидротермах Йеллоустонского национального парка (США) микробные сообщества, растущие при температурах выше 50°C (Brock, Freeze, 1969). Ранее считалось, что некоторые микроорганизмы способны только переносить высокие температуры, например, за счет образования спор. Однако открытая Брокком термофильная бактерия *Thermus aquaticus* оптимально

росла при 65–70°C и не могла расти при температуре ниже 50°C. Впоследствии эта бактерия была использована для получения термостабильной ДНК-полимеразы, применяемой в ПЦР (Saiki et al., 1988) – методе, за который в 1993 г. разработчик новой биотехнологии К. Муллис (К. Mullis) получил Нобелевскую премию. Открытие в конце 70-х годов глубоководных гидротермальных систем, так называемых “черных курильщиков”, расположенных в зонах разломов океанических плит, а также связанных с ними уникальных экосистем, практически не зависящих от энергии солнечного света, привело к следующему скачку интереса к термофильным микроорганизмам (Corliss et al., 1979).

Наибольшее количество природных горячих источников, как наземных, так и глубоководных, сконцентрировано в регионах современного вулканизма на границах литосферных плит (в зонах субдукции), а также в местах спрединга океанических плит или континентального рифта. Самая большая зона вулканической активности на нашей планете находится в Тихоокеанском Огнен-

ном Кольце, захватывающем регионы от Алеутских островов на севере до вулканов Новой Зеландии и Чили на юге. Помимо этого, гидротермальная активность хорошо выражена в вулканическом поясе Средиземноморья, на активных молодых океанических и континентальных рифтах (Срединно-Атлантический хребет, Исландия, Восточно-Африканский рифт).

Нагрев гидротермального флюида в вулканических местах обитания происходит за счет непосредственного контакта с магмой и/или сильно нагретыми породами. Поэтому температура воды на поверхности в таких местах может достигать точки кипения, а на морском дне из-за повышения гидростатического давления может быть выше 100°C. Геохимия горячих источников весьма разнообразна и, в первую очередь, определяется составом вмещающих пород, сквозь которые проходят горячие потоки воды, и выделяющимися на поверхность газами. Как следствие, pH в горячих источниках вулканического происхождения также может сильно варьировать – от 0–2 до 9–10. На территории России горячие источники вулканического происхождения сконцентрированы в Курило-Камчатском регионе, являющимся частью Тихоокеанского подвижного пояса. К ним относится большинство источников полуострова Камчатка, а также наземные и прибрежные горячие выходы Курильских островов.

Гидротермальные выходы обнаруживаются и в регионах, где нет современной вулканической активности. В таких местах горячие источники проявляются за счет повышенной тектоно-магматической активности. В данном случае атмосферные воды, попадающие с осадками и/или циркулирующие под землей, нагреваются только за счет контакта с нагретыми породами, но не с магмой. Как правило, температура воды в зоне разгрузки таких источников не превышает 70°C. Это напрямую влияет на химический состав термальной воды и, как следствие, на ее pH, который обычно варьирует в узкой околонейтральной и слабощелочной зоне (pH 6–8). В воде таких умеренно термальных источников практически нет соединений серы, чье присутствие связано исключительно с вулканическими процессами. Термальные источники невулканического генезиса в России расположены в Алтайском, Хабаровском крае, Магаданской области, на востоке Чукотского полуострова (Басков, Суриков, 1989; Polyak et al., 2013).

По одной из наиболее общепринятых теорий, жизнь на Земле началась именно в горячих источниках (Rasmussen, 2000; Des Marais, Walter, 2019), и первыми организмами, населившими нашу планету, были термофилы (Weiss et al., 2016). Считается, что все ныне живущие организмы являются потомками так называемого последнего общего

предка – LUCA (Last Universal Common Ancestor) (Woese et al., 1990; Martin, Russel, 2003; Weiss et al., 2016). Изучение природных термальных экосистем и обитающих в них термофильных сообществ может приблизить нас к пониманию происхождения и ранних этапов эволюции жизни на Земле, а также, возможно, и на других планетах (Des Marais, Walter, 2019). Также большой интерес представляют ферменты термофилов и гипертермофилов (термозимы), характеризующиеся высокой стабильностью, что делает их перспективными для различных областей применения (De-Castro et al., 2016).

Данный обзор посвящен разнообразию термофильных прокариот, обитающих в горячих источниках России с температурой воды выше 45–50°C (рис. 1). Подробно рассмотрены микробные сообщества гидротерм Камчатки, Курильских островов, района озера Байкал, где многие годы велись микробиологические исследования. Огромный вклад в эти исследования был сделан академиком Г.А. Заварзиным и его сотрудниками, в первую очередь, группой под руководством Е.А. Бонч-Осмоловской. Также в обзоре представлены результаты микробиологических исследований горячих источников Чукотки, Тувы и острова Сахалин. Кавказские термальные источники, несмотря на историческую известность и популярность у населения, остаются практически неизученными с микробиологической точки зрения.

ГОРЯЧИЕ ИСТОЧНИКИ КУРИЛО-КАМЧАТСКОГО РЕГИОНА

Горячие источники Камчатки

Наибольшее количество высокотемпературных гидротерм Камчатки сосредоточено в Узон-Гейзерной системе, кальдере Академии Наук, рядом с Большесемянчинской кальдерой, Паужетке, Киреунской и Апапельской системах. Проявления геотермальной активности (фумаролы, сольфатары и др.) и обилие горячих источников можно наблюдать также в районах активных вулканов, например, Мутновского и Карымского (Федотов, 1991) (рис. 1в). Горячие источники Камчатки отличаются огромным разнообразием по химическому составу, pH и температуре, что обусловлено составом окружающих глубинных пород и мощностью горячего флюида. Самые крупные проявления геотермальной активности на Камчатке связаны с Узон-Гейзерной системой, центрами которой являются кальдера вулкана Узон (рис. 2) и долина р. Гейзерной. По химическому составу высокотемпературные термы Долины гейзеров и кальдеры Узон близки, однако в узонских термах почти вдвое выше общая минерализация. Кальдера Узон представляет собой овальную впадину площадью около 110 км² с плоским дном и мини-

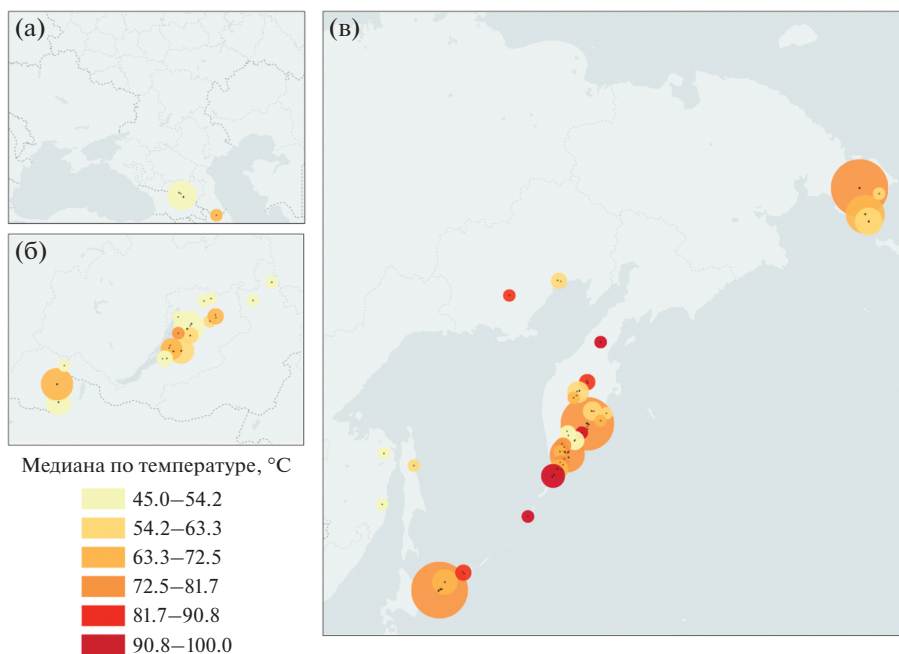


Рис. 1. Географическое положение природных высокотемпературных горячих источников, расположенных на территории России: а – Кавказ; б – Байкальская рифтовая зона; в – Дальний Восток. Карта была отформатирована с использованием kepler.gl (<https://kepler.gl>): медианные температуры (см. шкалу) показаны для каждого кластера, который был сформирован на близко расположенных друг к другу горячих источниках.

мальной высотой в 650 м над уровнем моря (Карпов, Naboko, 1990). На Узоне можно обнаружить все типы поверхностных проявлений геотермальной активности: горячие источники, грязевые котлы и грязевые вулканы, фумаролы, а также относительно недавно “открывшийся” гейзер. Уникальность кальдеры Узон заключается в том, что здесь на сравнительно небольшом пространстве соседствуют все основные типы гидротерм: перегретые хлоридно-натриевые растворы с высокими концентрациями бора, мышьяка, сурьмы, ртути и лития; хлоридно-сульфатные, сульфат-хлоридные, сульфатные и бикарбонатные. На Узоне имеются большие запасы S–Hg–Sb–As–FeS-содержащих руд (Карпов, Naboko, 1990); обнаружены нефтяные образования сложного происхождения (Vazhenova et al., 1998). В то же время в Долине гейзеров ничего подобного не наблюдается. Газы, выходящие из горячих источников, в основном состоят из CO₂ и N₂, со значимым содержанием H₂, CH₄, H₂S, паров серы, CO, NH₃, которые могут служить донорами электронов для хемотрофных микроорганизмов (Заварзин и соавт., 1989).

Следствием разнообразия физико-химических параметров горячих источников Камчатки является разнообразие населяющих их микробных сообществ. Основными источниками энергии для микроорганизмов являются восстановленные неорганические соединения, вулканические газы и

органическое вещество, синтезируемое автотрофами за счет хемосинтеза или поступающее извне (Бонч-Осмоловская и соавт., 1999). Микробный фотосинтез ограничивается температурой 73°C (Brock, 1978; Boyd et al., 2012) и поэтому не играет ведущей роли в многочисленных высокотемпературных источниках Камчатки. Таким образом, хемолитоавтотрофные прокариоты, использующие восстановленные неорганические соединения вулканического происхождения (на Камчатке это, прежде всего, соединения серы и водород) в качестве донора электронов, являются главными первичными продуцентами в этих экосистемах (табл. 1), поэтому в первую очередь нами будет рассмотрено микробное разнообразие хемолитоавтотрофов.

В большинстве источников доминирующей группой являются факультативные хемолитоавтотрофные микроаэрофильные бактерии одного из самых филогенетически глубоких бактериальных филумов – *Aquificae*¹, составляя порой до 85% от всего сообщества микроорганизмов (Reigstad et al., 2010; Merkel et al., 2017). Их можно легко обнаружить по обильным серо-белым слизистым

¹ Здесь и далее приведена таксономия из “Руководства Берги по систематике архей и бактерий” (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608>). Мы пользуемся этой номенклатурой, а не GTDB (<https://gtdb.ecogenomic.org/>), т.к. последняя довольно нова, не принята всем сообществом микробиологов и неизвестна широкому кругу читателей.

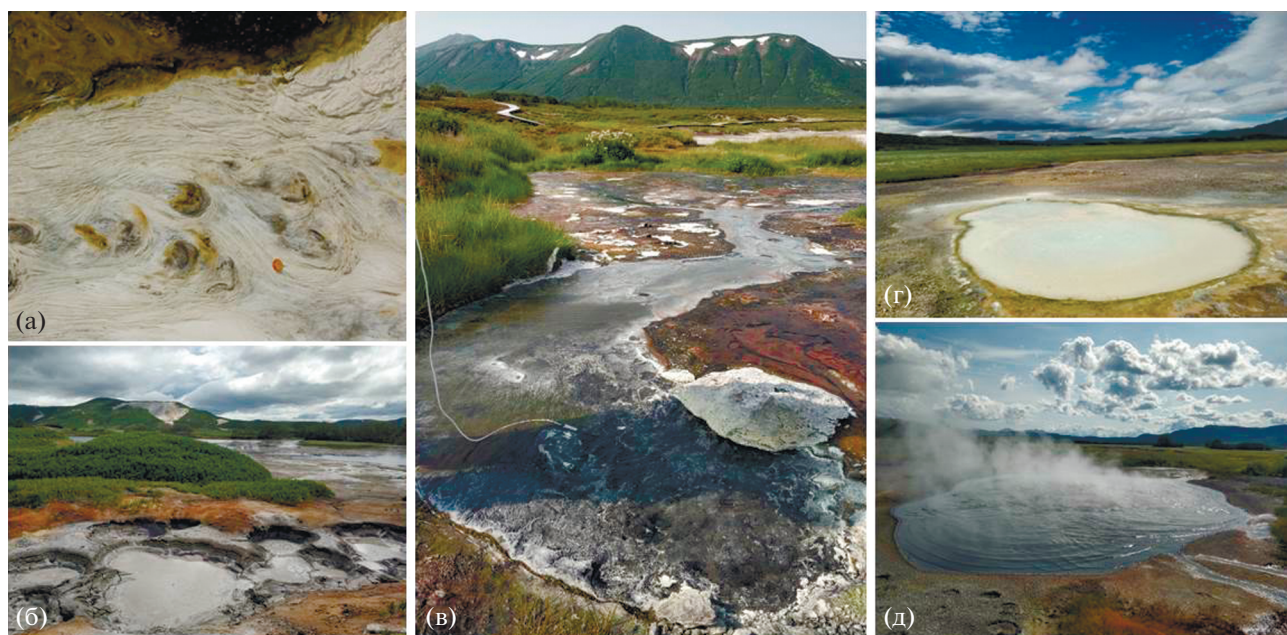


Рис. 2. Термальные ручьи (а, в), грязевые котлы (б) и горячие источники (г, д) кальдеры вулкана Узон, Камчатка.

“космам”, активно развивающимся по стенкам источников или в руслах термальных ручьев (рис. 2а). Представители этого филума фиксируют углекислоту за счет окисления неорганических доноров электронов, в основном, водорода и восстановленных соединений серы, используя при этом практически весь спектр имеющихся в источниках акцепторов электронов (O_2 , NO_3^- , S^0 , $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} , Fe^{3+} , AsO_4^{3-} , SeO_3^{2-}) (Reysenbach et al., 2005; Hedlund et al., 2015). Некоторые *Aquificae* способны расти миксотрофно, а также использовать короткоцепочечные органические кислоты и/или амиды в качестве основного источника углерода и энергии при гетеротрофном росте (Urschel et al., 2015). При этом, как и в остальных наземных гидротермах по всему миру (Skirnisdottir et al., 2000; Inskeep et al., 2013; Hou et al., 2013; Huang et al., 2013; Hedlund et al., 2015), разнообразие *Aquificae* на Камчатке невелико (Merkel et al., 2017). Бактерии этого филума представлены несколькими родами: *Sulfurihydrogenibium*, *Hydrogenobacter*, *Hydrogenobaculum*, *Thermocrinis* и *Thermosulfidibacter*. В источниках с рН выше 5 и температурами от 60 до 97°C чаще всего встречаются представители рода *Sulfurihydrogenibium* (Wemheuer et al., 2013; Merkel et al., 2017; Mardanov et al., 2018; Wilkins et al., 2019). В кислых источниках бактерии *Aquificae* обнаруживаются в значительно меньшем количестве, и только представители рода *Hydrogenobaculum* (Mardanov et al., 2018). Из камчатских источников в чистые культуры удалось выделить *S. rodmanii* (O'Neill et al., 2008), *Hydrogenobacter* spp. (Крюков и соавт., 1983; Eder,

Huber, 2002), а также представителя рода *Thermocrinis* (Eder, Huber, 2002).

Помимо представителей *Aquificae*, в горячих источниках Камчатки встречаются и другие термофильные автотрофные микроорганизмы, также получающие энергию, в основном, за счет окислительно-восстановительных реакций соединений серы (табл. 1). Среди них есть как археи, так и бактерии, ацидофилы и нейтрофилы, строгие аэробы, факультативные и строгие анаэробы. Последние характеризуются наибольшим разнообразием, что связано: а) с низкой растворимостью кислорода при высоких температурах и б) с отрицательным *Eh* из-за большой концентрации восстановленных соединений вулканического происхождения. Среди таких микроорганизмов стоит отметить факультативно автотрофную анаэробную гипертермофильную бактерию *Caldimicrobium rimaе* (филум *Thermodesulfobacteria*), доля которой в горячих нейтральных источниках Камчатки, особенно высокотемпературных, часто составляет десятки процентов. Этот микроорганизм способен фиксировать углекислоту при росте за счет окисления водорода, сопряженного с восстановлением тиосульфата или серы, или за счет диспропорционирования серы (Miroshnichenko et al., 2009; Chernyuh et al., 2015; Merkel et al., 2017). При понижении температуры воды до 50–60°C преимущественно получают умеренно термофильные автотрофные анаэробные бактерии, также восстанавливающие различные соединения серы, как, например, *Ammonifex thiophilus* (Черных и соавт., 2017), *Brockia lithotrophica* (Perevalova et al., 2013), представители рода *Desul-*

Таблица 1. Хемолитоавтотрофные термофильные прокариоты, выделенные из горячих источников Камчатки

Филум	Название	Донор e ⁻	Акцептор e ⁻	Облигатная/ факультативная автотрофия	Опт. T°C/pH	Ссылка
Термофильные автотрофы, использующие энергию серных соединений						
<i>Aquificae</i>	<i>Hydrogenobacter hydrogenophilus</i>	H ₂	O ₂	Облигатная	74–78/6–7	Крюков и соавт., 1983; Eder, Huber, 2002
	<i>Sulfurihydrogenibium rodmanii</i>	S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	O ₂	Облигатная	75/6.0–6.3	O'Neill et al., 2008
<i>Firmicutes</i>	<i>Thermotocrinis</i> sp.	H ₂ , S ⁰	O ₂	Облигатная	80/5.0	Eder, Huber, 2002
	<i>Ammonifex thiophilus</i>	H ₂	S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ , SO ₃ ²⁻	Облигатная	75/6.8	Miroshnichenko et al., 2008a; Merkel et al., 2017
	<i>Brookia lithotrophica</i>	H ₂ , формиат	S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	Облигатная	60–65/6.5	Perevalova et al., 2013
	<i>Carboxydotherrnus pertinax</i>	H ₂	SO ₃ ²⁻	Факультативная	60/6.0	Merkel et al., 2017
	<i>Desulfothermobacter acidiphilus</i>	H ₂ , формиат	SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	Факультативная	55/4.5	Frolov et al., 2018
	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	S ⁰ , S ²⁻ , Fe(II)	O ₂	Облигатная	50–55/1.9–2.4	Головачева, Каравайко, 1978
	<i>Thermodesulfobium acidiphilum</i> *	H ₂ , формиат	SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻	Облигатная	55/4.8–5.0	Frolov et al., 2017
	<i>Desulfurella acetivorans</i> , <i>D. kanchaikensis</i> , <i>D. propionica</i>	H ₂	S ⁰	Факультативная	52–57/ около 7.0	Bonch-Osmolovskaya et al., 1990a; Miroshnichenko et al., 1998
	<i>Dissulfurimicrobium hydrothermale</i>	S ⁰	S ⁰	Облигатная	50–52/ 6.0–6.2	Slobodkin et al., 2016
	<i>Thermotrix thiopara</i>	H ₂ S	O ₂	Факультативная	70–75	Кузнецов, 1955
<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Calditmicrobium rimaе</i>	H ₂ , S ⁰	Факультативная	75/7.0–7.2	Miroshnichenko et al., 2009; Merkel et al., 2017	
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Sulfurococcus mirabilis</i>	S ⁰	Факультативная	70–75/2.0–2.6	Головачева и соавт., 1987	
Термофильные нитрификаторы						
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i> sp.	NO ₂ ⁻	O ₂	Облигатная	46/7.8	Lebedeva et al., 2011
<i>Thaumarchaeota</i>	'Ca. Nitrosotenuis uzonensis'	NH ₄ ⁺	O ₂	Облигатная	46/6.5	Lebedeva et al., 2013
Термофильные карбоксидотрофы						
<i>Firmicutes</i>	<i>Carboxydocella thermautotrophica</i> , <i>C. sporoproducens</i>	CO	H ₂ O, Fe ³⁺	Факультативная	58–60/7.0	Sokolova et al., 2002; Slepova et al., 2006; Toshchakov et al., 2018
Термофильные автотрофы, использующие энергию соединений железа						
<i>Firmicutes</i>	<i>Carboxydocella mangonica</i>	H ₂ , формиат	Fe ³⁺ , Mn ⁴⁺ , NO ₃ ⁻	Факультативная	58–60/6.5	Slobodkina et al., 2012
	<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i>	H ₂	Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ²⁻	Факультативная	70/6.3	Slobodkin et al., 1999
<i>Nitrospirae</i>	<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Fe ²⁺	O ₂	Облигатная	45–50/1.6–1.9	Головачева и соавт., 1992

* Согласно Frolov et al. (2019), является представителем отдельного филума.

firella (Miroshnichenko et al., 1998; Mall et al., 2018) и другие (табл. 1). В кислых горячих источниках (при pH ниже 4) преобладают сероокисляющие хемолитоавтотрофные бактерии рода *Acidithiobacillus* (Mardanov et al., 2011, 2018), а также гетеротрофные аэробные археи рода *Sulfolobus* (Mardanov et al., 2018), некоторые из которых способны к автотрофному росту. Среди анаэробных прокариот в кислых источниках Камчатки обитают микроорганизмы, способные к диссимиляционной сульфатредукции, например, литоавтотрофная умеренно термофильная бактерия *Thermodesulfobium acidiphilum*, представитель новой филогенетической линии уровня филума (Frolov et al., 2017, 2021), и гипертермофильная архея '*Ca. Vulcanisaeta mutnovskia*' (Prokofeva et al., 2005; Chernyh et al., 2020; Frolov et al., 2021).

Кроме соединений серы и водорода, вулканические газы содержат и другие энергетически богатые неорганические соединения, которые могут являться субстратами для литотрофных термофилов, обитающих в горячих источниках, например, восстановленные соединения азота, прежде всего аммоний. Архейная нитрификация в источниках Камчатки была показана молекулярно-биологическими методами в широком диапазоне pH (2.5–7.4), температур (49–94°C) и других физико-химических параметров (Reigstad et al., 2008). В некоторых высокотемпературных источниках была показана высокая доля представителей *Thaumarchaeota* (Eme et al., 2013; Wemheuer et al., 2013). Однако, несмотря на достаточно высокое число аммоний-окисляющих гипертермофилов в источниках, получить чистые культуры этих прокариот так пока и не удалось. Только из источника с температурой 45°C была получена накопительная культура, где доминировала аммоний-окисляющая автотрофная архея '*Ca. Nitrosotenuis uzonensis*' (Lebedeva et al., 2013). Что касается аммоний-окисляющих термофильных бактерий, то данные об их существовании ограничиваются лишь получением из камчатских источников накопительных культур, развивающихся при 55°C (Головачева, 1976). Единственная термофильная нитритокисляющая бактерия, выделенная из горячего источника Камчатки, является представителем рода *Nitrospira* (Lebedeva et al., 2011). Продуктом окисления нитрита является нитрат, который используется в качестве акцептора электронов многими обитающими в горячих источниках факультативными анаэробами и микроаэрофилами – от типичных автотрофных бактерий филума *Aquificae* до типичных гетеротрофных представителей рода *Thermus* (Albuquerque et al., 2018).

Одним из часто обнаруживаемых компонентов вулканических газов является угарный газ (CO) (Symonds et al., 1994). Он не только поступает из недр земли, но и образуется в ходе термического и фотохимического разложения органиче-

ского вещества в самих источниках (Hellebrand, Schade, 2008). Из горячих источников Камчатки было выделено большое количество анаэробных гидрогеногенных карбоксидотрофных микроорганизмов, окисляющих CO до CO₂ с образованием водорода из воды. Прежде всего, это представители широко распространенного на Камчатке умеренно термофильного рода *Carboxydocella* – *C. thermautotrophica* (Sokolova et al., 2002; Toshchakov et al., 2018), *C. sporoproducens* (Slepova et al., 2006) и другие представители этого рода (Kochetkova et al., 2011), а также представители рода *Carboxydotherrmus* (Slepova et al., 2009), экстремально термофильная бактерия рода *Dictyoglomus* (Kochetkova et al., 2011) и гипертермофильная архея рода *Thermofilum* (Kochetkova et al., 2020a). При этом доля гидрогеногенных карбоксидотрофов в сообществах горячих источников невелика (Kochetkova et al., 2011), и, как правило, большинство представителей этой физиологической группы, помимо CO, способны использовать другие субстраты. Тем не менее, карбоксидотрофы играют важную роль микробного фильтра, удаляющего токсичный для большинства живых организмов угарный газ, образуя водород, используемый многими хемолито-трофными термофилами в качестве донора электронов.

Метан в горячих источниках Камчатки может иметь как абиогенное (компонент вулканических газов), так и биогенное происхождение. В кислых источниках на Камчатке он, по всей видимости, полностью имеет глубинное происхождение (Бонч-Осмоловская и соавт., 1999; Меркель и соавт., 2015). В то же время в источниках с нейтральными и слабощелочными условиями метан частично образуется в результате гидрогенотрофного метаногенеза, осуществляемого представителями порядка эвриархей *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomassiliicoccales* и *Methanocellales* (Меркель и соавт., 2015). Окисляется метан в горячих источниках аэробными метанотрофными бактериями. Из кислого источника кальдеры Узон был получен штамм '*Ca. Methyacidiphilum kamchatkense*', относящийся к филуму *Verrucomicrobia*, оптимально растущий при 55°C и pH 3.5 (Islam et al., 2008; Op den Camp et al., 2009). Молекулярно-биологическими методами было показано высокое содержание представителей этой ветви *Verrucomicrobia* в источниках со схожими характеристиками (Mardanov et al., 2011). В нейтральных же источниках на Камчатке за окисление метана отвечают аэробные представители *Proteobacteria* – умеренно термофильные бактерии родов *Methylothermus* и *Methylobacter* (Дворянчикова и соавт., 2011).

Глубинные гидротермальные воды несут большое количество восстановленного железа, которое в местах выхода на поверхность химически и биологически окисляется и откладывается в виде

нерастворимых оксидов железа (Слободкин, 2005). Среди окисляющих железо термофильных микроорганизмов на Камчатке широко распространены аэробные бактерии *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, обитающие в кислых источниках с умеренными температурами (Головачева, Каравайко, 1978). Совсем недавно было показано, что окисление железа может поддерживать жизнь термофильных прокариот и в нейтральных условиях, при этом единственным акцептором электронов служит уголекислота (Zavarzina et al., 2020). Процессы микробной трансформации минералов, содержащих окисленное и восстановленное железо, могли быть важными точками сопряжения биогеохимических циклов углерода и железа в биосфере ранней Земли (Walker, 1987; Zavarzina et al., 2020). Как и в случае соединений серы, соединения железа могут служить не только донорами, но и акцепторами электронов. “Железное дыхание”, открытое Балашовой и Заварзиным (1979), является глобальным биосферным процессом, связанным с биогеохимическими циклами углерода, кислорода и серы (Слободкин, 2005). Диссимиляционная железоредукция у термофилов впервые была показана на накопительной культуре, полученной из горячего источника Долины гейзеров, которая состояла из двух термофильных бактерий *Caldanaerobacter subterraneus* и *Thermolithobacter ferrireducens* и синтрофно окисляла ацетат, восстанавливая ферригидрит в магнетит (Слободкин и соавт., 1995). Позднее из камчатских горячих источников было выделено большое количество бактерий филума *Firmicutes*, способных к восстановлению железа: *Caldanaerobacter subterraneus* (Слободкин и соавт., 2011), *Thermoanaerobacter siderophilus* (Слободкин et al., 1999), *Thermovenabulum ferriorganovorum* (Zavarzina et al., 2002), *Carboxydocella thermautotrophica* (Sokolova et al., 2002) и *C. manganica* (Слободкина et al., 2012), *Carboxydotherrmus siderophilus* (Slepova et al., 2009), *Moorella humiferra* (Nepomnyashchaya et al., 2012). Также была выделена гипертермофильная архея *Pyrobaculum ferrireducens* (Слободкина et al., 2015a), растущая на пептидах за счет восстановления железа и других акцепторов (табл. 2).

Фотосинтезирующие микроорганизмы, являющиеся основными первичными продуцентами в мезофильных местах обитания, в горячих источниках лимитированы температурой — они могут развиваться лишь в источниках с температурой воды не выше 73°C (Brock, 1978; Boyd et al., 2012). Основные прокариотные фотосинтетики — цианобактерии — в горячих источниках на Камчатке обнаруживаются лишь при температуре ниже 60°C, а начинают доминировать только в мезофильных условиях (Горленко и соавт., 1987). Тем не менее, термофильные цианобактериальные маты горячих источников кальдеры Узон послужили моделью для изучения докембрийского со-

общества, активно формирующего кислородную атмосферу (Заварзин и соавт., 1989). Среди термофильных фототрофов на Камчатке преобладают бактерии родов *Chloroflexus*, и, в меньшей степени, *Roseoflexus*, относящиеся к филуму *Chloroflexi* (Горленко и соавт., 1987; Gaisin et al., 2016) и придающие матам оливковый цвет. Также в умеренно теплых матах развиваются пурпурные несерные бактерии *Rhodocyclus gelatinosus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*. Их присутствие объясняет оранжевый цвет матов (рис. 2в).

В фототрофных матах, а также в осадках горячих источников доля гетеротрофных прокариот значительно выше, чем в воде, и благодаря им не происходит большого накопления органики (Заварзин и соавт., 1989). Большинство гетеротрофных термофильных прокариот, населяющих горячие источники Камчатки, являются факультативными или строгими анаэробами (табл. 2). Согласно молекулярно-экологическим исследованиям микробных сообществ источников Камчатки, основными и наиболее часто встречающимися деструкторами являются представители таких бактериальных филумов, как *Dictyoglomi*, *Thermotogae*, *Firmicutes*, *Caldiserica*, *Deinococcus-Thermus* (Kublanov et al., 2009; Wemheuer et al., 2013; Rozanov et al., 2014a; Wilkins et al., 2019), многие из них были выделены в чистые культуры (табл. 2). Среди культивируемых гетеротрофных архей в нейтральных источниках с умеренно высокими температурами наиболее часто встречаются представители родов кренархеот *Fervidicoccus* и *Caldisphaera* (Perevalova et al., 2008; Kublanov et al., 2009; Merkel et al., 2017; Wilkins et al., 2019), в высокотемпературных (>80°C) — *Pyrobaculum* и *Thermoproteus* (Chernyh et al., 2015). В кислых источниках встречаются культивируемые гетеротрофные археи родов *Acidilobus*, *Thermoplasma*, *Acidiplasma*, а также некоторые представители ‘Ca. Microarchaeota’ (суперфилум DPANN), поддерживающиеся в накопительной культуре с археями-хозяевами порядка *Thermoplasmatales* (Prokofeva et al., 2005; Golyshina et al., 2019). Субстратами для гетеротрофных термофилов в источниках может служить огромный спектр органических соединений: сахара, включая полисахариды — компоненты клеток растений, водорослей и микроорганизмов, а также составляющие экзоскелет насекомых (целлюлоза, ксилан, крахмал, лихенан, хитин и др.); аминокислоты, пептиды и белки; липиды — компоненты клеточных мембран и запасных соединений клеток; углеводороды, образуемые в источниках из биомассы прокариот; низкомолекулярные органические соединения (кислоты, спирты, амиды и др.), образуемые в процессе сбраживания сахаров и пептидов (табл. 2).

Несмотря на внушительный список чистых культур термофильных бактерий и архей, выделен-

Таблица 2. Гетеротрофные прокариоты, выделенные из горячих источников Камчатки

Филум	Название	Субстрат	Акцептор ϵ	Опт. T°C/pH	Ссылка
Бактерии					
<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Meiothermus ruber</i>	Сахара, белковые соединения	O ₂	60/6.5–7.3	Loginaeva et al., 1984
<i>Dictyoglomi</i>	<i>Dictyoglomis turgidus</i> , <i>D. thermophilum</i> , <i>Dictyoglomis</i> sp.	Полисахариды, сахара, пептиды, СО	Без акцептора	72/7.0	Светличная, 1988; Kublanov et al., 2009; Kochetkova et al., 2011
	<i>Anaerobranca zavarzini</i>	Пептиды	Без акцептора, фумарат, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ⁰	54–60/8.5–9.0	Kevbrin et al., 2008
<i>Firmicutes</i>	<i>Anoxybacillus voinovskiensis</i> , <i>A. kamchatkensis</i>	Сахара, белковые соединения	O ₂ , NO ₃ ⁻ , без акцептора	54–60/7.0–8.5	Yumoto et al., 2004; Kevbrin et al., 2005
	<i>Caldanaerobacter uzonensis</i> , <i>C. subterraneus</i>	Сахара, пептиды, полисахариды, H ₂	S ₂ O ₃ ²⁻ , Fe ³⁺ , без акцептора	65–70/6.8	Kublanov et al., 2009; Kozina et al., 2010; Слободкин и соавт., 2011
	<i>Caldalkalibacillus uzonensis</i>	Белковые соединения, углеводороды	O ₂	50/8.2	Zhao et al., 2008
	<i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> , <i>C. hydrothermalis</i> , <i>C. bescii</i>	Полисахариды, сахара, белковые соединения	Без акцептора	65–80/7.0	Светличный и соавт., 1990; Miroshnichenko et al., 2008b
	<i>Carboxydotherrnus siderophilus</i>	СО, дрожжевой экстракт, сахара, лактаг	Fe ³⁺	65/6.5–7.2	Slepova et al., 2009
	<i>Geobacillus icigianus</i>	Сахара, белковые соединения	O ₂ , NO ₃ ⁻	60–65/6.5–7.0	Bryanskaya et al., 2015
	<i>Moorella humiferrea</i>	Органические кислоты, дрожжевой экстракт, сахара	Fe ³⁺ , S ₂ O ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , гуминовые кислоты, перхлорат	65/7.0	Неромнуашчаева et al., 2012
	<i>Terpidibaculum saccharolyticum</i>	Сахара, полисахариды, белковые соединения	Без акцептора	50/8.0–9.0	Slobodkina et al., 2018
	<i>Thermoanaerobacter sulfurophilus</i> , <i>T. uzonensis</i>	Сахара, полисахариды, оргкислоты, белковые соединения	S ⁰ , без акцептора	55–60/6.8–7.2	Бонч-Осмоловская и соавт., 1997; Wagner et al., 2008
	<i>Thermoanaerobacterium aciditolerans</i>	Пептиды, полисахариды	S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ²⁻ , без акцептора	55/5.7	Kublanov et al., 2007
	<i>Thermopnebulum ferriorganovorium</i>	Белковые соединения, сахара, органические кислоты, крахмал	Fe ³⁺ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻	65/6.7	Zavarzina et al., 2002

Таблица 2. Окончание

Филум	Название	Субстрат	Акцептор \bar{e}	Опт. T°C/pH	Ссылка
<i>Nitrospirae</i>	<i>Thermodesulfobivrio aggregans</i>	H ₂ и ацетат	SO ₄ ²⁻	65/5.5	Frolov et al., 2021
<i>Planctomycetes</i>	<i>Therdisphaera mucosa</i>	Сахара, полисахариды	O ₂ , без акцептора	47–50/7.0–7.5	Kovaleva et al., 2015
	<i>Thermogemmata fonticola</i>	Сахара, полисахариды	O ₂	54–60/7.5	Eicheninov et al., 2021
<i>Synergistetes</i>	<i>Thermapaerovibrio velox</i>	Сахара, пептиды	S ⁰ , без акцептора	60–65/7.3	Zavarzina et al., 2000
<i>Verrucomicrobia</i>	'Ca. Methylocacidiphilum kamchatkense'	Метан, метанол	O ₂	55/3.5	Islam et al., 2008; Op den Camp et al., 2009
Археи					
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Acidilobus aceticus</i> , <i>A. saccharovorans</i>	Крахмал, белковые соединения, углеводороды	S ⁰ , без акцептора	85/3.8	Prokofeva et al., 2000, 2009
	<i>Desulfurococcus amylolyticus</i> , <i>D. mucosus</i>	Пептиды, полисахариды	S ⁰ , без акцептора	85–90/6.4	Бонч-Осмоловская и соавт., 1988; Perevalova et al., 2016
	<i>Fervidicoccus fontis</i>	Белковые соединения, липиды	S ⁰ , без акцептора	67/5.6	Perevalova et al., 2010; Карасева и соавт., 2021
	<i>Infirmifilum uzonense</i>	Полисахариды, белковые соединения, сахара	Без акцептора	85/6.0–6.5	Toshchakov et al., 2015
	<i>Ryrobaculum ferrireducens</i>	Пептиды	Fe ³⁺ , S ₂ O ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , селенит, селенат и арсенат	90–95/6–7	Slobodkina et al., 2015a
	' <i>Sulfolobus islandicus</i> '	S ⁰ и пептиды	O ₂	75/3.5	Whitaker et al., 2003
	<i>Thermofilum adomatium</i>	Полисахариды, белковые соединения, сахара, СО	S ⁰ , без акцептора	80/5.5–6.0	Kochetkova et al., 2020a; Zayulina et al., 2020b
	<i>Thermogladius calderae</i>	Полисахариды, белковые соединения, сахара	S ⁰ , без акцептора	84/7.1	Kochetkova et al., 2016
	' <i>Thermoproteus uzoniensis</i> '	Пептиды	S ⁰ , без акцептора	90/5.7	Bonch-Osmolovskaya et al., 1990b
	'Ca. Vulcanisaeta moutnovskia'	Дрожжевой экстракт, пептон	SO ₄ ²⁻	84/4.8	Prokofeva et al., 2005; Chernyuh et al., 2020
	<i>Methanohalobium thermacetophilum</i>	Ацетат	CO ₂	65	Ноженикова и Чудина, 1984
	<i>Thermoplasma</i> sp.	Сахара, дрожжевой экстракт	O ₂ , S ⁰	60/3.0	Prokofeva et al., 2005

ных к настоящему моменту из горячих источников Камчатки (табл. 1 и 2), основная масса таксонов была выявлена только при помощи молекулярно-экологических методов. При этом некультивируемые представители в ряде горячих источников доминируют или составляют значимую часть сообществ. Например, в сообществе источника Заварзина (рис. 2г, 60°C/6.5), активно исследуемого многие десятилетия, четвертая часть всего разнообразия микроорганизмов относится к некультивируемым бактериям, в том числе, уровня нового филума (Burgess et al., 2012). В другом модельном источнике – Солнечный (61–64°C/5.8) – половина сообщества состоит из некультивируемых бактерий (Menzel et al., 2015). Что касается архей, то в кислых источниках велика доля представителей Terrestrial Hot Spring Group (THSG) (Merkel et al., 2017) и Hot Thaumarchaeota-related Clade (HTC) (Eme et al., 2013; Mardanov et al., 2018). В источниках с pH от 3 до 6 и температурой до 65°C детектируется большое количество некультивируемых представителей *Thermoplasmatales* (группа A10) (Merkel et al., 2017; Golyshina et al., 2019; Wilkins et al., 2019) и *Crenarchaeota* (Меркель и соавт., 2016). С повышением температуры выше 70°C резко возрастает доля представителей суперфилума DPANN, являющихся симбионтами различных гипертермофильных архей и составляющих порой до 50% от всего сообщества (Chernyh et al., 2015; Merkel et al., 2017). В горячих источниках с околонеутральным pH часто обнаруживаются представители филума *Korarchaeota* (Reigstad et al., 2010; Wilkins et al., 2019). Роль большинства вышеперечисленных некультивируемых архей в микробных сообществах гидротерм остается малоизученной.

Как мы видим, многие из широко представленных в горячих источниках Камчатки таксонов некультивируемых микроорганизмов относятся к археям. Благодаря развитию молекулярно-экологических методов, к сегодняшнему дню стало понятно, что археи составляют значительную часть суммарной микробной биомассы Земли и играют большую роль в глобальных циклах химических элементов и, в первую очередь, в местообитаниях с умеренными физико-химическими параметрами (Karner et al., 2001; Fry et al., 2008; Adam et al., 2017). Несмотря на это, археи до сих пор ассоциируются с экстремальными экотопами. Это связано с тем, что подавляющее большинство культивируемых архей является экстремофилами. В этой связи важно оценить соотношение архей и бактерий в горячих источниках, исходя из всех имеющихся на сегодняшний день данных. Сравнительный анализ соотношения количества обнаруженных молекулярными методами бактерий и архей в камчатских горячих источниках в зависимости от температуры не выявил тенденции превалирования архей с увеличением температуры (рис. 3а). При этом археи доминируют в гидро-

термах с низкими значениями pH (3–4) (рис. 3б), а в источниках с pH выше 4, напротив, как правило, преобладают бактерии (рис. 3б). Однако есть и исключения: в диапазоне pH от 5 до 6 также встречаются источники, где археи составляют внушительную долю, вплоть до 50–97% (Меркель и соавт., 2016; Merkel et al., 2017; Mardanov et al., 2018; наши неопубликованные данные).

Таким образом, в горячих источниках Камчатки развивается сообщество в основном хемотрофных термофильных прокариот, среди которых главную роль играют микроорганизмы цикла серы и водорода. Развитие методов секвенирования позволило выявить доминирующих прокариот, некоторые из них были успешно выделены в чистые культуры и охарактеризованы. Тем не менее, наибольшая часть сообщества, и прежде всего, архейная составляющая, по-прежнему остается некультивируемой и малоизученной.

Горячие источники Курильских островов

Курильские острова – это цепь островов с высокой сейсмической активностью и большим количеством действующих вулканов и горячих источников (рис. 1в, 4а). Самый южный остров архипелага – о. Кунашир – является наиболее изученным с геологической и микробиологической точек зрения. Проявления гидротермальной активности на острове Кунашир сосредоточены, в основном, на юге – в кальдере вулкана Головнина и около вулкана Менделеева. Помимо них на Охотском побережье острова имеются еще две группы источников: южная, расположенная под сольфатарным полем на Внешнем куполе, и северная – вблизи поселка Алехино (Зотов и соавт., 1988). В участках проявления активной сольфатарной деятельности воды термальных источников характеризуются низкими значениями pH; разгружающиеся за пределами этих участков термальные воды, как правило, нейтральные или слабощелочные. Присутствие нейтральных источников на сольфатарных полях и близкое соседство их с кислыми источниками характерно для кальдеры Головнина. По анионному составу оба типа вод сульфатно-хлоридные (Зотов и соавт., 1988). В районе вулкана Менделеева располагаются Третьяковские, Валентиновские и Столбовские горячие источники.

Так же как и на Камчатке, в горячих источниках Кунашира соединения серы максимально широко вовлечены в метаболизм микробных сообществ. Основное отличие курильских гидротерм от камчатских состоит в том, что на Курильских островах довольно большая часть источников проявляется в приливно-отливной зоне и на мелководных участках побережья. С использованием радиоизотопных методов удалось показать, что на литорали в мелководных гидротермах бух-

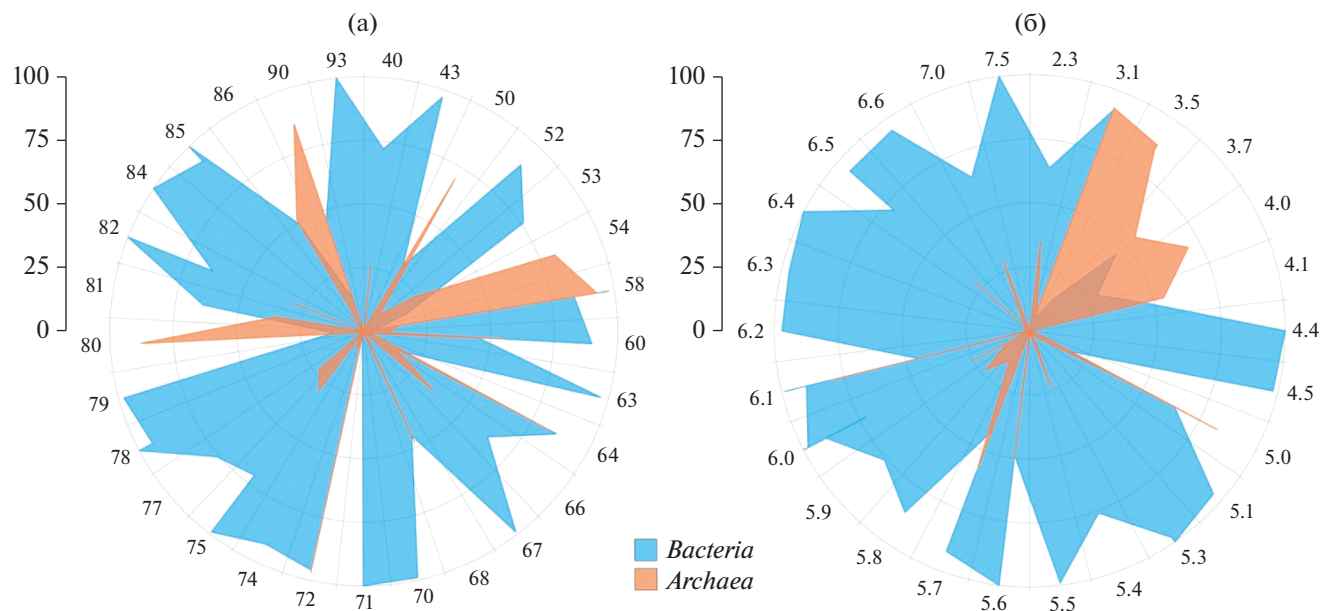


Рис. 3. Соотношение бактерий и архей в микробных сообществах горячих источников на Камчатке в зависимости от температуры (а) и рН (б). Значения на шкале отражают процент представленности домена в микробном сообществе. Данные были взяты из следующих источников (Mardanov et al., 2011; Rozanov et al., 2014; Добрецов и соавт., 2015; Меркель и соавт., 2016; Merkel et al., 2017; Mardanov et al., 2018; наши неопубликованные данные).

ты Кратерной скорость серoredукции опережает другие процессы (например, скорость автотрофного метаногенеза, сульфатредукции) на один–два порядка и является основным терминальным восстановительным процессом, в отличие от глубоководных источников, где скорость серoredукции на порядок ниже скорости других процессов (Бонч-Осмоловская и соавт., 1993). Одними из первых термофилов, выделенных из кунаширских источников, были серoredуцирующие гипертермофильные гетеротрофные археи – *Desulfurococcus amylolyticus* (Бонч-Осмоловская и соавт., 1988), *Thermococcus stetteri* (Miroshnichenko et al., 1989) и *T. litoralis* (Светличный и соавт., 1987) (табл. 3). *D. amylolyticus* был выделен из наземной гидротермы, однако молекулярно-экологические исследования показали присутствие представителей *Desulfurococcus* и в морских мелководных гидротермах Кунашира, что ранее считалось нехарактерным местообитанием для этого рода (Первалова и соавт., 2003).

Помимо процессов серoredукции, в мелководных источниках бухты Кратерной радиоизотопными методами были исследованы процессы анаэробной деструкции и ассимиляции органического углерода. Было показано, что деструкция органического вещества в таких источниках характеризуется высокой скоростью и завершается метаногенезом, сульфат- или серoredукцией (Намсараев и соавт., 1994). С помощью классических микробиологических подходов из наземных и морских гидротерм Кунашира удалось выде-

лить большое количество микроорганизмов-деструкторов (табл. 3), зачастую представителей новых таксонов: *Fervidobacterium riparium* (Podosokorskaya et al., 2011), *Thermogutta terrifontis* (Slobodkina et al., 2015b), *Calorithrix insularis* (Kompantseva et al., 2017), *Tenuifilum thalassicum* (Podosokorskaya et al., 2020). В гетеротрофных накопительных культурах, полученных при посеве образцов из термальных источников Кунашира, было показано присутствие представителей глубокой ветви архей, принадлежащих суперфилуму DPANN – ‘Ca. Micrarchaeota’ (Golyshina et al., 2019), а также потенциальных хозяев этих микроорганизмов – представителей рода *Cuniculiplasma*, и других архей порядка *Thermoplasmatales*.

Для высокотемпературных прибрежных гидротерм Кунашира отмечены незначительные скорости фиксации углекислоты в биомассу и метан, что объясняется наличием большого количества доступной органики, привносимой из низкотемпературных зон (Намсараев и соавт., 1994). Тем не менее, из курильских источников, как морских, так и наземных, был успешно выделен ряд хемолитоавтотрофных термофильных бактерий (табл. 3). Большинство из них используют различные соединения серы в качестве донора (элементарная сера, тиосульфат) или акцептора электронов (сульфит, сернистый газ) и представляют новые таксоны внутри филумов *Proteobacteria*, например, *Inmirania thermothiophila*, *Dissulfurirhabdus thermomarina* (Slobodkina et al., 2016a, 2016b), и *Firmicutes* – *Thermodesulfitimonas autotro-*

Таблица 3. Термофильные прокариоты, выделенные из природных горячих источников Курильских островов

Филум	Название	Субстрат	Акцептор \bar{e}	Опт. $T^{\circ}C/pH$	Ссылка
Бактерии					
<i>Bacteroidota</i>	<i>Tenuifilum thalassicum</i>	Полисахариды, сахара, белковые соединения	Без акцептора	50/6.5–7.0	Podoskorskaaya et al., 2020
<i>Calditrichota</i>	<i>Calorithrix insularis</i>	Полисахариды, сахара, белковые соединения	NO_3^- , без акцептора	55/6.6	Komprantseva et al., 2017
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Дрожжевой экстракт и простые сахара	O_2	65–70/3.5–4.0	Логинова и соавт., 1978
	<i>Carboxidothermus hydrogenoformans</i>	CO , органические кислоты, глицерин, H_2/CO_2	H_2O , $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-} , S^0 , NO_3^- , фумарат	70–72/6.8–7.0	Svetlichny et al., 1991b
	<i>Thermincola ferriacetica</i>	CO , органические кислоты, белковые соединения, гликоген, H_2/CO_2	Окись железа, MnO_2 , $S_2O_3^{2-}$	60/7.0	Zavarzina et al., 2007
	<i>Thermodesulfurimonas autotrophica</i>	H_2/CO_2	SO_3^{2-} , SO_2	65/6.0–6.5	Slobodkina et al., 2017
<i>Planctomycetes</i>	<i>Thermogutta terrifontis</i>	Сахара, полисахариды	O_2 , NO_3^- , NO_2^- , без акцептора	55–60/6.0–6.5	Slobodkina et al., 2015b
<i>Proteobacteria</i>	<i>Immirania thermoithiophila</i>	S^0 , $S_2O_3^{2-}/CO_2$, органические кислоты, белковые соединения	NO_3^-	65/6.5	Slobodkina et al., 2016a
	<i>Dissulfurirhabdus thermomarina</i>	H_2/CO_2	SO_3^{2-} , SO_2	50/6.0–6.5	Slobodkina et al., 2016b
<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Thermosulfurimonas marina</i>	S^0 , SO_3 , $S_2O_3^{2-}/CO_2$	NO_3^-	74/6.7–7.0	Фролова и соавт., 2018
<i>Thermotogota</i>	<i>Fervidobacterium riparium</i>	Полисахариды, сахара, белковые субстраты	Без акцептора	65/7.8	Podoskorskaaya et al., 2011
Археи					
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Aciditobus aceticus</i>	Крахмал, сахара, белковые соединения	S^0 , без акцептора	85/3.5	Prokofeva et al., 2005
	<i>Desulfurococcus amylophilicus</i>	Пептиды, полисахариды	S^0 , без акцептора	90/6.4	Бонч-Осмоловская и соавт., 1988
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Thermococcus litoralis</i> , <i>T. stetteri</i> , <i>Thermococcus</i> sp.	Пептиды, аминокислоты, полисахариды	S^0 , без акцептора	75–85/6.5	Светличный и соавт., 1987; Miroshnichenko et al., 1989; Gavrilov et al., 2016

phica (Slobodkina et al., 2017). Также из горячих источников о. Кунашир были выделены и описаны термофильные факультативные хемолитоавтотрофные бактерии, не связанные с циклом серы. Так, микробиологическими методами в морских и наземных гидротермах было показано широкое распространение термофильных анаэробных карбоксидотрофов (Svetlichny et al., 1991a). В чистые культуры были выделены представители филума *Firmicutes*, способные окислять CO с образованием водорода из воды — *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* (Svetlichny et al., 1991b), или восстанавливая оксид Fe³⁺ — *Thermincola ferriacetica* (Zavarzina et al., 2007). В термальных источниках Кунашира, включая источники с температурой более 74°C, молекулярными и изотопными методами было показано присутствие метанотрофных бактерий. Помимо представителей аэробных родов *Methylocystis* и *Methylothermus*, были выявлены ранее неизвестные метанотрофы глубоких ветвей *Gammaproteobacteria* (Kizilova et al., 2014).

Представленные данные говорят о том, что, в целом, будучи похожими на гидротермы Камчатки (например, высоким содержанием разнообразных соединений серы), горячие источники Курильских островов обладают не меньшим, а возможно, и большим многообразием физико-химических параметров (за счет морской воды прибрежных гидротерм). Это определяет широчайшее разнообразие населяющих их микробных сообществ и вариативность метаболизма последних. В этой связи можно ожидать, что их дальнейшее всестороннее исследование с использованием разнообразных подходов, как включающих, так и минуящих стадию культивирования, может дать интересные результаты.

ГОРЯЧИЕ ИСТОЧНИКИ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ

Байкальская рифтовая зона — глубинный разлом земной коры, простирающийся в северо-восточном направлении от Монголии до Восточных Саян с центром под озером Байкал (рис. 16). Вся рифтовая система высокосейсмична, земная кора на всем протяжении утончена (Логачев, 2003). Этим объясняется высокая гидротермальная активность в регионе и большое количество термальных источников, включая высокотемпературные (до 90°C). Гидротермы Байкальской рифтовой зоны (рис. 46) относятся к типу азотных термальных источников, формирующихся за счет инфильтрационных вод, проникающих на значительные глубины. Вследствие этого термальный флюид характеризуется отрицательными значениями Eh и высоким pH (до 10). В газовом составе байкальских гидротерм доминирует азот (до 95%), также обнаруживается метан и сероводород (Борисенко, Замана, 1978). По химическому составу

высокотемпературные гидротермы Байкальского рифта делятся на четыре типа: горячинский, аллинский, кульдурский и питателевский. К горячинскому типу относятся сульфатно-натриевые источники, расположенные по горным хребтам (Нилова Пустынь, Гусиха, Гарга и др.) и на побережье о. Байкал (Горячинск, Хакусы, Давша) с pH до 8.4. Источники Алла, Уро, бассейна реки Баргузин и ряда других рек относятся к аллинскому типу и характеризуются широким диапазоном концентрации сульфатов и гидрокарбонатов и pH 7–8. Источники, расположенные в северо-восточной части рифтовой системы, относятся к кульдурскому фторидно-гидрокарбонатно-натриевому типу с относительно высоким содержанием сероводорода биогенного происхождения (источники Котельниковский, Кучигер, Умхей, Большереченский и др.) и температурами до 75°C. Питателевские источники выделены в отдельный тип азотно-кремнистых хлоридно-сульфатных и хлоридно-карбонатных терм (см. ссылку Намсараев, 2008).

В отличие от камчатских горячих источников, основными первичными продуцентами в исследованных гидротермах Байкала являются цианобактерии. В микробных матах, а также в воде, покрывающей маты, начиная от 70°C и ниже, термофильные цианобактерии представлены, в основном, родами *Leptolyngbya*, *Synechococcus* и *Nostoc*, которые составляют до 70% от всего сообщества. В Уринском термальном источнике, характеризующемся отсутствием растворенного сероводорода, доминирующими были цианобактерии рода *Phormidium*, численность которых составляла более 90% в верхних слоях матов, и рода *Mastigocladus*, доминировавших в нижних слоях (Брянская и соавт., 2006). В то же время в Большереченском горячем источнике доминировали исключительно цианобактерии рода *Phormidium*, а *Mastigocladus* не встречался, что, судя по всему, обусловлено высоким содержанием сульфида (13.4 мг/л). Радиоизотопными методами было показано, что скорость фотосинтеза, как и в камчатских фототрофных сообществах, постепенно возрастает с понижением температуры, при этом аноксигенный фотосинтез с понижением температуры сменяется на оксигенный, что является следствием повышения доли цианобактерий в сообществах (Намсараев и соавт., 2003). За аноксигенный фотосинтез здесь (также как и на Камчатке) отвечают несерные фототрофные нитчатые бактерии родов *Chloroflexus* и/или *Roseoflexus* (Брянская и соавт., 2006; Калашников и соавт., 2014; Gaisin et al., 2015; Rozanov et al., 2017a; Будагаева и соавт., 2021).

В горячем источнике Алла наряду с представителями *Chloroflexi* и *Proteobacteria* в микробных матах молекулярными методами было показано, что значительную долю сообщества составляют некультивируемые бактерии ‘*Ca. Atribacteria*’



Рис. 4. Горячие источники: а – Курильских островов; б – в районе озера Байкал; в – Чукотки; г – Северного Кавказа (Северной Осетии).

(15–30% от всего сообщества) и бактерии класса *Nitrospirae* (Будагаева и соавт., 2021). Представители последнего были обнаружены впервые в горячих источниках Гарги (Lebedeva et al., 2005), а позднее из образцов Горячинского источника был получен микробный консорциум, где доминировала '*Nitrospira calida*' (Lebedeva et al., 2011).

В осадках горячего источника Алла, расположенных под фототрофными матами, основную часть сообщества (до 60%) составляют некультивируемые бактерии '*Ca. Acetothermia*' (Будагаева и соавт., 2021). Представители этой глубокой линии бактерий обнаруживаются не только в осадках горячих источников (Hedlund et al., 2015), но и в подземных микробных матах и нефтяных месторождениях со сходными температурами (Takami et al., 2012; Hu et al., 2016), а также мезофильных осадках морей, соленых озер и анаэробных биореакторов (Нао et al., 2018). Однако представленность этой группы в вышеуказанных сообществах всегда была невысокая. В горячем источнике Байкальской рифтовой зоны, таким образом, была обнаружена на сегодняшний момент самая высокая численность представителей

'*Ca. Acetothermia*', что указывает на важную роль этих бактерий в сообществе.

Вместе с тем, несмотря на доминирование в микробных сообществах байкальских источников бактерий глубоких филогенетических линий, опубликованные чистые культуры (табл. 4) относятся к достаточно хорошо изученным филумам *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus* и *Proteobacteria* (Храпцова и соавт., 1984; Nazina et al., 2004; Kublanov et al., 2009; Бабасанова и соавт., 2013; Rozanov et al., 2017b; Jung et al., 2018). Среди бактерий-деструкторов только представители филума *Planctomycetes*, выделенные из горячих источников Умхей и поселка Горячинск, оказались филогенетически далекими от уже известных представителей, что позволило описать новый порядок *Tepidisphaerales* (Kovaleva et al., 2015).

Важной и активно исследуемой группой бактерий, обитающих в источниках Байкальского рифта, являются метанотрофы. Активное окисление метана было показано радиоизотопным методом в образцах донных отложений байкальских гидротерм с температурами на изливе 48–55°C (Цыренжапова и соавт., 2007). Более того, из этих экотопов удалось выделить первого термотоле-

Таблица 4. Термофильные прокариоты, выделенные из горячих источников других регионов

Филум	Название	Субстрат	Акцептор e	Опт. T°С/pH	Ссылка
Термофильные прокариоты, выделенные из горячих источников Байкальского региона					
<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Ацетат, NB/R2A – medium*	S ₂ O ₃ ²⁻ , O ₂	50–55/8.0–8.5	Намсараев и соавт., 2003., Jung et al., 2018
<i>Deinococcus–Thermus</i>	<i>Meiothermus ruber</i> , <i>Meiothermus</i> sp. **	Дрожжевой экстракт	O ₂	60–65/7.5–8.0, 70–75/7.5–8.0	Храпцова и соавт., 1984; Jung et al., 2018
<i>Nitrospirae</i>	<i>Thermus</i> sp. **	NB/R2A – medium*	O ₂	55	Jung et al., 2018
<i>Nitrospirae</i>	* <i>Nitrospira calida</i>	NO ₂ ⁻	O ₂	46–52/7.8	Lebedeva et al., 2011
<i>Proteobacteria</i>	<i>Azoarcus</i> sp. **, <i>Caldimonas manganoxidans</i> , <i>Curvibacter fontanus</i> , <i>Dechloromonas agitate</i> , <i>Petrobacter succinatimandens</i> , <i>Tepidicella xavieri</i> , <i>Tepidimonas</i> sp. **, <i>Silanimonas lenta</i> , <i>Thermomonas hydrothermalis</i>	NB/R2A – medium*	O ₂	55	Jung et al., 2018
<i>Firmicutes</i>	<i>Aneurinibacillus</i> sp. **, <i>Brevibacillus</i> sp. **, <i>Raenibacillus</i> sp. **, <i>Анохубациллус</i> sp. **, <i>Bacillus</i> sp. **, <i>Geobacillus</i> sp. **, <i>Geobacillus gargiensis</i>	NB/R2A – medium*	O ₂	55	Jung et al., 2018
	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Сахара, органические, углеводороды	O ₂	60–65/7.0–8.5	Nazina et al., 2004
	<i>Thermincola carboxyiphila</i>	Аминокислоты, дрожжевой экстракт	O ₂	50–60	Rozanov et al., 2017b
	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	CO	H ₂ O	55/8.0	Sokolova et al., 2005
	<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>	Кератины	Без акцептора	60/9.3	Kublanov et al., 2009
		Белковые соединения, аминокислоты	Fe ³⁺	50/7.5–8.0	Slobodkin et al., 2006

Таблица 4. Окончание

Филум	Название	Субстрат	Акцептор \bar{e}	Опт. T°C/pH	Ссылка
<i>Planctomycetes</i>	<i>Terpidisphaera mcosa</i>	Сахара, полисахариды	O ₂ , без акцептора	47–50/7.0–7.5	Kovaleva et al., 2015
<i>Thaumarchaeota</i>	'Ca. Nitrosphaera gargensis'	NH ₄ ⁺	O ₂	46	Hatzenpichler et al., 2008
Термофильные прокариоты, выделенные из горячих источников Чукотки					
<i>Chloroflexi</i>	<i>Terpidiforma bonchosmolovskayae</i>	Полисахариды, органические кислоты, белковые соединения, лигнин, FeCO ₃ /CO ₂	O ₂	50–54/7.2	Kochetkova et al., 2020c
<i>Proteobacteria</i>	<i>Arenimonas fontis</i>	Полисахариды, кератины, белковые соединения	O ₂	50/7.5	Zayulina et al., 2020a
Термофильные прокариоты, выделенные из горячих источников острова Сахалин					
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus acidocaldarius</i>	Сахара, белковые соединения	O ₂	65/3.3–4.0	Логинова и соавт., 1978
	<i>Calorimonas adulescens</i>	Метаксилированные ароматические соединения, углеводы, пептиды	Без акцептора	60/5.5–6.0	Khomyakova et al., 2020
Термофильные прокариоты, выделенные из горячих источников Северного Кавказа					
<i>Nitrospirae</i>	'Ca. Nitrospira inopinata'	NH ₄ ⁺ /CO ₂	O ₂	46/7.8	Daims et al., 2015

* NB/R2A – medium содержит в своем составе мясной экстракт, пептон, казеиновые кислоты, декстрозу, крахмал, пируват.

*** sp. – обозначает, что в статье Jung et al. (2018) выделено несколько видов данного рода.

рантного представителя рода *Methylocystis* sp. (Троценко и соавт., 2009). В последующих работах методами молекулярной экологии было показано широкое распространение и активность метанотрофов в сообществах, развивающихся в прибрежных гидротермах оз. Байкал (Зеленкина и соавт., 2009). Анализ фрагмента гена *pmoA* показал, что при температурах 45–51°C, наблюдаемых в этих источниках, отмечается преобладание метанотрофов II типа, а именно представителей родов *Methylocystis* и *Methylosinus*, и только в одной накопительной культуре был обнаружен метанотроф I типа, имеющий не более 80% сходства по гену *pmoA* с *Methylococcus capsulatus*, однако в чистые культуры выделить данных представителей не удалось. Так же как на Камчатке и на Курилах, в байкальских гидротермах обитают анаэробные гидрогеногенные CO-трофы (Sokolova et al., 2005).

Археи обнаруживаются в байкальских щелочных источниках при температурах ≥ 70 –75°C, иногда составляя значимые доли сообщества (до 20%) (Perevalova et al., 2008; Rozanov et al., 2017a). Среди культивируемых архей наиболее многочисленными относятся или близки к кренархейным родам *Thermoproteus*, *Vulcanisaeta*, а также другим гетеротрофным родам порядка *Thermoproteales*, обычно встречающихся в кислых горячих источниках (Rozanov et al., 2017a). При более низких температурах была получена одна накопительная культура архей – ‘*Ca. Nitrososphaera gargensis*’, принадлежащая филуму *Thaumarchaeota* (Hatzenpichler et al., 2008). Эта архея является умеренно термофильным организмом и способна к окислению аммония, а образованный ей нитрит окисляют до нитрата бактерии рода *Nitrospira*, о которых речь шла выше (Lebedeva et al., 2011).

Отдельно нужно сказать о горячих источниках Восточно-Тувинского нагорья, которые относятся к Байкальской рифтовой зоне, однако географически сильно удалены от вышеописанных источников района озера Байкал. В самом большом разломе нагорья находятся Уш-Бельдирские горячие источники азот-кремнистого типа (Пиннеркер, 1968). Для этих источников характерны умеренно высокие температуры (около 55°C), низкая минерализация и высокая щелочность (рН около 9.8). Источник “Дикий аржаан” с температурой и рН воды 56°C и 9.2 соответственно, является пока единственным, где проводились исследования микробных сообществ (Корженков и соавт., 2018). Профилирование образцов микробных матов с применением высокопроизводительного секвенирования ампликонов участка V4 гена 16S рРНК показало, что в сообществе доминируют (20–30%) представители некультивируемого филума ‘*Ca. Acetothermia*’, что также было показано для одной из Байкальских гидротерм (см. выше). Эти бактерии, скорее всего, являются анаэробными факультативными хемолитоавтотрофами

(Takami et al., 2012), и, таким образом, играют роль первичных продуцентов. Кроме того, существенную часть микробного сообщества составили бактерии семейства *Thermodesulfobionaceae* (филум *Nitrospirae*, до 18%), фототрофные бактерии *Roseoflexus* и некультивируемые хемогетеротрофные бактерии класса *Anaerolinea* (последние два относятся к филуму *Chloroflexi*, составляя в сумме 25–33% сообщества). Археи в тувинском источнике составляют не более 6% и представлены некультивируемыми *Crenarchaeota*.

Таким образом, в микробных сообществах горячих источников Байкальской рифтовой зоны, в основном, доминируют процессы фотосинтеза, где первичную роль играют термофильные цианобактерии и представители филума *Chloroflexi*. Хемотрофы представлены либо гетеротрофными бактериями, некоторые из которых выделены в чистые культуры, либо прокариотами с предположительно автотрофным типом метаболизма и в большинстве своем некультивируемыми. Микробные сообщества горячих источников Байкальской рифтовой зоны, в общих чертах, сходны между собой, а также с микробиомами горячих источников соседних регионов Китая и Индии (Lau et al., 2009; Panda et al., 2016).

ГОРЯЧИЕ ИСТОЧНИКИ ДРУГИХ РЕГИОНОВ

Горячие источники Чукотки

Горячие источники полуострова Чукотка расположены в Арктическом регионе, где повсеместно распространена криолитозона. Несмотря на то, что на Чукотке нет проявлений современного вулканизма, на полуострове, особенно в северо-восточной его части (рис. 1в), обнаружено большое количество горячих источников с температурой воды вплоть до 94–97°C (Polyak et al., 2013; Kochetkova et al., 2020b). Источники на Чукотке относятся к хлоридно-карбонатному типу с малым содержанием сульфатов и различной минерализацией. Основные выделяющиеся газы – это азот и углекислота, в следовых количествах обнаруживают водород, метан и CO. Значения рН в источниках соответствуют околонеutralным или слабощелочным условиям, что отражает невулканическую природу формирования гидротермальных выходов (Polyak et al., 2013). Горячие источники Чукотки, по нашим данным, являются самыми высокотемпературными источниками, разгружающимися в зоне вечной мерзлоты, а также самыми северными горячими источниками РФ (Kochetkova et al., 2020b).

Первое исследование микробных сообществ гидротерм Чукотки, а именно Мечигменских, Сенявинских и Чаплинских, было проведено совсем недавно (Kochetkova et al., 2020b). Молеку-

лярными методами было показано, что доминируют там термофильные аэробные или факультативно анаэробные бактерии. Археи обнаружены в минорных количествах (не более 7% от сообщества) и представлены, в основном, некультивируемыми филумами, такими как *Bathyarchaeota*, *Aigarchaeota* и *Thaumarchaeota*. В микробных матах, обильно развивающихся в горячих ручьях и источниках с температурой ниже 75°C, доминирующим таксоном являются фототрофные несерные бактерии рода *Chloroflexus*, составляя порой до 80% от всего сообщества. В более высокотемпературных источниках большую часть сообщества составляют микроаэрофильные хемолитоавтотрофные бактерии филума *Aquificae*. В горячих ручьях они образуют бело-серые хорошо видимые обрастания (но не такие обильные, как на Камчатке) и представлены, в основном, родами *Sulfurihydrogenibium* и *Hydrogenobacter*, которые составляют от 70 до 92% от всего сообщества. В осадках горячих источников доля *Aquificae* меньше, но тоже значительна — от 15 до 50%. Донором электронов для столь обильного развития *Aquificae* на Чукотке, где отсутствуют растворимые восстановленные соединения серы, может служить либо пирит, либо восстановленное железо, обнаруженное в большом количестве в воде и осадках термальных источников (рис. 4в). Помимо факультативно автотрофных *Aquificae* в осадках были обнаружены представители различных филумов бактерий, таких как *Deinococcus-Thermus*, *Dictyoglomi*, *Thermotogae*, *Armatimonadetes* и *Proteobacteria*.

Помимо филумов и классов, для которых известны культивируемые представители, в источниках Чукотки было выявлено много бактерий глубоких некультивируемых линий. Представителя одной из них, группы OLB14, уровня нового класса внутри *Chloroflexi*, удалось выделить в чистую культуру и описать ее свойства (табл. 4). *Tepidiforma bonchosmolovskaya* является умеренным термофилом, аэробом, способным расти на разнообразных органических субстратах (от ацетата до лигнина), а также автотрофно на сидерите (FeCO₃), окисляя его до магнетита (Kochetkova et al., 2020c). Последнее свойство укрепило гипотезу о том, что обильно развивающиеся литоавтотрофные бактерии в горячих источниках Чукотки могут использовать для роста энергию окислительно-восстановительных реакций с участием железа, входящего в состав минералов (Kochetkova et al., 2020b). Также из источника на Чукотке был выделен первый термофильный представитель рода *Arenimonas* (*A. fontis*, филум *Proteobacteria*), ранее обнаруживаемый исключительно в мезофильных экосистемах (Zayulina et al., 2020a).

Таким образом, в горячих источниках Чукотки, несмотря на невулканическое происхождение, доминирующими таксонами, так же как и в

вулканических гидротермах по всему миру (см. раздел “Горячие источники Курило-Камчатского региона”), являются представители факультативных литоавтотрофных бактерий филума *Aquificae*. Вместе с факультативными фотоавтотрофными бактериями рода *Chloroflexus* они практически полностью вытесняют других фототрофов, в первую очередь цианобактерий, из этих арктических гидротерм. Самое заметное отличие микробного разнообразия этих источников от регионов с активной вулканической деятельностью — это полное отсутствие архей филумов *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*.

Горячие источники о. Сахалин

Термальные источники острова Сахалин, в основном, относятся к типу минерализованных (до 8 г/л), слабощелочных (pH 7.4–8.5) с хлоридно-натриевыми водами и невысокими температурами, в редких случаях достигающих 53–55°C (Жарков, 2018). Это объясняется тем, что Сахалин, несмотря на близость к Курильским островам, не является частью вулканического пояса Тихоокеанского Огненного Кольца, а входит в состав Сахалино-Японской островной дуги. Основной компонент выделяющихся газов сахалинских гидротерм — метан (до 93%), преимущественно глубинного происхождения. Гидротермальные проявления о. Сахалин сосредоточены в нефтегазоносной зоне, где обнаружены все нефтегазовые месторождения острова (Сырбу, Шакиров, 2012).

Микробное разнообразие Сахалинских гидротерм крайне слабо изучено. На сегодняшний момент из этих мест выделено несколько термофильных гетеротрофных бактерий, относящихся к филуму *Firmicutes* (табл. 4).

Горячие источники Северного Кавказа

Кавказ расположен в пределах Альпийско-Гималайского подвижного пояса с активными новейшими тектоническими движениями и характеризуется разнообразием гидротермальных проявлений. На территории Северного Кавказа, куда входит Большой Кавказский хребет и Предкавказье, находится огромное количество термоминеральных источников различного химического состава (хлоридно-натриевые, хлоридно-кальциевые, гидрокарбонатно-сульфатно-натриевые, сульфидные и др.), степени минерализации (от 0.5 до 100 г/л), pH (от 6 до 9) и температуры (Курбанов, 2001). Большая часть источников относится либо к умеренно теплым, в которых температура воды не превышает 45°C, либо имеет вид скважин, где на выходе вода может достигать уровня точки кипения (например, в Кизляре, Краснодарском крае и др.). Однако есть и истинно горячие природные источники с температурами вод выше 50–60°C, например,

на территории Адыгеи, Северной Осетии, Дагестана, Чечни и Ставропольского края (рис. 1а). Северо-Кавказские гидротермы используются в бальнеологических целях еще с XVIII века, а источники района Кавказских Минеральных Вод и Краснодарского края уже более ста лет являются известными курортами страны. Однако, несмотря на многолетнюю историю использования и разнообразие физико-химических параметров, микробный состав гидротермальных источников этого региона практически не изучен. Большинство проведенных исследований было сосредоточено на умеренно-теплых источниках и обитающих там сообществах фототрофных или сероокисляющих мезофильных или термотолерантных бактерий (Черноусова и соавт., 2008; Горленко и соавт., 2019). В немногочисленных работах, посвященных микробному разнообразию истинно горячих источников Северного Кавказа, применяемые методы не позволили провести оценку термофильных микробных сообществ, населяющих эти источники (Халилова и соавт., 2017; Богомаз и соавт., 2019).

Единственным описанным термофильным микроорганизмом, выделенным из Северо-Кавказского региона, является уникальный представитель рода *Nitrospira* – ‘*Ca. Nitrospira inopinata*’ (Daims et al., 2015). Это первая работа, в которой была доказана возможность процесса полной нитрификации одним микроорганизмом, т.н. “complete ammonia oxidizer”, что перевернуло представления о функционировании цикла азота и роли в нем представителей широко распространенного рода *Nitrospira*.

Несмотря на слабую изученность микробного разнообразия кавказских источников, есть основания надеяться, что в ближайшем будущем эта ситуация изменится к лучшему. Так, в 2020 году НИЦ Курчатовский институт, ФИЦ Биотехнологии РАН и Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова провели совместную экспедицию в район североосетинских горячих источников (Урсдон, Кармадон, Бираганг и др.) (рис. 4г), по результатам которой было выделено более 30 штаммов термофильных и термотолерантных бактерий (аэробных и анаэробных, гетеро- и автотрофных), часть из которых оказалась представителями новых таксонов внутри филумов *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Ignavibacteriae*, *Acidobacteria* и *Verrucomicrobia* (наши неопубликованные данные).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы подробно рассмотрели микробные сообщества природных горячих источников, расположенных на территории Российской Федерации, как наземных, так и находящихся в прибрежной зоне. Однако есть еще одна

природная термальная экосистема глобального масштаба, о которой нельзя не упомянуть. Подземная биосфера, составляющая значительную часть от общей биомассы Земли (по некоторым оценкам, десятки процентов), также населена многочисленными термофильными и гипертермофильными прокариотами (Stetter et al., 1993; Magnabosco et al., 2018). Скважины, пробуренные на большие глубины, можно рассматривать как “окна”, позволяющие заглянуть в подземный мир. Помимо скважин исследовать микробные сообщества подземной биосферы позволяют нефтяные месторождения, подземные газохранилища, шахты глубокого залегания и др. К настоящему времени в подземных местообитаниях детектированы почти все известные филумы бактерий и архей. Подземная биосфера на территории России достаточно активно исследуется, однако в задачи данного обзора не входило рассмотрение микробных сообществ этой экосистемы. Ознакомиться с результатами этих работ можно в публикациях (Назина и соавт., 2013; Podosokorskaya et al., 2013; Слободкин, Слободкина, 2014; Karnachuk et al., 2019 и др.).

Разнообразие физико-химических условий горячих источников обуславливает вариативность окислительно-восстановительных реакций, которые используются термофильными прокариотами для получения энергии. Это, в свою очередь, определяет высокое разнообразие микроорганизмов, обитающих в горячих источниках. Особую роль среди них занимают хемолитотрофные прокариоты, окисляющие компоненты глубинных эманаций, поступающих на поверхность за счет геотермальной активности. Именно поэтому микробные сообщества таких систем называют “тропическими дождевыми лесами” микробного мира (Des Marais, Walter, 2019). В ходе многолетних исследований термофильных микробных сообществ горячих источников Российской Федерации о разнообразии микробного мира пополнились более чем на полсотню новых таксонов, представляющих более десятка филумов (рис. 5, табл. 1–4). Среди них были представители как хорошо изученных, таких как *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Crenarchaeota*, так и малоисследованных и малочисленных филумов, например *Synergistetes*, *Planctomycetes*, *Dictyoglomi*, *Verrucomicrobia*, *Calditrichota*, *Thaumarchaeota*. Некоторые из выделенных штаммов оказались первыми культивируемыми представителями глубоких линий (например, *Tepidiforma bonchosmolovskayae*, *Tepidisphaera mucosa*, *Tenuifilum thalassicum*, *Acidilobus aceticus*, *Fervidicoccus fontis*). Среди выделенных штаммов можно обнаружить представителей всех основных метаболических групп, от фото/хемоавтотрофов, ассимилирующих углекислоту, до гетеротрофов, использующих как простые органические молекулы, так и сложно разлагаемые полимерные со-

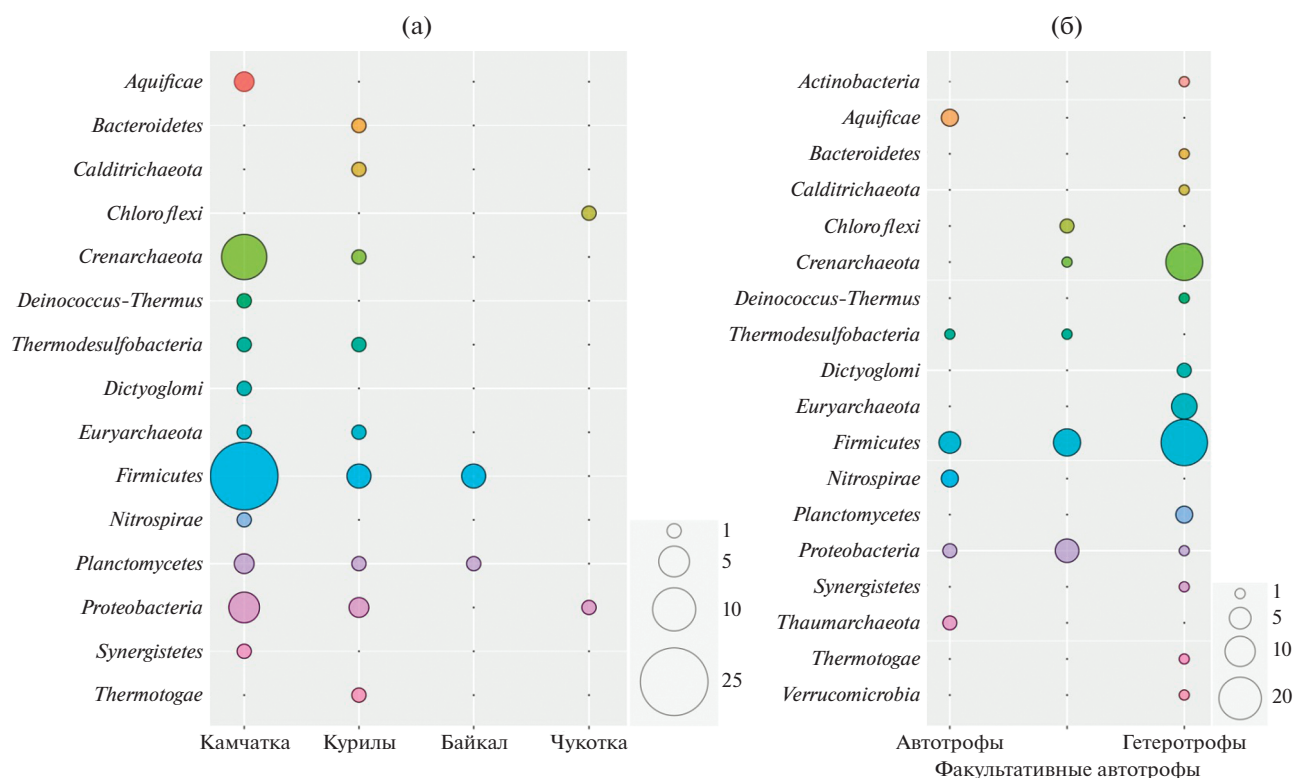


Рис. 5. Штаммы, выделенные из горячих источников России: а – распределение по филумам в зависимости от места выделения (только штаммы, представляющие новые таксоны видового уровня и выше); б – распределение по филумам в зависимости от типа метаболизма.

единения. У выделенных из горячих источников России термофильных прокариот были показаны уникальные метаболические возможности, как например: новые пути ассимиляции CO_2 (Mall et al., 2018; Frolov et al., 2019), термофильная железоредукция (Слободкин и соавт., 1995), полная нитрификация одним микроорганизмом (Daims et al., 2015), архейная сульфатредукция (Chernyh et al., 2020) и др. Тем не менее, чем больше мы получаем информации о разнообразии термофильных прокариот, населяющих горячие источники РФ, тем больше мы видим масштаб неизвестного, от микроорганизмов до их ферментов и метаболических путей. Это позволяет с оптимизмом смотреть в будущее: микробов и скрываемых ими тайн хватит еще не на одно поколение исследователей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов благодарит своего учителя и лидера в исследовании термофильных микробных сообществ в России, д. б. н., член-корреспондента РАН Елизавету Александровну Бонч-Осмоловскую за те знания и любовь к термофилам, которыми она всегда с удовольствием делится и прививает окружающим. Также авторы благодарят Владимира Борисова за фотografiю с о. Кунашир (рис. 4а).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-14-50440.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабасанова О.Б., Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д., Намсараев Б.Б. Органотрофные бактерии гидротерм Байкальской рифтовой зоны и их функциональная роль в микробном сообществе // Вестн. Бурятского гос. ун-та. 2013. Т. 4. С. 150–153.
- Балашова В.В., Заварзин Г.А. Анаэробное восстановление окисного железа водородной бактерией // Микробиология. 1979. Т. 48. С. 773–778.
- Басков Е., Суриков С. Гидротермы Земли. Л.: Недра, 1989.

- Богомаз О.Д., Владимиров И.А., Павлова О.А., Богомаз Д.И. Изучение разнообразия термофильных бактерий из Псекупского месторождения термальных вод // Международный журн. прикладных и фундаментальных исследований. 2019. Т. 5. С. 1–6.
- Бонч-Осмоловская Е.А., Слесарев А.И., Мирошниченко М.Л., Светличная Т.П., Алексеев В.А. Характеристика *Desulfurococcus atylolyticus* sp. nov. – новой экстремально-термофильной археобактерии, выделенной из гидротерм Камчатки и острова Кунашир // Микробиология. 1988. Т. 57. С. 94–102.
- Бонч-Осмоловская Е.А., Мирошниченко М.Л., Пикута Е.В., Сорокин Д.Ю., Намсараев Б.Б. Бактериальная сероредукция в мелководных гидротермах Юго-Западной части Тихого океана // Микробиология. 1993. Т. 62. С. 564–573.
- Бонч-Осмоловская Е.А., Мирошниченко М.Л., Черных Н.А., Кострикина Н.А., Пикута Е.В., Рэйни Ф.А. Восстановление элементной серы термофильной органотрофной бактерией и описание *Thermoanaerobacter sulfurophilus* sp. nov. // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 581–587.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Chernykh N.A., Kostrikina N.A., Pikuta E.V., Rainey F.A. Reduction of elemental sulfur by moderately thermophilic organotrophic bacteria and the description of *Thermoanaerobacter sulfurophilus* sp. nov. // Microbiology (Moscow). 1997. V. 66. P. 483–489.
- Бонч-Осмоловская Е.А., Мирошниченко М.Л., Слободкин А.И., Соколова Т.Г., Карпов Г.А., Кострикина Н.А., Заварзина Д.Г., Прокофьева М.И., Русанов И.И., Пименов Н.В. Биоразнообразие анаэробных литотрофных прокариот в наземных горячих источниках Камчатки // Микробиология. 1999. Т. 68. С. 398–406.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Slobodkin A.I., Sokolova T.G., Kostrikina N.A., Prokofeva M.I., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Karpov G.A., Zavarzina D.G. Biodiversity of anaerobic lithotrophic prokaryotes in terrestrial hot springs of Kamchatka // Microbiology (Moscow). 1999. V. 68. P. 343–351.
- Борисенко И.М., Замана Л.В. Минеральные воды Бурятской АССР. Улан-Удэ: Бурятское книгоиздательство, 1978.
- Брянская А.В., Намсараев З.Б., Калашников О.М., Бархутова Д.Д., Намсараев Б.Б., Горленко В.М. Биогеохимические процессы в альгобактериальных матах шельфового термального Уринского источника // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 702–712.
- Bryanskaya A.V., Barkhutova D.D., Namsaraev B.B., Namsaraev Z.B., Gorlenko V.M., Kalashnikova O.M. Biogeochemical processes in the algal-bacterial mats of the Urinskii alkaline hot spring // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 611–620.
- Будагаева В.Г., Раднагуруева А.А., Малыгин А.В., Бархутова Д.Д. Таксономический состав микробного сообщества горячего источника Алла (Байкальская Рифтовая Зона) // Вестн. Бурятского гос. ун-та. 2021. Т. 110. С. 3–11.
- Головачева Р.С. Термофильные нитрифицирующие бактерии горячих источников // Микробиология. 1976. Т. 45. С. 298–301.
- Головачева Р.С., Каравайко Г.И. *Sulfobacillus*, новый род термофильных спорообразующих бактерий // Микробиология. 1978. Т. 47. С. 815–822.
- Головачева Р.С., Вальехо-Роман К.М., Троицкий А.В. *Sulfurococcus mirabilis* gen. nov., sp. nov., новая термофильная археобактерия, способная окислять серу // Микробиология. 1987. Т. 56. С. 100–107.
- Головачева Р.С., Гольшина О.В., Каравайко Г.И., Дорофеев А.Г., Пивоварова Т.А., Черных Н.А. Новая железокисляющая бактерия *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 1056–1065.
- Горленко В.М., Бонч-Осмоловская Е.А., Компанцева Е.И., Старынин Д.А. Дифференциация сообществ микроорганизмов в связи с изменением физико-химических условий в источнике Термофильном // Микробиология. 1987. Т. 56. С. 314–322.
- Горленко В.М., Бурганская Е.И., Брянцева И.А. Фототрофные сообщества высокоминерализованных мезотермальных сульфидных Берикейских источников (Дагестан) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 154–164.
- Gorlenko V.M., Burganskaya E.I., Bryantseva I.A. Phototrophic communities of the Berikei highly mineralized mesothermal sulfide springs (Dagestan, Russia) // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 146–155.
- Дворянчикова Е.Н., Кизилова А.К., Кравченко И.К., Гальченко В.Ф. Анализ микробных сообществ термальных источников района озера Фумарольное кальдеры вулкана Узон, Камчатка // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13. С. 1418–1424.
- Добрецов Н.Л., Лазарева Е.В., Жмодик С.М., Брянская А.В., Морозова В.В., Тикунова Н.В., Пельтек С.Е., Карпов Г.А., Таран О.П., Огородникова О.Л., Кириченко И.С., Розанов А.С., Бабкин И.В., Шуваева О.В., Чебыкин Е.П. Геологические, гидрогеохимические и микробиологические особенности нефтяной площадки кальдеры Узон (Камчатка) // Геология и геофизика. 2015. Т. 56. С. 56–88.
- Dobretsov N.L., Lazareva E.V., Zhmodik S.M., Kirichenko I.S., Bryanskaya A.V., Peltek S.E., Rozanov A.S., Morozova V.V., Tikunova N.V., Babkin I.V., Karpov G.A., Taran O.P., Ogorodnikova O.L., Shuvaeva O.V., Chebykin E.P. Geological, hydrogeochemical, and microbiological characteristics of the oil site of the Uzon caldera (Kamchatka) // Russian Geol. Geophys. 2015. V. 56. P. 39–63.
- Жарков Р.В. Современные физико-химические особенности термоминеральных вод Дагинского месторождения (о. Сахалин) // Науки о Земле. 2018. Т. 4. С. 35–40.
- Заварзин Г.А., Карпов Г.А., Горленко В.М., Головачева Р.С., Герасименко Л.М., Бонч-Осмоловская Е.А. Кальдерные микроорганизмы. М.: Наука, 1989. 119 с.
- Зеленкина Т.С., Ешинимаяев Б.Ц., Дагурова О.П., Сузина Н.Е., Намсараев Б.Б., Троценко Ю.А. Аэробные метанотрофы прибрежных гидротерм озера Байкал // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 545–551.
- Zelenkina T.S., Dagurova O.P., Namsarayev B.B., Eshinimayev B.T., Suzina N.E., Trotsenko Y.A. Aerobic methanotrophs from the coastal thermal springs of Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 492–497.
- Зотов А.В., Сорокин В.И., Никитина И.Б. Некоторые особенности современной гидротермальной деятельности в кальдере вулк. Головинна (о-в Кунашир) //

- Современные гидротермы и минералообразование. М.: Наука, 1988. С. 54–69.
- Калашиников А.М., Гайсин В.А., Сухачева М.В., Намсараев Б.Б., Пантелеева А.Н., Нуянзина-Болдарева Е.Н., Кузнецов Б.Б., Горленко В.М. Аноксигенные фототрофные бактерии микробных сообществ термального источника Горячинск (Прибайкалье) // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 484–499.
- Kalashnikov A.M., Nuyanzina-Boldareva E.N., Gorlenko V.M., Gaisin V.A., Sukhacheva M.V., Panteleeva A.N., Kuznetsov B.B., Namsaraev B.B. Anoxygenic phototrophic bacteria from microbial communities of Goryachinsk thermal spring (Baikal area, Russia) // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 407–421.
- Карасева А.И., Ельченинов А.Г., Первалова А.А., Заяulina К.С., Кочеткова Т.В., Кубланов И.В. *Fervidicoccus fontis* 3639Fd – первая кренархеота, способная расти на липидах // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 421–429.
- Karaseva A.I., Elcheninov A.G., Perevalova A.A., Zayulina K.S., Kochetkova T.V., Kublanov I.V. *Fervidicoccus fontis* strain 3639FD, the first crenarchaeon capable of growth on lipids // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 435–442.
- Кейльгак К. Подземные воды. М.: ОНТИ, 1935.
- Корженков А.А., Теплюк А.В., Лебединский А.В., Хвацинская А.А., Копылова Ю.Г., Аракчаа К.Д., Голышин П.Н., Лунев Е.А., Голышина О.В., Кубланов И.В., Тоцаков С.В., Гаврилов С.Н. Представители некультивируемого таксона OP1 (“*Acetothermia*”) доминируют в микробном сообществе щелочного горячего источника Восточно-Тувинского нагорья // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 679–694.
- Korzhenkov A.A., Teplyuk A.V., Lunev E.A., Lebedinsky A.V., Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Gavrillov S.N., Khvashchinskaya A.A., Kopylova Y.G., Arakcha K.D., Golyshin P.N., Golyshina O.V. Members of the uncultured taxon OP1 (“*Acetothermia*”) predominate in the microbial community of an alkaline hot spring at East-Tuvan upland // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 783–795.
- Крюков В., Савельева Н., Пушева М. *Calderobacterium hydrogenophilum* nov. gen., nov. sp., экстремально термофильная водородная бактерия и ее гидрогеназная активность // Микробиология. 1983. Т. 52. С. 781–788.
- Кузнецов Б.Б. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. 1955. С. 130.
- Курбанов М.К. Геотермальные и гидроминеральные ресурсы Восточного Кавказа и Предкавказья. М.: Наука, 2001. 260 с.
- Логачев Н.А. История и геодинамика Байкальского рифта // Геология и геофизика. 2003. Т. 44. С. 391–406.
- Logachev N.A. History and geodynamics of the Baikal rift // Russian Geol. Geophys. 2003. V. 44. P. 353–370.
- Логинова Л.Г., Храпцова Г.И., Егорова Л.А., Богданова Т.И. Ацидофильные облигатно-термофильные бактерии *Vacillus acidocaldarius*, выделенные из горячих источников и почвы острова Кунашир // Микробиология. 1978. Т. 47. С. 939–946.
- Меркель А.Ю., Подосокорская О.А., Черных Н.А., Бонч-Осмоловская Е.А. Распространение, разнообразие и численность метаногенных архей в наземных горячих источниках Камчатки и острова Сан-Мигель // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 485–492.
- Merkel A.Y., Podosokorskaya O.A., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Occurrence, diversity, and abundance of methanogenic archaea in terrestrial hot springs of Kamchatka and Saõ Miguel island // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 577–583.
- Меркель А.Ю., Подосокорская О.А., Соколова Т.Г., Бонч-Осмоловская Е.А. Разнообразие метаногенных архей в наземном горячем источнике 2012 (Долина Гейзеров, Камчатка) // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 327–336.
- Merkel A.Y., Podosokorskaya O.A., Sokolova T.G., Bonch-Osmolovskaya E.A. Diversity of methanogenic archaea from the 2012 terrestrial hot spring (Valley of Geysers, Kamchatka) // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 342–349.
- Назина Т.Н., Павлова Н.К., Татаркин Ю.В., Шестакова Н.М., Бабич Т.Л., Соколова Д.Ш., Ивойлов В.С., Хисаметдинов М.Р., Ибатуллин Р.Р., Турова Т.П., Беляев С.С., Иванов М.В. Микроорганизмы карбонатной нефтяной залежи 302 Ромашкинского месторождения и их биотехнологический потенциал // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 191–202.
- Nazina T.N., Pavlova N.K., Tatarkin Y.V., Shestakova N.M., Babich T.L., Sokolova D.S., Ivoilov V.S., Tourova T.P., Belyaev S.S., Ivanov M.V., Khisametdinov M.R., Ibatullin R.R. Microorganisms of the carbonate petroleum reservoir 302 of the Romashkinskoe oilfield and their biotechnological potential // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 190–200.
- Намсараев Б.Б., Бонч-Осмоловская Е.А., Мирошниченко М.Л., Пикута Е.В., Качалкин В.И., Миллер Ю.М., Пропп Л.А., Тарасов В.Г. Микробиологические процессы круговорота углерода в мелководных гидротермах Юго-Западной окраины Тихого океана // Микробиология. 1994. Т. 63. С. 100–111.
- Намсараев З.Б., Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Бурюхаев С.П., Юрков В.В. Структура и биогеохимическая активность фототрофных сообществ щелочного термального Большереченского источника // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 228–238.
- Namsaraev Z.B., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B., Buryukhaev S.P., Yurkov V.V. The structure and biogeochemical activity of the phototrophic communities from the Bol'sherechenskii alkaline hot spring // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 193–202.
- Намсараев Б.Б., Абидуева Е.Ю., Лаврентьева Е.В. и др. Экология микроорганизмов экстремальных водных систем. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского гос. ун-та, 2008. С. 94.
- Ножевникова А.Н., Чудина В.И. Морфология термофильной ацетокластической бактерии *Methanotrix thermoacetophila* sp. nov. // Микробиология. 1984. Т. 33. С. 756–760.
- Nozhevnikova A.N., Chudina V.I. The morphology of the thermophilic acetate methanogenic bacterium *Methanotrix thermoacetophila* n. sp. // Microbiology (Moscow). 1984. V. 33. P. 756–760.
- Первалова А.А., Лебединский А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Черных Н.А. Детекция гипертермофильных архей рода *Desulfurococcus* при помощи гибридизации с олигонуклеотидными зондами // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 383–389.
- Perevalova A.A., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Chernyh N.A. Detection of hyperthermophilic archaea of

- the genus *Desulfurococcus* by hybridization with oligonucleotide probes // *Microbiology (Moscow)*. 2003. V. 72. P. 340–346.
- Пиннекер Е.В. Минеральные воды Тувы. Кызыл: Тувинское книжное издательство, 1968. 105 с.
- Светличный В.А., Слесарев А.И., Светличная Т.П., Заварзин Г.А. “*Caldococcus litoralis*” gen. nov., sp. nov. — новая морская экстремально термофильная археобактерия, восстанавливающая элементарную серу // *Микробиология*. 1987. Т. 56. С. 831–838.
- Светличный В.А., Светличная Т.П. *Dictyoglomus turgidus* sp. nov. — новая экстремально термофильная бактерия, выделенная из горячего источника кальдеры вулкана Узон // *Микробиология*. 1988. Т. 57. С. 435–441.
- Светличный В.А., Светличная Т.П., Черных Н.А., Заварзин Г.А. *Anaerocellum thermophilum* gen. nov., sp. nov., экстремально термофильная целлюлозолитическая бактерия, выделенная из горячего источника Долины гейзеров // *Микробиология*. 1990. Т. 59. С. 871–879.
- Svetlichny V.A., Svetlichnaya T.P., Chernykh N.A., Zavarzin G.A. *Anaerocellum thermophilum* gen. nov. sp. nov., an extreme thermophilic celluloselytic eubacterium isolated from hot springs in the Valley of Geysers // *Microbiology (Moscow)*. 1990. V. 59. P. 871–879.
- Слободкин А.И., Ероцев-Шак А.А., Кострикина Н.А., Лаврушин В.Ю., Дайняк Л.Г., Заварзин Г.А. Образование магнетита термофильными анаэробными микроорганизмами // Доклады Академии наук. 1995. Т. 345. С. 694–697.
- Слободкин А.И. Термофильная микробная металлоредукция // *Микробиология*. 2005. Т. 74. С. 581–595.
- Slobodkin A.I. Thermophilic microbial metal reduction // *Microbiology (Moscow)*. 2005. V. 74. P. 501–514.
- Слободкин А.И., Гаврилов С.Н., Слободкина Г.Б. Термофильные железовосстанавливающие прокариоты // Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского. Выпуск XVI. Термофильные микроорганизмы / Ред. Гальченко В.Ф. М.: Макс Пресс, 2011. С. 36–63.
- Слободкин А.И., Слободкина Г.Б. Термофильные прокариоты из глубинных подземных местообитаний // *Микробиология*. 2014. Т. 83. С. 255–270.
- Slobodkin A.I., Slobodkina G.B. Thermophilic prokaryotes from deep subterranean habitats // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 169–183.
- Сырбу Н.С., Шакиров Р.Б. Источники природных углеводородных газов и распределение газоопасных районов на острове Сахалине // Нефтегазовое и горное дело. 2012. С. 194–197.
- Троценко Ю.А., Медведкова К.А., Хмеленина В.Н. Термофильные и термотолерантные аэробные метанотрофы // *Микробиология*. 2009. Т. 78. С. 435–450.
- Trotsenko Y.A., Medvedkova K.A., Khmelena V.N., Eshinimaev V.T. Thermophilic and thermotolerant aerobic methanotrophs // *Microbiology (Moscow)*. 2009. V. 78. P. 387–401.
- Федотов С.А. О механизме вулканической деятельности на Камчатке, Курило-Камчатской дуге и в сходных структурах // Действующие вулканы Камчатки. М.: Наука, 1991. Р. 18–35.
- Фролова А.А., Слободкина Г.Б., Баслеров Р.В., Новиков А.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И. *Thermosulfurimonas marina* sp. nov. — автотрофная серодиспропорционирующая и нитратвосстанавливающая бактерия, выделенная из мелководной морской гидротермы // *Микробиология*. 2018. Т. 87. С. 366–372.
- Frolova A.A., Slobodkina G.B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I., Baslerov R.V., Novikov A.A. *Thermosulfurimonas marina* sp. nov., an autotrophic sulfur-disproportionating and nitrate-reducing bacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V. 87. P. 502–507.
- Халилова Э.А., Аливердиева Д.А., Котенко С.Ц., Исламагомедова Э.А., Абакарова А.А. Биоразнообразие микробных сообществ геотермальных вод и засоленных почв в регионах Прикаспийской низменности (республика Дагестан) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017. Т. 19. С. 99–105.
- Хранцова Г.И., Цаплина И.А., Серегина Л.М. Термофильные бактерии горячих источников Бурятии // *Микробиология*. 1984. Т. 53. С. 137–141.
- Цыренжапова И.С., Ешинимаев Б.Ц., Хмеленина В.Н., Осипов Г.А., Троценко Ю.А. Новый термотолерантный аэробный метанотроф из термального источника Бурятии // *Микробиология*. 2007. Т. 76. С. 132–135.
- Tsyrenzhapova I.S., Eshinimaev B.Ts., Khmelena V.N., Trotsenko Yu.A., Osipov G.A. A new thermotolerant aerobic methanotroph from a thermal spring in Buryatia // *Microbiology (Moscow)*. 2007. V. 76. P. 118–121.
- Черноусова Е.Ю., Акимов В.Н., Гриднева Е.В., Дубинина Г.А., Грабович М.Ю. Филогенетический *in situ/ex situ* анализ микробного сообщества серного мата из термального сульфидного источника Северного Кавказа // *Микробиология*. 2008. Т. 77. С. 255–260.
- Chernousova E.Yu., Gridneva E.V., Grabovich M.Yu., Akimov V.N., Dubinina G.A. Phylogenetic *in situ/ex situ* analysis of a sulfur mat microbial community from a thermal sulfide spring in the North Caucasus // *Microbiology (Moscow)*. 2008. V. 77. P. 219–223.
- Черных Н.А., Кубланов И.В., Прокофьева М.И., Пименов Н.В., Фролов Е.Н., Марданов А.В., Хавацевская А.А., Гусева Н.В., Лебединский А.В., Бонч-Осмоловская Е.А. Продукция органического вещества и разнообразие генов рибулозо-бисфосфат карбоксилазы в осадках источника Солнечный, кальдера Узон, Камчатка // *Микробиология*. 2017. Т. 86. С. 651–654.
- Chernykh N.A., Kublanov I.V., Prokofeva M.I., Pimenov N.V., Frolov E.N., Lebedinskii A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Mardanov A.V., Khvashchevskaya A.A., Guseva N.V. Production of organic matter and diversity of the ribulose biphosphate carboxylase genes in sediments of the Solnechny spring, Uzon caldera, Kamchatka // *Microbiology (Moscow)*. 2017. V. 86. P. 666–669.
- Adam P.S., Borrel G., Brochier-Armanet C., Gribaldo S. The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology // *ISME J*. 2017. V. 11. P. 2407–2425.
- Albuquerque L., Rainey F.A., da Costa M.S. *Thermus* // *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, 2018. P. 1–39.
- Bazhenova O.K., Arefiev O.A., Frolov E.B. Oil of the volcano Uzon caldera, Kamchatka // *Org. Geochem*. 1998. V. 29. P. 421–428.

- Bonch-Osmolovskaya E.A., Sokolova T.G., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. Desulfurella acetivorans* gen. nov. and sp. nov. – a new thermophilic sulfur-reducing eubacterium // Arch. Microbiol. 1990a. V. 153. P. 151–155.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Zavarzin G.A. Thermoproteus uzoniensis* sp. nov., a new extremely thermophilic archaeobacterium from Kamchatka continental hot springs // Arch. Microbiol. 1990b. V. 154. P. 556–559.
- Boyd E.S., Fecteau K.M., Havig J.R., Shock E.L., Peters J.W.* Modeling the habitat range of phototrophs in Yellowstone National Park: toward the development of a comprehensive fitness landscape // Front. Microbiol. 2012. V. 3. P. 221.
- Brock T.D., Freeze H. Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile // J. Bacteriol. 1969. V. 98. P. 289–297.
- Brock T.D.* Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures. Berlin: Springer, 1978.
- Bryanskaya A.V., Rozanov A.S., Slynko N.M., Shekhovtsov S.V., Peltek S.E. Geobacillus icigianus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 864–869.
- Burgess E.A., Unrine J.M., Mills G.L., Romanek C.S., Wiegel J.* Comparative geochemical and microbiological characterization of two thermal pools in the Uzon Caldera, Kamchatka, Russia // Microb. Ecol. 2012. V. 63. P. 471–489.
- Chernyh N.A., Mardanov A.V., Gumerov V.M., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Merkel A.Y., Crowe D., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Ravin N.V., Moran M.A., Bonch-Osmolovskaya E.A.* Microbial life in Bourlyashchy, the hottest thermal pool of Uzon Caldera, Kamchatka // Extremophiles. 2015. V. 19. P. 1157–1171.
- Chernyh N.A., Neukirchen S., Frolov E.N., Sousa F.L., Miroshnichenko M.L., Merkel A.Y., Pimenov N.V., Sorokin D.Y., Ciordia S., Mena M.C., Ferre M., Golyshin P.N., Lebedinsky A.V., Pereira I.A.C., Bonch-Osmolovskaya E.A.* Dissimilatory sulfate reduction in the archaeon ‘*Candidatus Vulcanisaeta moutnovskia*’ sheds light on the evolution of sulfur metabolism // Nature Microbiol. 2020. V. 5. P. 1428–1438.
- Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., von Herzen R.P., Ballard R.D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., van Andel T.H.* Submarine thermal springs on the Galápagos Rift // Science. 1979. V. 203. P. 1073–1083.
- Daims H., Lebedeva E.V., Pjevac P., Han P., Herbold C., Albertsen M., Jehmlich N., Palatinszky M., Vierheilig J., Bulaev A., Kirkegaard R.H., von Bergen M., Rattei T., Bendinger B., Nielsen P.H., Wagner M.* Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria // Nature. 2015. V. 528. P. 504–509.
- DeCastro M.-E., Rodríguez-Belmonte E., González-Siso M.-I.* Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 1521.
- Des Marais D.J., Walter M.R.* Terrestrial hot spring systems: introduction // Astrobiology. 2019. V. 19. P. 1419–1432.
- Eder W., Huber R.* New isolates and physiological properties of the Aquificales and description of *Thermocrinis albus* sp. nov. // Extremophiles. 2002. V. 6. P. 309–318.
- Elcheninov A.G., Podosokorskaya O.A., Kovaleva O.L., Novikov A.A., Toshchakov S.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Thermogemmata fonticola* gen. nov., sp. nov., the first thermophilic planctomycete of the order Gemmatales from a Kamchatka hot spring // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126157.
- Eme L., Reigstad L.J., Spang A., Lanzén A., Weinmaier T., Rattei T., Schleper C., Brochier-Armanet C.* Metagenomics of kamchatkan hot spring filaments reveal two new major (hyper) thermophilic lineages related to *Thaumarchaeota* // Res. Microbiol. 2013. V. 164. P. 425–438.
- Frolov E.N., Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Samarov N.I., Novikov A.A., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Chernyh N.A. Thermodesulfobium acidiphilum* sp. nov., a thermoacidophilic, sulfate-reducing, chemoautotrophic bacterium from a thermal site // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1482–1485.
- Frolov E.N., Zayulina K.S., Kopitsyn D.S., Kublanov I.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Chernyh N.A. Desulfothermobacter acidiphilus* gen. nov., sp. nov., a thermoacidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 871–875.
- Frolov E.N., Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Lunev E.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A.* Form III RubisCO-mediated transaldolase variant of the Calvin cycle in a chemolithoautotrophic bacterium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 18638–18646.
- Frolov E.N., Gololobova A.V., Klyukina A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Pimenov N.V., Chernyh N.A., Merkel A.Y.* Diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in Kamchatka hot springs // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 2072.
- Fry J.C., Parkes R.J., Cragg B.A., Weightman A.J., Webster G.* Prokaryotic biodiversity and activity in the deep seafloor biosphere // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 66. P. 181–196.
- Gaisin V.A., Kalashnikov A.M., Sukhacheva M.V., Namsaraev Z.B., Barhutova D.D., Gorlenko V.M., Kuznetsov B.B.* Filamentous anoxygenic phototrophic bacteria from cyanobacterial mats of Alla hot springs (Barguzin Valley, Russia) // Extremophiles. 2015. V. 19. P. 1067–1076.
- Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Namsaraev Z.B., Sukhacheva M.V., Gorlenko V.M., Kuznetsov B.B.* Biogeography of thermophilic phototrophic bacteria belonging to *Roseiflexus* genus // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. P. 1–7.
- Gavrilov S.N., Stracke C., Jensen K., Menzel P., Kallnik V., Slesarev A., Sokolova T., Zayulina K., Bräsen C., Bonch-Osmolovskaya E.A., Peng X., Kublanov I.V., Siebers B.* Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319x1 and its unusual multidomain glycosidase // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 552.
- Golyshina O.V., Bargiela R., Toshchakov S.V., Chernyh N.A., Ramayah S., Korzhenkov A.A., Kublanov I.V., Golyshin P.N.* Diversity of “*Ca. Micrarchaeota*” in two distinct types of acidic environments and their associations with *Thermoplasmatales* // Genes. 2019. V. 10. Art. 461.
- Hao L., McIlroy S.J., Kirkegaard R.H., Karst S.M., Fernando W.E.Y., Aslan H., Meyer R.L., Albertsen M., Nielsen P.H., Dueholm M.S.* Novel prosthecate bacteria from the candidate phylum *Acetothermia* // ISME J. 2018. V. 12. P. 2225–2237.
- Hatzenpichler R., Lebedeva E.V., Spieck E., Stoecker K., Richter A., Daims H., Wagner M.* A moderately thermophil-

- ic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 2134–2139.
- Hedlund B.P., Reysenbach A.-L., Huang L., Ong J.C., Liu Z., Dodsworth J.A., Ahmed R., Williams A.J., Briggs B.R., Liu Y., Hou W., Dong H. Isolation of diverse members of the *Aquificales* from geothermal springs in Tengchong, China // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 157.
- Hellebrand H.J., Schade G.W. Carbon monoxide from composting due to thermal oxidation of biomass // J. Environ. Qual. 2008. V. 37. P. 592–598.
- Hou W., Wang S., Dong H., Jiang H., Briggs B.R., Peacock J.P., Huang Q., Huang L., Wu G., Zhi X., Li W., Dodsworth J.A., Hedlund B.P., Zhang C., Hartnett H.E., Dijkstra P., Hungate B.A. A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of Tengchong, Yunnan Province China using 16S rRNA gene pyrosequencing // PLoS One. 2013. V. 8. e53350.
- Hu P., Tom L., Singh A., Thomas B.C., Baker B.J., Piceno Y.M., Andersen G.L., Banfield J.F. Genome-resolved metagenomic analysis reveals roles for candidate phyla and other microbial community members in biogeochemical transformations in oil reservoirs // mBio. 2016. V. 7. Art. 1669–15.
- Huang Q., Jiang H., Briggs B.R., Wang S., Hou W., Li G., Wu G., Solis R., Arcilla C.A., Abrajano T., Dong H. Archaeal and bacterial diversity in acidic to circumneutral hot springs in the Philippines // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. V. 85. P. 452–464.
- Inskeep W.P., Jay Z.J., Tringe S.G., Herrgård M.J., Rusch D.B. The YNP metagenome project: Environmental parameters responsible for microbial distribution in the Yellowstone geothermal ecosystem // Front. Microbiol. 2013. V. 4. P. 1–15.
- Islam T., Jensen S., Reigstad L.J., Larsen Ø., Birkeland N.K. Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 300–304.
- Jung D., Seo E.-Y., Owen J.S., Aoi Y., Young S., Lavrentyeva E.V., Ahn T.S. Application of the filter plate microbial trap (FPTMT), for cultivating thermophilic bacteria from thermal springs in Barguzin area, eastern Baikal, Russia // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2018. V. 82. P. 1624–1632.
- Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulfurudis audaxviator* from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // ISME J. 2019. V. 13. P. 1947–1959.
- Karner M.B., DeLong E.F., Karl D.M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean // Nature. 2001. V. 409. P. 507–510.
- Karpov G.A., Naboko S.I. Metal contents of recent thermal waters, mineral precipitates and hydrothermal alteration in active geothermal fields, Kamchatka // J. Geochem. Explor. 1990. V. 36. P. 57–71.
- Kevbrin V.V., Zengler K., Lysenko A.M., Wiegel J. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka // Extremophiles. 2005. V. 9. P. 391–398.
- Kevbrin V., Boltyanskaya Y., Garnova E., Wiegel J. *Anaerobranca zavarzinii* sp. nov., an anaerobic, alkalithermophilic bacterium isolated from Kamchatka thermal fields // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1486–1491.
- Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Kopitsyn D.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Calorimonas adulescens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium utilizing methoxylated benzoates // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 2066–2071.
- Kizilova A.K., Sukhacheva M.V., Pimenov N.V., Yurkov A.M., Kravchenko I.K. Methane oxidation activity and diversity of aerobic methanotrophs in pH-neutral and semi-neutral thermal springs of the Kunashir Island, Russian Far East // Extremophiles. 2014. V. 18. P. 207–218.
- Kochetkova T.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Kolganova T.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Sokolova T.G. Anaerobic transformation of carbon monoxide by microbial communities of Kamchatka hot springs // Extremophiles. 2011. V. 15. P. 319–325.
- Kochetkova T.V., Kublanov I.V., Toshchakov S.V., Osburn M.R., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Perevalova A.A. *Thermogladus calderae* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, hyperthermophilic crenarchaeote from a Kamchatka hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 1407–1412.
- Kochetkova T.V., Mardanov A.V., Sokolova T.G., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V., Kevbrin V.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Lebedinsky A.V. The first crenarchaeon capable of growth by anaerobic carbon monoxide oxidation coupled with H₂ production // Syst. Appl. Microbiol. 2020a. V. 43. Art. 126064.
- Kochetkova T.V., Toshchakov S.V., Zayulina K.S., Elcheninov A.G., Zavarzina D.G., Lavrushin V.Y., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Hot in cold: Microbial life in the hottest springs in permafrost // Microorganisms. 2020b. V. 8. Art. 1308.
- Kochetkova T.V., Zayulina K.S., Zhigarkov V.S., Minaev N.V., Chichkov B.N., Novikov A.A., Toshchakov S.V., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. *Tepidiforma bonchosmolovskayae* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic *Chloroflexi* bacterium from a Chukotka hot spring (Arctic, Russia), representing a novel class, *Tepidiformia*, which includes the previously uncultivated lineage OLB14 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020c. V. 70. P. 1192–1202.
- Kompantseva E.I., Kublanov I.V., Perevalova A.A., Chernyh N.A., Toshchakov S.V., Litti Y.V., Antipov A.N., Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L. *Calorithrix insularis* gen. nov., sp. nov., a novel representative of the phylum *Calditrichaeota* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1486–1490.
- Kovaleva O.L., Merkel A.Y., Novikov A.A., Baslerov R.V., Toshchakov S.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Tepidisphaera mucosa* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic member of the class *Phycisphaerae* in the phylum *Planctomycetes*, and proposal of a new family, *Tepidisphaeraceae* fam. nov., and a new order, *Tepidisphaerales* ord. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 549–555.
- Kozina I.V., Kublanov I.V., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Caldanaerobacter uzonensis* sp. nov., an anaerobic, thermophilic, heterotrophic bacterium isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 1372–1375.
- Kublanov I.V., Prokofeva M.I., Kostrikin N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Wiegel J., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermoanaerobacterium aciditolerans* sp. nov., a moderate thermoacidophile from a Kamchatka hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 260–264.

- Kublanov I.V., Perevalova A.A., Slobodkina G.B., Lebedinsky A.V., Bidzhieva S.K., Kolganova T.V., Kaliberda E.N., Rumsh L.D., Haertlé T., Bonch-Osmolovskaya E.A. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia) // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 286–291.
- Lau M.C.Y., Aitchison J.C., Pointing S.B. Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet // *Extremophiles.* 2009. V. 13. P. 139–149.
- Lebedeva E.V., Alawi M., Fiencke C., Namsaraev B., Bock E., Spieck E. Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone // *FEMS Microb. Ecol.* 2005. V. 54. P. 297–306.
- Lebedeva E.V., Off S., Zumbärgel S., Kruse M., Shagzhina A., Lückner S., Maixner F., Lipski A.M., Daims H., Spieck E. Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011. V. 75. P. 195–204.
- Lebedeva E.V., Hatzenpichler R., Pelletier E., Schuster N., Hauzmayer S., Bullaev A., Grigor'eva N.V., Galushko A., Schmid M., Palatinszky M., Le Paslier D., Daims H., Wagner M. Enrichment and genome sequence of the group I.1a ammonia-oxidizing archaeon “*Ca. Nitrosotenuis uzonensis*” representing a clade globally distributed in thermal habitats // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. 1–12.
- Loginova L.G., Egorova L.A., Golovacheva R.S., Seregina L.M. *Thermus ruber* sp. nov., nom. rev. // *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 1984. V. 34. P. 498–499.
- Magnabosco C., Lin L.H., Dong H., Bomberg M., Ghiorse W., Stan-Lotter H., Pedersen K., Kieft T.L., van Heerden E., Onstott T.C. The biomass and biodiversity of the continental subsurface // *Nature Geosci.* 2018. V. 11. P. 707–717.
- Mall A., Sobotta J., Huber C., Tschirner C., Kowarschik S., Bačnik K., Mergelsberg M., Boll M., Hügler M., Eisenreich W., Berg I.A. Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium // *Science.* 2018. V. 359. P. 563–567.
- Mardanov A.V., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Perevalova A.A., Karpov G.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. Uncultured archaea dominate in the thermal groundwater of Uzon Caldera, Kamchatka // *Extremophiles.* 2011. V. 15. P. 365–372.
- Mardanov A.V., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Ravin N.V. Microbial diversity in acidic thermal pools in the Uzon Caldera, Kamchatka // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2018. V. 111. P. 35–43.
- Martin W., Russell M.J. On the origins of cells: A hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2003. V. 358. P. 59–85.
- Menzel P., Gudbergsdóttir S.R., Rike A.G., Lin L., Zhang Q., Contursi P., Moracci M., Kristjánsson J.K., Bolduc B., Gavrillov S., Ravin N., Mardanov A., Bonch-Osmolovskaya E., Young M., Krogh A., Peng X. Comparative metagenomics of eight geographically remote terrestrial hot springs // *Microb. Ecol.* 2015. V. 70. P. 411–424.
- Merkel A.Y., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetskii I.Y., Frolov E.N., Dubin A.V., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs // *Extremophiles.* 2017. V. 21. P. 307–317.
- Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Neuner A., Kostrikina N.A., Chernych N.A., Alekseev V.A. *Thermococcus stetteri* sp. nov., a new extremely thermophilic marine sulfur-metabolizing archaeobacterium // *Syst. Appl. Microbiol.* 1989. V. 12. P. 257–262.
- Miroshnichenko M.L., Rainey F.A., Hippe H., Chernych N.A., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Desulfurella kamchatkensis* sp. nov. and *Desulfurella propionica* sp. nov., new sulfur-respiring thermophilic bacteria from Kamchatka thermal environments // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998. V. 48. P. 475–479.
- Miroshnichenko M.L., Tourova T.P., Kolganova T.V., Kostrikina N.A., Chernych N., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Ammonifex thiophilus* sp. nov., a hyperthermophilic anaerobic bacterium from a Kamchatka hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008a. V. 58. P. 2935–2938.
- Miroshnichenko M.L., Kublanov I.V., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Kolganova T.V., Birkeland N.-K., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* sp. nov. and *Caldicellulosiruptor hydrothermalis* sp. nov., two extremely thermophilic, cellulolytic, anaerobic bacteria from Kamchatka thermal springs // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008b. V. 58. P. 1492–1496.
- Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernych N.A., Tourova T.P., Kolganova T.V., Spring S., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Caldimicrobium rimae* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively lithoautotrophic, anaerobic bacterium from the Uzon Caldera, Kamchatka // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 1040–1044.
- Nazina T.N., Lebedeva E.V., Poltarau A.B., Tourova T.P., Grigoryan A.A., Sokolova D.S., Lysenko A.M., Osipov G.A. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 2019–2024.
- Nepomnyashchaya Y.N., Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Chernych N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Netrusov A.I., Slobodkin A.I. *Moorella humiferrea* sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium capable of growth via electron shuttling between humic acid and Fe(III) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 613–617.
- O'Neill A.H., Liu Y., Ferrera I., Beveridge T.J., Reysenbach A.-L. *Sulfurihydrogenibium rodmanii* sp. nov., a sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from the Uzon Caldera, Kamchatka Peninsula, Russia, and emended description of the genus *Sulfurihydrogenibium* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 1147–1152.
- 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.
- Panda A.K., Bisht S.S., De Mandal S., Kumar N.S. Bacterial and archeal community composition in hot springs from Indo-Burma region, North-east India // *AMB Express.* 2016. V. 6. 111.
- Perevalova A.A., Kolganova T.V., Birkeland N.-K., Schleper C., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V. Distribution of *Crenarchaeota* representatives in terrestrial hot springs of Russia and Iceland // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 7620–7628.

- Perevalova A.A., Bidzhieva S.K., Kublanov I.V., Hinrichs K.U., Liu X.L., Mardanov A.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Fervidicoccus fontis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of *Fervidococcaceae* fam. nov. and *Fervidococcales* ord. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2082–2088.
- Perevalova A.A., Kublanov I.V., Baslerov R.V., Zhang G., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Brockia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium from a terrestrial hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 479–483.
- Perevalova A.A., Kublanov I.V., Bidzhieva S.K., Mukhopadhyay B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V. Reclassification of *Desulfurococcus mobilis* as a synonym of *Desulfurococcus mucosus*, *Desulfurococcus fermentans* and *Desulfurococcus kamchatkensis* as synonyms of *Desulfurococcus amylolyticus*, and emendation of the *D. mucosus* and *D. amylolyticus* species descriptions // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 514–517.
- Podosokorskaya O.A., Merkel A.Y., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 2697–2701.
- Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae* // Environ. Microbiol. 2013. V. 15. P. 1759–1771.
- Podosokorskaya O.A., Kochetkova T.V., Novikov A.A., Toshchakov S.V., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. *Tenuifilum thalassicum* gen. nov., sp. nov., a novel moderate thermophilic anaerobic bacterium from a Kunashir Island shallow hot spring representing a new family *Tenuifilaceae* fam. nov. in the class *Bacteroidia* // Syst. Appl. Microbiol. 2020. V. 43. Art. 126126.
- Polyak B.G., Prasolov E.M., Lavrushin V.Y., Cheshko A.L., Kamenskii I.L. He, Ar, C and N isotopes in thermal springs of the Chukotka Peninsula: Geochemical evidence of the recent rifting in the north-eastern Asia // Chemical Geology. 2013. V. 339. P. 127–140.
- Prokofeva M.I., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Kuznetsov B.B., Tourova T.P., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Acidilobus aceticus* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic thermoacidophilic archaeon from continental hot vents in Kamchatka // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 2001–2008.
- Prokofeva M.I., Kublanov I.V., Nercessian O., Tourova T.P., Kolganova T.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Spring S., Jeanthon C. Cultivated anaerobic acidophilic/acidotolerant thermophiles from terrestrial and deep-sea hydrothermal habitats // Extremophiles. 2005. V. 9. P. 437–448.
- Prokofeva M.I., Kostrikina N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Lysenko A.M., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. Isolation of the anaerobic thermoacidophilic crenarchaeote *Acidilobus saccharovorans* sp. nov. and proposal of *Acidilobales* ord. nov., including *Acidilobaceae* fam. nov. and *Caldisphaeraceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 3116–3122.
- Rasmussen B. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit // Nature. 2000. V. 405. P. 676–679.
- Reigstad L.J., Richter A., Daims H., Urich T., Schwark L., Schleper C. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 64. P. 167–174.
- Reigstad L.J., Jorgensen S.L., Schleper C. Diversity and abundance of *Korarchaeota* in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka // ISME J. 2010. V. 4. P. 346–356.
- Reysenbach A.-L., Banta A., Civello S., Daly J., Mitchel K., Lalonde S., Konhauser K., Rodman A., Rusterholtz K., Takacs-Vesbach C. *Aquificales* in Yellowstone National Park // Geothermal Biology and Geochemistry in YNP. 2005. P. 129–142.
- Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Malup T.K., Meshcheryakova I.A., Lazareva E.V., Taran O.P., Ivanisenko T.V., Ivanisenko V.A., Zhmodik S.M., Kolchanov N.A., Peltek S.E. Molecular analysis of the benthos microbial community in Zavarzin thermal spring (Uzon Caldera, Kamchatka, Russia) // BMC Genomics. 2014a. V. 15. P. 1–15.
- Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Ivanisenko T.V., Malup T.K., Peltek S.E. Biodiversity of the microbial mat of the Garga hot spring // BMC Evol. Biol. 2017a. V. 17. 254.
- Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Kotenko A.V., Peltek S.E. Draft genome sequence of *Thermoactinomyces* sp. Gus2-1 isolated from the hot-spring Gusikha in Bargusin Valley (Baikal Rift Zone, Russia) // Genomics Data. 2017b. V. 11. P. 1–2.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. 1988. V. 239. P. 487–491.
- Skirmisdottir S., Hreggvidsson G.O., Hjörleifsdottir S., Marteinsson V.T., Petursdottir S.K., Holst O., Kristjansson J.K. Influence of sulfide and temperature on species composition and community structure of hot spring microbial mats // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 2835–2841.
- Slepova T.V., Sokolova T.G., Lysenko A.M., Tourova T.P., Kolganova T.V., Kamzolkina O.V., Karpov G.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Carboxydocella sporoproducens* sp. nov., a novel anaerobic CO-utilizing/H₂-producing thermophilic bacterium from a Kamchatka hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 797–800.
- Slepova T.V., Sokolova T.G., Kolganova T.V., Tourova T.P., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Carboxydotherrmus siderophilus* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, carboxydotrophic, dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 213–217.
- Slobodkin A.I., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe(III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1999. V. 49. P. 1471–1478.
- Slobodkin A.I., Tourova T.P., Kostrikina N.A., Lysenko A.M., German K.E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Birkeland N.K. *Tepidimicrobium ferriphilum* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, Fe(III)-reducing bacterium of

- the order *Clostridiales* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 369–372.
- Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Chernyh N.A., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Dissulfurimicrobium hydrothermale* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating deltaproteobacterium isolated from a hydrothermal pond // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 1022–1026.
- Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Sokolova T.G., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Carboxydocella manganiaca* sp. nov., a thermophilic, dissimilatory Mn(IV)- and Fe(III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 890–894.
- Slobodkina G.B., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Pyrobaculum ferrireducens* sp. nov., a hyperthermophilic Fe(III)-, selenate- and arsenate-reducing crenarchaeon isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015a. V. 65. P. 851–856.
- Slobodkina G.B., Kovaleva O.L., Miroshnichenko M.L., Slobodkin A.I., Kolganova T.V., Novikov A.A., van Heerden E., Bonch-Osmolovskaya E.A. Thermogutta terrifontis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogutta hypogea* sp. nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum *Planctomycetes* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015b. V. 65. P. 760–765.
- Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Novikov A.A., Viryasov M.B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Inmirania thermiophilica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively autotrophic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016a. V. 66. P. 701–706.
- Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Kopitsyn D.S., Viryasov M.B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Dissulfurirhabdus thermomarina* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfite-reducing and disproportionating deltaproteobacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016b. V. 66. P. 2515–2519.
- Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Thermodesulfitiimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, obligate sulfite-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 301–305.
- Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Kostryukova N.K., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Tepidibaculum saccharolyticum* gen. nov., sp. nov. a moderately thermophilic, anaerobic, spore-forming bacterium isolated from a terrestrial hot spring // *Extremophiles.* 2018. V. 22. P. 761–768.
- Sokolova T.G., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Tourova T.P., Kolganova T.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. Carboxydocella thermautotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, CO-utilizing thermophile from a kamchatkan hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 1961–1967.
- Sokolova T.G., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Bonch-Osmolovskaya E.A. Thermincola carboxydiphila* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, carboxydotrophic, hydrogenogenic bacterium from a hot spring of the Lake Baikal area // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 2069–2073.
- Stetter K.O., Huber R., Blöchl E., Kurr M., Eden R.D., Fielder M., Cash H., Vance I. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs // Nature.* 1993. V. 365. P. 743–745.
- Svetlichny V.A., Sokolova T.G., Gerhardt M., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. Anaerobic extremely thermophilic carboxydotrophic bacteria in hydrotherms of Kuril Islands // Microb. Ecol.* 1991a. V. 21. P. 1–10.
- Svetlichny V.A., Sokolova T.G., Gerhardt M., Ringpfeil M., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. Carboxydotherrmus hydrogenofmans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing thermophilic anaerobic bacterium from hydrothermal environments of Kunashir Island // *Syst. Appl. Microbiol.* 1991b. V. 14. P. 254–260.
- Symonds R.B., Rose W.I., Bluth G.J.S., Gerlach T.M. Volcanic-gas studies: methods, results, and applications // Volatiles in Magmas. Chapter 1 / Eds. Carroll M.R., Holloway J.R. Berlin, Boston: De Gruyter, 1994. P. 1–66.*
- Takami H., Noguchi H., Takaki Y., Uchiyama I., Toyoda A., Nishi S., Chee G.-J., Arai W., Nunoura T., Itoh T., Hattori M., Takai K. A deeply branching thermophilic bacterium with an ancient Acetyl-CoA pathway dominates a subsurface ecosystem // PLoS One.* 2012. V. 7. e0030559.
- Toshchakov S.V., Korzhenkov A.A., Samarov N.I., Mazunin I.O., Mozhey O.I., Shmyr I.S., Derbikova K.S., Taranov E.A., Dominova I.N., Bonch-Osmolovskaya E.A., Patrushev M.V., Podosokorskaya O.A., Kublanov I.V. Complete genome sequence of and proposal of *Thermofilum uzonense* sp. nov. a novel hyperthermophilic crenarchaeon and emended description of the genus *Thermofilum* // *Stand. Genomic Sci.* 2015. V. 10. Art. 122.*
- Toshchakov S.V., Lebedinsky A.V., Sokolova T.G., Zavarzina D.G., Korzhenkov A.A., Teplyuk A.V., Chistyakova N.I., Rusakov V.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V., Gavrilov S.N. Genomic insights into energy metabolism of *Carboxydocella thermautotrophica* coupling hydrogenogenic CO oxidation with the reduction of Fe(III) minerals // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 1759.*
- Urschel M.R., Kubo M.D., Hoehler T.M., Peters J.W., Boyd E.S. Carbon source preference in chemosynthetic hot spring communities // Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. P. 3834–3847.
- Wagner I.D., Zhao W., Zhang C.L., Romanek C.S., Rohde M., Wiegel J. Thermoanaerobacter uzonensis* sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a hot spring within the Uzon Caldera, Kamchatka, Far East Russia // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 2565–2573.
- Walker J.C.G. Was the Archaean biosphere upside down? // Nature.* 1987. V. 329. P. 710–712.
- Weiss M.C., Sousa F.L., Mrnjavac N., Neukirchen S., Roettger M., Nelson-Sathi S., Martin W.F. The physiology and habitat of the last universal common ancestor // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. Art. 16116.*
- Wemheuer B., Taube R., Akyol P., Wemheuer F., Daniel R. Microbial diversity and biochemical potential encoded by thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka peninsula // *Archaea.* 2013. Art. 136714.*
- Whitaker R.J., Grogan D.W., Taylor J.W. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea // *Science.* 2003. V. 301. P. 976–978.*
- Wilkins L.G.E., Ettinger C.L., Jospin G., Eisen J.A. Metagenome-assembled genomes provide new insight into the microbial diversity of two thermal pools in Kamchatka, Russia // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 1–15.*
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea,*

- Bacteria, and Eucarya // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4576–4579.
- Yumoto I., Hirota K., Kawahara T., Nodasaka Y., Okuyama H., Matsuyama H., Yokota Y., Nakajima K., Hoshino T. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1239–1242.
- Zavarzina D.G., Zhilina T.N., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermanaerovibrio velox* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, organotrophic bacterium that reduces elemental sulfur, and emended description of the genus *Thermanaerovibrio* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1287–1295.
- Zavarzina D.G., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Thermovenabulum ferriorganovororum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic, endospore-forming bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1737–1743.
- Zavarzina D.G., Sokolova T.G., Tourova T.P., Chernyh N.A., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermincola ferriacetica* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium capable of dissimilatory Fe(III) reduction // Extremophiles. 2007. V. 11. P. 1–7.
- Zavarzina D.G., Kochetkova T.V., Chistyakova N.I., Gracheva M.A., Antonova A.V., Merkel A.Y., Perevalova A.A., Chernov M.S., Koksharov Y.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Gavrilov S.N., Bychkov A.Y. Siderite-based anaerobic iron cycle driven by autotrophic thermophilic microbial consortium // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 1–11.
- Zayulina K.S., Prokofeva M.I., Elcheninov A.G., Voytova M.P., Novikov A.A., Kochetkova T.V., Kublanov I.V. *Arenimonas fontis* sp. nov., a bacterium isolated from Chukotka hot spring, Arctic region, Russia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020a. V. 70. P. 2726–2731.
- Zayulina K.S., Kochetkova T.V., Piunova U.E., Ziganshin R.H., Podosokorskaya O.A., Kublanov I.V. Novel hyperthermophilic crenarchaeon *Thermofilum adornatum* sp. nov. uses GH1, GH3, and two novel glycosidases for cellulose hydrolysis // Front. Microbiol. 2020b. V. 10. Art. 2972.
- Zhao W., Zhang C.L., Romanek C.S., Wiegel J. Description of *Caldalkalibacillus uzonensis* sp. nov. and emended description of the genus *Caldalkalibacillus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1106–1108.

Diversity of Thermophilic Prokaryotes Inhabiting Russian Natural Hot Springs

T. V. Kochetkova^{1,*}, O. A. Podosokorskaya¹, A. G. Elcheninov¹, and I. V. Kublanov¹

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

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

Received August 25, 2021; revised September 24, 2021; accepted September 25, 2021

Abstract—The review highlights the key results of study on the diversity of thermophilic prokaryotes inhabiting the Russian Federation hot springs. The main part of the review summarizes the results obtained by several decades of research on the thermophilic microbial communities of the Kamchatka Peninsula, Kuril Islands, and the Lake Baikal using classical microbiological, radioisotopic tracing and molecular ecology approaches. Apart from these well-studied environments, recent exploration of the hot springs located in the East-Tuvian upland, Chukotka, Sakhalin, and Northern Caucasus is also shown. First, taxonomy of all above-mentioned thermophilic prokaryotes is discussed. Second, the main energy-providing processes, based primarily on redox reactions of inorganic (mainly sulfur and iron) and organic compounds are considered. Finally, thermophilic prokaryotes involved in the carbon cycle are discussed in details: from CO₂-assimilating chemolithoautotrophs to heterotrophs capable of hydrolyzing complex organic matter. At last but not least, uncultivated lineages of thermophilic bacteria and archaea, which are present or even predominant in the thermal environments, are discussed.

Keywords: hot springs, Russia, thermophilic prokaryotes, Kamchatka, Kuril Islands, Baikal rift zone, microbial diversity, hydrothermal environments

РАЗНООБРАЗИЕ НОВЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОКАРИОТ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ МИНЕРАЛЬНЫХ ПОДЗЕМНЫХ ВОД ЕССЕНТУКСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

© 2022 г. С. Н. Гаврилов^а*, Е. Г. Потапов^б, М. И. Прокофьева^а, А. А. Клюкина^а,
А. Ю. Меркель^а, А. А. Маслов^с, Д. Г. Заварзина^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^бПятигорский НИИ Курортологии СКФНКЦ ФМБА России, Пятигорск, Россия

^сМГУ им. М.В. Ломоносова, Геологический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sngavrilov@gmail.com

Поступила в редакцию 17.09.2021 г.

После доработки 26.09.2021 г.

Принята к публикации 28.09.2021 г.

Регион Кавказские Минеральные Воды (КМВ) является уникальной территорией, где на сравнительно небольшой площади сосредоточены минеральные воды различных типов с суммарными запасами более 16000 м³ в сутки. Широким разнообразием вод отличается Ессентукское месторождение, на котором в наибольших объемах добываются углекислые воды Ессентуки № 17 и Ессентуки № 4. Одним из предполагаемых механизмов генезиса этих вод является биогеохимическая деятельность микроорганизмов, обитающих в подземной гидросфере. В настоящее время влияние микробных сообществ на качество бальнеологических водных ресурсов остается практически неизученным. В нашей работе впервые охарактеризован филогенетический состав двух таких сообществ, населяющих водовмещающие породы и минеральные воды Ессентукского месторождения. Профилирование этих сообществ по гену 16S рРНК выявило доминирование некультивируемых архей филума *Nadarchaeota* (36.6%) в воде Ессентуки № 17, вскрываемой скважиной 46, и некультивируемых актинобактерий нескольких новых классов (29.4%) в воде Ессентуки № 4, вскрываемой скважиной 49-Э. Обнаружены существенные различия в составе микробных сообществ, населяющих водоносные горизонты этих двух скважин, имеющих разные гидрохимические характеристики. Получены накопительные и чистые культуры микроорганизмов, представляющих малочисленные таксоны исследуемых сообществ. Анализ литературных данных о геномных особенностях прокариот выявленных доминирующих таксонов указывает на их способность к хемолитотрофии и, таким образом, на их потенциальное участие в окислительно-восстановительных преобразованиях водовмещающих пород и газовой составляющей минеральных вод.

Ключевые слова: минеральные воды, подземные экосистемы, микробные сообщества, некультивируемые микроорганизмы, разреженная биосфера, хемолитотрофия

DOI: 10.31857/S0026365622010037

Природные минеральные воды повсеместно используются в лечебных целях с древнейших времен. Древнегреческий центр врачевания Асклепион в Эпидавре, считающийся “колыбелью” современной курортной медицины, сформировался более 3000 лет назад именно вокруг термальных минеральных источников (Christopoulou-Aletta et al., 2010). Изучение генезиса минеральных вод имеет более чем вековую историю, и предположения о значительном влиянии микроорганизмов на этот процесс возникли достаточно давно, хотя микробиологические исследования минеральных вод до сих пор были фрагментарны. Первоначальные методы изучения микробных сообществ минеральных вод выбирались, в ос-

новном, согласно санитарно-эпидемиологическим требованиям в ущерб информации о функциональном разнообразии микроорганизмов и об их влиянии на формирование состава самих вод. Однако с конца 1970-х гг. наблюдался существенный прогресс в исследовании минеральных подземных вод, и культивируемые микроорганизмы были обнаружены даже в очень глубоких водоносных горизонтах. В работах того времени определяли, в основном, численность аэробных гетеротрофных микроорганизмов в минеральных водах, используя стандартные методы высева на твердые питательные среды. Большинство обнаруженных таким образом бактерий было отнесено к роду *Pseudomonas*, из чего делались выводы о вероят-

ном доминировании представителей этого рода в микробных сообществах минеральных вод (см. обзор Leclerc, da Costa, 2005, и ссылки в нем). Позднее, культуральными методами в минеральных водах было выявлено значительное количество представителей других гетеротрофных бактериальных родов *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* (Quevedo-Sarmiento et al., 1986). С появлением молекулярно-экологических методов, были охарактеризованы микробные сообщества нескольких типов европейских бутилированных минеральных вод. Во всех проанализированных сообществах доминировали гаммапротеобактерии, однако на уровне порядков и семейств профили сообществ различных вод существенно отличались друг от друга (Lesaulnier et al., 2017; Sala-Comogera et al., 2020). При этом патогенные микроорганизмы не были обнаружены в значимых количествах ни в исходных пробах минеральных вод, ни в бутилированной воде в процессе ее хранения (см. работу Sala-Comogera et al., 2020 и ссылки в ней). Более того, для представителей рода *Pseudomonas*, детектированных в минеральных водах, еще ранее была показана антагонистическая активность против некоторых патогенных тестовых штаммов (Leclerc, da Costa, 2005). Таким образом, если вопрос безопасности естественной микрофлоры минеральных вод на сегодняшний день разрешен, то вопрос об участии этой микрофлоры в формировании состава вод требует подробного изучения. Одной из немногих подобных работ является характеристика микробных сообществ естественных выходов кислых карбонатных минеральных вод Чесбского бассейна в Чехии (Krauze et al., 2017). На основании изотопных исследований авторы предположили, что терригенный CO_2 является значимым источником углерода для этих микробных сообществ. Молекулярно-экологические исследования выявили доминирование анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов, предположительно участвующих в биогеохимических циклах серы и железа, в частности, бактерий родов *Sulfuricurvum* и *Sulfurimonas*, окисляющих серу, и родов *Gallionella* и *Sideroxydans*, окисляющих Fe(II) (Krauze et al., 2017). Помимо этого, исследователи Чесбских минеральных источников обнаружили, что микробные сообщества углекислых вод содержали разнообразные малочисленные фило типы – метаногенных архей рода *Methanoregula*, представителей глубоких филогенетических линий некультивируемых архей *Nadesarchaea* и *Bathysphaera*, характерных для морских и глубинных подземных экосистем (Parks et al., 2020). Предполагается, что малочисленные популяции прокариот, чьи фило типы в микробном сообществе составляют 1% или менее, могут оказывать значительное влияние на жизнедеятельность такого сообщества. Согласно современным представлениям, такие фило типы – часть глобального феномена “разрежен-

ной биосферы” прокариот (Скопина и соавт., 2016; Jousset et al., 2017). Предполагается, что эти организмы могут отвечать за ряд важных экологических функций в разнообразных экосистемах: представлять резерв генетического материала, активируемого при резком изменении условий среды (Jousset et al., 2017); первыми заселять и осваивать новые экологические ниши; использовать редкие субстраты, например, ксенобиотики (Скопина и соавт., 2016); обеспечивать постоянную продукцию важных факторов роста на низком, но критически необходимом постоянном уровне (Sohm et al., 2011; Zhang et al., 2019). В отношении подземных водных экосистем экологическая роль представителей “разреженной биосферы”, равно как и функции доминирующих фило типов, еще не были предметом детальных исследований.

Предположения о значительной роли микроорганизмов в формировании состава вод региона КМВ возникли достаточно давно (Шинкаренко, 1941; Кудлаенко, 1976; Муравлёва и соавт., 1989). В ранних исследованиях, в основном, давалась оценка значимости сульфатредуцирующих бактерий как продуцентов сульфидов и окислителей органического вещества, захороненного в водовмещающих породах. В последнее десятилетие были начаты исследования микробных сообществ подземных минеральных вод продуктивных водоносных горизонтов, вскрытых на Ессентукском, Нагутском и Пятигорском месторождениях, для которых была оценена роль культивируемых сульфатредукторов в формировании “бессульфатных” углекислых вод содового типа (Потапов и соавт., 2014). Присутствие углекислоты с примесью изотопно-легкого, биогенного углерода, образующейся при микробном окислении органического вещества, выявленное в ходе анализа газов Ессентукского месторождения, дало основание предполагать высокую активность сульфатредукторов, полностью окисляющих рассеянное органическое вещество до CO_2 (Потапов и соавт., 2017; Потапов, 2019). Оценка влияния активности других физиологических групп прокариот и микробных сообществ в целом на формирование состава минеральных вод не проводилась.

Наиболее широко используемой стратегией определения структуры сообществ прокариот в настоящее время остается секвенирование и анализ последовательностей генов 16S рРНК (Soriano-Lerma et al., 2020). Эта методика уже позволила охарактеризовать самые разнообразные экосистемы.

В нашей работе описывается филогенетическое разнообразие микробных сообществ региона КМВ на основе анализа библиотек ампликонов гена 16S рРНК, полученных из тотальной ДНК, выделенной непосредственно из воды двух скважин Новоблагодарненского участка Ессентукского месторождения. На этом участке добываются баль-

неологически ценные углекислые минеральные воды типов Эссентуки № 17 и Эссентуки № 4, циркулирующие в трещиноватой зоне верхнемоловых известняков на глубине от 500 до 1000 м, где, согласно предварительным геолого-гидрохимическим исследованиям (Потапов и соавт., 2017; Потапов, 2019), можно ожидать высокую геохимическую активность микроорганизмов. Результаты анализа представляют собой одну из первых молекулярно-экологических характеристик подобных экосистем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Пробы для последующего выделения ДНК отбирали непосредственно на устье эксплуатационных скважин 46 и 49-Э с использованием комплектов для мембранной фильтрации ФМ02-1000 объемом 1 л (Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург) с фильтрами из трековой мембраны толщиной 20 мкм с порами 0.2 мкм (ОИЯИ, Дубна, Россия). Предварительно автоклавированные комплекты фильтровальных установок собирали непосредственно на месте отбора проб, подключали к устьевой арматуре скважин через стерильные резьбовые соединения и гибкие шланги и пропускали через них воды под естественным избыточным давлением скважин (порядка 4–6 атм. на устье) в объеме 100 л на каждую пробу. Фильтрацию начинали сразу после заполнения очередной автоцистерны, поставляющей воду на завод розлива, объемом не менее 19 м³, что обеспечивало получение проб непосредственно из водовмещающих отложений, без примеси вод, отстаивающихся в стволах скважин в период между заполнением автоцистерн. По окончании фильтрации остаточную воду полностью продавливали через фильтры высвобождающимися из скважин газами. От полученных влажных фильтров с микробной биомассой стерильными ножницами отрезали 1/4 часть, переносили ее в стерильный стеклянный флакон объемом 120 мл, полностью заполняли его водой из скважины и закупоривали резиновой пробкой и завинчивающейся крышкой. Полученный материал транспортировали в лабораторию, хранили в холодильнике и использовали в качестве посевного материала. Оставшуюся часть фильтра упаковывали стерильными пинцетами в стерильные пластиковые пробирки типа Falcon объемом 15 мл и полностью покрывали 2-мя мл стерильного буфера А (100 мМ Tris/HCl, 100 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl; pH 8.0) для фиксации ДНК. Плотные закрытые пробирки сразу же помещали в сумку-холодильник на лед, транспортировали в таком виде в лабораторию и далее хранили при –20°C до выделения ДНК.

Выделение ДНК, подготовка и секвенирование библиотек ампликонов гена 16S рРНК. ДНК выде-

ляли непосредственно из фиксированных фильтров при помощи набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) согласно инструкции производителя.

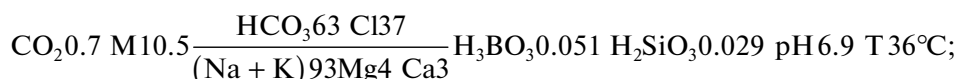
Подготовку библиотек ампликонов V4 участка гена 16S рРНК проводили по описанной ранее методике (Gohl et al., 2016) с использованием пары праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCG-GTAA-3'; Hugerth et al., 2014) – Pro-mod-805R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'; Меркель и соавт., 2019). Секвенирование библиотек проводили на системе MiSeq™ (“Illumina Inc”, США) с использованием картриджа для получения парно-концевых прочтений длиной 150 нуклеотидов. Биоинформатический анализ проводили аналогично Merkel et al. (2021). Все данные секвенирования депонированы в NCBI BioProject PRJNA760784.

Получение накопительных и чистых культур. В качестве посевного материала для засева (10% по объему) использовали воду из флаконов, содержащих 1/4 часть фильтра для выделения ДНК. Перед отбором аликвоты флакон энергично встряхивали. Для получения накопительных культур микроорганизмов был использован модифицированный метод селективных сред. В качестве минеральной основы для приготовления питательных сред использовали бутилированную воду Эссентуки № 4 и № 17, полученную из тех же скважин, что и посевной материал. Использование воды из скважин как минеральной основы питательной среды увеличивало вероятность накопления целевых групп микроорганизмов и одновременно обеспечивало их развитие в оптимальных физико-химических условиях.

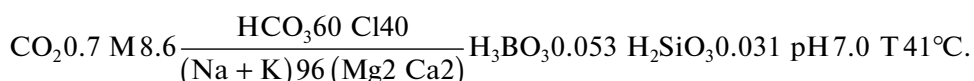
Среды готовили с соблюдением техники анаэробного культивирования путем кипячения бутилированной воды Эссентуки № 4 (Холдинг “Аква”, ГОСТ Р 54316-2011), pH 7.0, для накопительных культур из скважины 49-Э или бутилированной воды Эссентуки № 17 (Холдинг “Аква”, ГОСТ Р 54316-2011), pH 6.8, для накопительных культур из скважины 46 с последующим охлаждением под током CO₂ (100%). В охлажденную среду добавляли в растворы витаминов (1 мл/л) (Wolin et al., 1963) и микроэлементов (1 мл/л) (Кевбрин, Заварзин, 1992). При необходимости pH подводили до требуемых значений 1 н раствором HCl. Среды разливали при помощи дозатора в пробирки Хангейта по 10 мл, в которые были предварительно добавлены следующие минералы железа в качестве донора или акцептора электронов (20 г/л): природные глауконит $K_{0.8}(Mg_{0.4}Fe_{0.1})(Fe_{1.1}^{3+}Al_{0.4})(Si_{3.7}Al_{0.3})O_{10}](OH)_2$ (месторождение Маасду, Эстония), биотит $(K_{0.89}Na_{0.03})-(Mg_{0.9}Fe_{1.1}^{2+}Al_{0.43}Fe_{0.22}^{3+}Ti_{0.09}Mn_{0.03}) [Al_{1.26}Si_{2.8}O_{10}](OH,F)_2$ (Карелия, Россия), сидерит (FeCO₃) (Бакальское месторождение, Россия) или синтези-

рованный магнетит (Fe_3O_4 , расчетная конечная суммарная концентрация двух- и трехвалентного железа – 50 мМ). Синтезированный магнетит (СМ), смешанный оксид Fe(II/III) , готовили титрованием эквимольных растворов $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10%-ым раствором NaOH при постоянном перемешивании до рН 8.5. Полученный магнитный осадок трижды отмывали от NaCl дистиллированной водой, центрифугировали 3 мин при 1000 g и добавляли в среду перед разливом по пробиркам. В газовую фазу добавляли 2 мл CH_4 (до его конечной объемной концентрации 30%), после чего пробирки автоклавировали при 121°C 30 мин. Первичные накопительные культуры инкубировали в течение 7 сут при 37 и 47°C. Состояние накопительных культур контролировали по изменению численности прямым подсчетом клеток, окрашенных красителем акридиновым оранжевым, с помощью флуоресцентного микроскопа (Axio Lab.A1, “Zeiss”, Германия), по изменению состава газовой фазы, либо окраски добавленных минералов железа. В случае подтверждения роста микроорганизмов в первичных накопительных культурах их пересеивали (5% по объему) в пробирки со свежей стерильной средой, в те же условия, что использовались для соответствующих первичных накопительных культур. От трех до пяти последовательных пересевов обеспечивали получение устойчивых накопительных культур, из которых в дальнейшем предпринимались попытки выделения чистых культур доминирующих в них микроорганизмов методом предельных десятикратных разведений.

Ессентукский тип № 17, скважина 46:



Ессентукский тип № 4, скважина 49-Э:



Филогенетический состав микробного сообщества воды типа Ессентуки № 17 из скважины 46. По результатам микроскопии отобранных вод количество клеток в них колеблется от 10^5 до 10^6 кл./мл. Для образцов воды данной скважины были получены результаты профилирования по двум временным повторностям – по пробам, отобранным в августе и октябре 2019 г. Для каждой временной повторности было получено по несколько экспериментальных повторностей библиотек генов 16S рРНК. Суммарно для библиотек скважины 46 было получено более 28 тысяч последовательностей ампликонов V4-участка гена 16S рРНК. Фи-

логенетические профили микробного сообщества в различных повторностях были, в целом, схожи между собой, что позволило нам далее оперировать средними значениями представленности таксонов. Среднее значение индекса Шеннона составило 2.7, индекса Симпсона – 0.1, что указывает на относительно низкое разнообразие изучаемого микробного сообщества.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геолого-гидрохимическая характеристика объектов исследований. Новоблагодарненский участок, расположенный в 5–10 км к северу от города Ессентуки, был разведан в 1949–1956 годах. В настоящее время запасы минеральных вод на этом участке составляют 65 м³/сут воды Ессентуки № 17 и 80 м³/сут воды Ессентуки № 4. Скважины 46 и 49-Э, из которых идет добыча подземных углекислых минеральных вод Новоблагодарненского участка, имеют глубину 685.8 м, (водоприемный интервал на глубине 552.0–685.8 м) и 770 м (водоприемный интервал на глубине 508.0–770.0 м) соответственно, и расположены в 3 км друг от друга. Скважины работают в режиме регулируемого кранового самоизлива и используются для промышленного розлива в бутылки. Температура вод на устьях скважин достигает 45°C. По составу воды являются хлоридно-гидрокарбонатными натриевыми с минерализацией 8.0–14.0 г/л, содержание растворенного углекислого газа в них составляет 0.6–1.4 г/л. Газовая фаза этих вод, помимо CO_2 (40–70%), содержит CH_4 (10–40%) и N_2 (1–5%). Химический состав добываемых вод двух исследованных нами эксплуатационных скважин Новоблагодарненского участка по формуле Курлова представлен ниже:

логенетические профили микробного сообщества в различных повторностях были, в целом, схожи между собой, что позволило нам далее оперировать средними значениями представленности таксонов. Среднее значение индекса Шеннона составило 2.7, индекса Симпсона – 0.1, что указывает на относительно низкое разнообразие изучаемого микробного сообщества.

Анализ библиотек генов 16S рРНК выявил доминирование некультивируемых архей в воде скважины 46. Археи составляют более половины (59.3%) всего микробного разнообразия экосистемы (табл. 1), причем наибольшую численность

(36.6% всех прочтений) имеют фило типы порядка *Nadarchaeales*. Его первые представители были обнаружены молекулярными методами в технической и трещинной воде южноафриканских сверхглубоких золотоносных шахт и изначально были обозначены как SAGMEG (англ. South-African Gold Mine Miscellaneous Euryarchaeal Group — “группа разнообразных эвриархей из южноафриканской золотоносной шахты”; Takai et al., 2001). На основе анализа полногеномных данных эта группа была выделена в отдельный филум *Nadarchaea*, у представителей которого была предсказана способность к автотрофии с использованием CO_2 в качестве единственного источника углерода и акцептора электронов при ацетогенезе, а также к гидрогеногенному окислению CO до CO_2 (Baker et al., 2016). Представители *Nadarchaea* были детектированы в разнообразных анаэробных экосистемах, характеризующихся широким разбросом температур от 4 до 80°C: в подземной материковой биосфере, в наземных горячих источниках, в подземных экосистемах океанского дна, в морских глубоководных, мелководных, а также в пресноводных осадках (Parkes et al., 2005; Biddle et al., 2006). Однако ни в одной из этих экосистем такие археи не являлись доминирующим фило типом. Таким образом, подземные минеральные воды и водовмещающие горные породы, вскрываемые скважиной 46 Эссентукского месторождения, являются первым описанным экотопом, физико-химические условия которого способствуют доминированию этой некультивируемой и пока еще малоизученной группы архей. Вероятно, именно эти организмы являются ключевыми первичными продуцентами органического вещества в микробном сообществе водовмещающих пород и воды скважины 46, где их численность и метаболическая активность может оказывать существенное влияние на содержание CO_2 в газовой фазе минеральных вод.

Второй по численности группой архей (10.8% всех прочтений) в воде Эссентуки № 17 скважины 46 оказались фило типы, составляющие новый порядок класса *Thermoplasmata* филума *Thermoplasmata*. Все описанные виды *Thermoplasmata* были выделены из кислых шахтных дренажей, либо из кислых горячих источников вулканического происхождения. Большинство из них — это факультативно аэробные органотрофные ацидофилы, в том числе, гиперацидофилы с оптимальным рН роста около 0 (Rosenberg et al., 2014). Отдельные представители класса способны к автотрофному росту, сопряженному с аэробным окислением железа(II). Ближайший культивируемый организм, родственный фило типам *Thermoplasmata* из скважины 46, относится к виду *Methanomassiliicoccus luminiensis* порядка *Methanomassiliicoccales* (табл. 1) — нейтрофильному облигатному метилотрофу, образующему метан из метанола или метиламинов

и водорода (Iino et al., 2013). Однако очень низкое сходство этого организма с эссентукскими фило типами *Thermoplasmata* (80.7%) затрудняет предсказание физиологических свойств последних и, в частности, их способности к метилотрофному метаногенезу.

Третья по численности группа некультивируемых архей (7.3% сообщества) в воде скважины 46 представлена фило типами кластера ANME-1a в филуме *Halobacterota*. Сравнение полученных последовательностей генов 16S рНК ANME-1a с базой данных NCBI Nucleotide collection (версия от 14.09.2021), выявило их высокую гомологию с фило типом ANME-1, детектированным в морских прибрежных осадках. Именно для этой группы впервые был получен ряд доказательств функционирования процесса анаэробного окисления метана до углекислого газа (Hinrichs et al., 1999; Lloyd et al., 2011). Высокое (10–40%) содержание метана в газовой фазе воды скважины 46, коррелирующее со значительным представительством ANME-1a, дает основание предполагать, что в исследуемой экосистеме этот субстрат является существенным ресурсом формирования биомассы. При этом важно отметить, что анаэробная метанотрофия термодинамически выгодна только в консорциумах с сульфат- или железоредуцирующими бактериями, которые выступают акцепторами восстановленных эквивалентов, высвобождающихся при окислении метана (Timmers et al., 2017). Альтернативными акцепторами электронов для метанотрофов ANME-1a могут служить минеральные вещества, обладающие электронной проводимостью, в частности, минералы железа магнетит и маггемит. Такую возможность археям группы ANME-1a обеспечивают присутствующие в их геномах гены электронтранспортных белков (Wang et al., 2014). Процессы использования нерастворимых акцепторов электронов распространены в подземной биосфере и могут быть активными в водоносных горизонтах скважины 46. В свою очередь, частицы минералов железа могут служить значимым звеном межвидового переноса электронов между организмами различного метаболизма в процессах синтрофного метаногенеза (Kato et al., 2012). Эти процессы особенно важны для водоносных горизонтов, где обилие микронитридов в водовмещающих породах создает селективные условия для развития микробных ассоциаций, закрепленных на минералах. Помимо некультивируемых архей, в сообществе воды скважины 46 достаточно широко представлены (4.0% всех прочтений) известные автотрофные гидрогенотрофные метаногенные археи рода *Methanobacterium* (Whitman, 2015). Гипотетически, эти археи могут служить источником метана для ANME-1a.

Бактерии составляют 40.1% микробного сообщества воды скважины 46. Среди них преобладают фило типы некультивируемой группы уровня

Таблица 1. Представленность основных филотипов (в % от общего состава) в микробных сообществах минеральных вод скважин 46 и 49-Э Эссенбургского месторождения по результатам профилирования по гену 16S рРНК. Жирным шрифтом выделены филогенетические группы, представленность которых в сообществах составляет >1%

Таксономическое положение (филум, класс, порядок, семейство, род)	Пробы из скважин		Ближайший валидный вид (>80% сходства)	Ближайшие клоны
	46	49-Э		
АРХЕИ				
Степартхаеота <i>Vathyarchaeia</i>	0.5	2.5	<i>Archaeoglobus lithotrophicus</i> (82.4%)	КР341421.1 (98.1%), горячий источник Filwoha, Эфиопия
Еуэртхаеота <i>Methanobacteria Methanobacteriales Methanobacteriaceae Methanobacterium</i>	4.0	0.0	<i>Methanobacterium subterraneum</i> (100%) <i>Methanobacterium formicicum</i> (100%)	МК472013.1 (100%), анаэробный биореактор; МГ001723.1 (100%), метановый резервуар в угольном пласте (глубина 1.2 км, 62°C), Индия
Еуэртхаеота <i>Methanobacteria Methanobacteriales Methanothermobacteriaceae Methanothermobacter</i>	0.0	11.5	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H (100%)	МТ013481.1 (100%), ил мезофильного метантенка
Надартхаеота <i>Nadarchaeia Nadarchaeales</i>	36.6	0.0		АВ476720.1 (100%), серная дренажная вода Готардского тоннеля, Альпы, Швейцария; КС926748.1 (100%), осадок реки Оуцзян, Китай; АВ802437.1 (98.6%), керн океанского дна, шельф о. Хонсю; JQ315350.1 (98.1%), пластовая вода Ромашинского нефтяного месторождения, Россия; АМ883015.1 (97.2%), керн угольного пласта с глубины до 2.3 км, Новая Зеландия
Наобактерота ANME-1 ANME-1a	0.0	2.4		ГJ936679.1 (97.6%), грязь Авачинского вулкана, Россия
Наобактерота прочие (2 филогипа)	7.3	0.4	<i>Methanoseta pelagica</i> (85.4%)	GU120524.1 (99.5%), прибрежное природное битумное озеро Пич-Лейк, о. Тринидад, Карибское море; JN605063.1 (99.1%), донный осадок эстуария White Oak River, западное побережье США
	0.1	0.1		

Таблица 1. Продолжение

Таксономическое положение (филум, класс, порядок, семейство, род)	Пробы из скважин		Ближайший валидный вид (>80% сходства)	Ближайшие клоны
	46	49-Э		
<i>Thermoplasmatota Thermoplasmata</i>	10.8	0.0	<i>Methanomassiliococcus luminyensis</i> (80.7%)	AB65421.1 (93.2%), вода подземного горячего источника (с глубин 0.25–1 км), Япония; FJ900727.1 (91.8%), производственная вода нефтяной скважины, Китай
БАКТЕРИИ				
<i>Acidobacteriota Aminicenantes Aminicenantes</i>	0.0	2.3	<i>Moorella glycerini</i> (83.2%)	MK067121.1 (100%), нефтезагрязненная почва, Нигерия
<i>Actinobacteriota Coriobacteriia FS118-23B-02</i>	0.0	10.9	<i>Egibacter rhizosphaerae</i> (85.8%)	GU982852.1 (89.2%), донный осадок из западной части Тихого океана
<i>Actinobacteriota Coriobacteriia OPB41</i>	1.4	5.2	<i>Olegusella massiliensis</i> (87.7%)	MK035808.1 (100%), электрогидрофное метаногенное микробное сообщество из водоносного горизонта газового месторождения, Япония
<i>Actinobacteriota RBG-16-55-12</i>	0.1	11.0	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i> (88.9%)	MF895411.1 (100%), угольный пласт, Австралия
<i>Caldisepicota Caldisepticales TTA-B15</i>	0.0	4.6	<i>Calditerricola yamatuae</i> (84.4%)	KP109901.1 (100%), попутная вода нефтяного месторождения, Китай; KM373089.1 (100%), термофильный метантенк, перерабатывающий терефталат
<i>Chloroflexi Dehalococcoidia Sh765B-AG-111</i>	0.1	1.6	<i>Dehalogenimonas formicexedens</i> (90.6%)	EU385911.1 (100%), керн со дна Южно-Китайского моря
<i>Firmicutes D8A-2</i>	3.2	2.3	<i>Moorella humiferrea</i> (88.7%)	KX576599.1 (99.5%), подземное газохранилище (0.8 км), Франция
<i>Firmicutes Desulfotobacteriia Desulfotobacteriales Desulfotobacteriaceae Desulfotobacterium</i>	0.1	10.4	<i>Desulfotobacterium metallireducens</i> (93.9%)	MF895721.1 (99.1%), угольный пласт, Австралия
<i>Firmicutes Desulfotomaculia Ammonifexales Ammonifexaceae</i>	4.0	0.2	<i>Thermodesulfotimonas autotrophica</i> (88.7%)	MF628593.1 (99.5%), микрокосм из угольного пласта
<i>Firmicutes Desulfotomaculia Desulfotomaculales Desulfurisporaceae SCADC1-2-3</i>	0.0	1.4	<i>Desulfotomaculus kuznetsovii</i> (97.2%)	MF897964.1 (100%), угольный пласт, Австралия

Таблица 1. Окончание

Таксономическое положение (филум, класс, порядок, семейство, род)	Пробы из скважин		Ближайший валидный вид (>80% сходства)	Ближайшие клоны
	46	49-Э		
Firmicutes Incertae Sedis DTU014	0.1	3.3	<i>Koieobacter methoxuuntrophicus</i> (90.7%)	MF950564.1 (92.3%), почва рисового поля, Китай
Firmicutes прочие (18 филогенов)	1.0	5.0		
Nitrospirota <i>Thermodesulfovibrionia</i> <i>Thermodesulfovibrionales</i> <i>Thermodesulfovibrionaceae</i> <i>Thermodesulfovibrio</i>	0.0	2.3	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> (100%)	LC480817.1 (100%), ил термофильного метантенка; MF894795.1 (100%), угольный пласт, Австралия
Nitrospirota <i>Thermodesulfovibrionia</i>	23.5	0.2	<i>Dissulfurispira thermophila</i> (88.2%); <i>Thermodesulfovibrio aggregans</i> (85.3%)	GQ921458 (99.5%), трещинная вода глубинной (1.7 км) шахты Northam, ЮАР; KX974515.1 (96.2%), городской водозабор Сингапура
Patescibacteria <i>Parcubacteria</i> <i>Candidatus Yanofskybacteria</i>	0.1	1.1		FR727651.1 (93.4%), горячий источник, Дакс, Франция
Patescibacteria <i>Parcubacteria</i> <i>Paseibacterales</i> <i>Paseibacteraceae</i> <i>Candidatus Paseibacter</i>	0.0	4.0		AB645175.1 (93.9%), керн океанского дна, шельф о. Хонсю; JN123513.1 (93.4%), керн океанского дна, хребет Tainan, шельф Тайваня
Proteobacteria <i>Alphaproteobacteria</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Rhizobiaceae</i> <i>Ciceribacter</i>	0.0	1.3	<i>Ciceribacter azotifigens</i> (100%); <i>Ciceribacter thiooxidans</i> (100%)	KX714809.1 (100%), горячий источник, Иран
Proteobacteria <i>Gammaproteobacteria</i> <i>Pseudomonadales</i> <i>Moraxellaceae</i>	3.0	0.0	<i>Cavicella subterranea</i> (97.6%)	KT014926.1 (100%), почва, загрязненная Cr(VI), Китай
Proteobacteria <i>Gammaproteobacteria</i> <i>Halothiobacillales</i> <i>Halothiobacillaceae</i> <i>Halothiobacillus</i>	0.3	0.0	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> (100%)	KX714819.1 (100%), газоперерабатываю- щий завод, Иран
Прочие бактерии (всего 44 филогенов)	3.1	10.5		
Неопределенное таксономическое положение (No relative)	0.6	5.4		—

нового порядка в классе *Thermodesulfovibrionia* (23.5% сообщества). По полногеномной таксономии (GTDB) к этому классу нитроспир относят несколько кластеров некультивируемых бактерий и два культивируемых рода, сульфатредукторов *Thermodesulfovibrio* (Whitman, 2015) и автотрофных диспропорционаторов серы и тиосульфата *Dissulfurispira* (Umezawa et al., 2021). Выявленные нами филоциты имеют низкий уровень сходства с ближайшей к ним *D. thermophila* (уровень сходства V4-участка гена 16S рРНК 88.2%; табл. 1), что не позволяет сделать однозначных выводов об их физиологии и, соответственно, экологической роли в сообществе. Филоциты известных сульфатредукторов, близких к роду *Desulfovibrio*, в сообществе воды скважины 46 представлены в минорных количествах ($\leq 1\%$ прочтений гена 16S рРНК). Тем не менее, вместе с нитроспирами, их можно рассматривать в качестве возможных синтрофных партнеров архей ANME-1a.

Существенно меньшую, чем нитроспиры, но значимую долю микробного сообщества воды скважины 46 составляют филоциты семейства “*Ammonificaceae*” (4.0%), к которому относятся три культивируемых вида хемолитотрофов, восстанавливающих нитраты, серу или ее соединения с водородом или формиатом в качестве доноров электронов (<https://gtdb.ecogenomic.org/searches?s=all&q=ammonificaceae>). Схожие доли в составе этого микробного сообщества (3.2 и 3.0% соответственно) приходятся на филоциты некультивируемой группы D8A-2 уровня нового класса в филуме Firmicutes и новой некультивируемой группы гаммапротеобактерий семейства *Moraxellaceae*. Метаболические свойства группы D8A-2 в настоящее время не описаны. Интересна работа, в которой зафиксирован резкий рост численности D8A-2 в микробных консорциумах при стимуляции продукции ими метана из комплексных органических субстратов, например, путем внесения частиц магнетита, активизирующих межвидовой перенос электронов (Lee et al., 2019). Организм, близкородственный к эссендукскому филоциту *Moraxellaceae*, *Cavicella subterranea* (97.6% сходства гена 16S рРНК), является органотрофом, выделенным из скважины минеральной подземной воды в Португалии (Franca et al., 2015).

К преобладающим бактериальным группам сообщества воды Эссендуки № 17 можно также отнести некультивируемых актинобактерий группы ОРВ41 класса *Coriobacteriia* (1.4% сообщества). Первоначально детектированные в горячих источниках, эти организмы были впоследствии обнаружены в самых разнообразных экосистемах. На основании геномного анализа у них предполагается наличие гидролитической активности (Bird et al., 2019).

Из минорных компонентов микробного сообщества воды скважины 46, на долю каждого из которых приходится $\leq 1\%$ прочтений гена 16S рРНК, заслуживают внимания филоциты, относящиеся к бактериальным органотрофным родам *Paracoccus*, *Halothiobacillus*, *Cellulomonas*, чьи культивируемые представители способны, соответственно, к денитрификации, окислению разнообразных серных соединений, гидролизу полисахаридов (Rosenberg et al., 2014).

Филогенетический состав микробного сообщества воды типа Эссендуки № 4 из скважины 49-Э. По результатам микроскопии отобранных вод этого типа количество клеток в них составляет менее 10^5 кл./мл. Для образцов воды данной скважины были получены результаты профилирования лишь по одной временной повторности (отбор проб в августе 2019 г.), для которой было сделано две экспериментальные повторности анализа библиотек генов 16S рРНК. Суммарно для библиотек скважины 49-Э было получено более 6 тысяч последовательностей ампликонов V4-участка гена 16S рРНК. Среднее значение индекса Шеннона составило 2.9, индекса Симпсона – 0.08, что также указывает на относительно низкое разнообразие изучаемого микробного сообщества, которое, однако, выше, чем в воде скважины 46.

Профилирование микробного сообщества воды из скважины 49-Э выявило доминирование в нем некультивируемых актинобактерий, филоциты которых суммарно составляют 27.1% прочтений (табл. 1). В отличие от воды типа Эссендуки № 17, микробное сообщество воды Эссендуки № 4 содержит существенно меньшую долю архей (всего 16.9%). В то же время, бактериальная его часть более разнообразна – около 80% сообщества представлено 20-ю бактериальными филоципами, тогда как в воде Эссендуки № 17 на 90% сообщества приходится всего 8 филоцитов, из которых большинство составляют архейные (табл. 1). Одной из причин большего филогенетического разнообразия микробного сообщества воды скважины 49-Э по сравнению с таковым в воде скважины 46, является сниженное, по сравнению со скважиной 46, содержание CO_2 , которое, по-видимому, обусловлено подмешиванием пресных гидрокарбонатных натриевых вод, циркулирующих в верхнемеловых известняках, к минеральным водам в горизонтах, вскрываемых скважиной 49-Э (Потапов, 2017).

Некультивируемые актинобактерии, доминирующие в микробном сообществе воды скважины 49-Э, относятся к классу *Coriobacteriia* и филогенетической группе уровня нового класса RBG-16-55-12. Культивируемые представители класса *Coriobacteriia*, сосредоточенные все в порядках *Coriobacteriales* и *Eggerthellales*, являются эпибионтами животных и человека (Rosenberg et al., 2014), од-

нако филоотипы, обнаруженные в воде скважины 49-Э, относятся к новым порядкам, представители которых были детектированы в разнообразных экосистемах, не связанных с организмами животных. В частности, ближайший клон, родственный эссендукскому филоотипу группы FS118-23B-02 (10.9% в исследуемом сообществе), был выявлен в донных осадках Тихого океана (табл. 1). Предполагается, что микроорганизмы этой группы (Huber et al., 2006) являются свободноживущими органотрофами, хотя их физиология пока остается неизученной. Предполагаемые гидролитические кориобактерии группы OPB41 составили 5.2% сообщества воды скважины 49-Э, хотя их основной субстрат в этой бедной органикой экосистеме остается неясным. Мало сведений и о метаболизме некультивируемых бактерий группы RBG-16-55-12 уровня класса – это самая массовая форма актиномицет в воде Эссендукского типа № 4 (11.0% от всех прочтений). Бактерии этой группы ранее были обнаружены в разнообразных экстремальных экосистемах. В частности, близкородственный эссендукскому RBG-16-55-12 клон был выявлен в австралийском угольном пласте. Для представителей RBG-16-55-12 из японского термального щелочного источника был предложен таксон “*Candidatus Naku-banella thermoalkaliphilus*” и выполнен анализ геномов SAGs, который показал возможность фиксации CO₂ этими организмами при миксотрофном росте через путь Вуда–Льюнгаля, прежде не описанный у актинобактерий. У одного из филоотипов была также выявлена способность к нитратредукции (Merino et al., 2020). Актинобактерии могут разлагать сложные органические вещества в составе микробных ассоциаций, формирование которых может быть обусловлено способностью актинобактерий к образованию сложно организованных колоний на твердых субстратах (Rosenberg et al., 2014). Кроме того, с учетом обнаружения генов пути Вуда–Льюнгаля у актинобактерий, для их отдельных представителей, детектированных в воде скважины 49-Э, можно предположить роль первичных продуцентов.

Роль продуцентов органического вещества в сообществе воды скважины 49-Э могут выполнять и археи вида *Methanothermobacter thermautotrophicus*, составляющие вторую по численности группу прокариот (11.5% сообщества, табл. 1). Эти археи являются строгими анаэробами, умеренными термофилами, типичными гидрогенотрофными метаногенами, восстанавливающими CO₂ в метан с водородом или формиатом в качестве доноров электронов (Wasserfallen et al., 2000). Помимо них, в микробном сообществе воды скважины 49-Э в значительном количестве присутствуют еще 2 группы некультивируемых архей с предполагаемой способностью к автотрофному ацетогенному росту. Это археи вышеописанного

порядка *Hadarchaeales* филума *Hadarchaeia* (2.4% сообщества) и класса *Bathyarchaeia* филума *Crenarchaeota* (2.5%). У последних на основании геномного анализа предполагается наличие способности к гидрогенотрофному метаногенезу из CO, CO₂ и метанола, к ацетогенезу, а также к диссимиляционному восстановлению соединений азота и серы (Evans et al., 2015; He et al., 2016; Thomas et al., 2020). Интересно, что в воде скважины 49-Э представлен филоотип *Hadarchaeales*, не встречавшийся в воде скважины 46, где археи этого класса доминировали, а его наиболее близкородственный клон был детектирован в термальном вулканическом местообитании, тогда как клоны, родственные *Hadarchaeales* из воды Эссендуки № 17, происходили из холодных подземных экосистем (табл. 1). Подобное различие может отражать разницу в гидрохимических характеристиках этих вод, способствующих накоплению в них организмов с различными метаболическими свойствами.

Вероятнее всего, разницей в физико-химических условиях объясняется и существенное различие представленности фирмикот рода *Desulfotobacterium*, относящихся к обособленному классу *Desulfotobacteriia* (Parks et al., 2020), в водах Эссендуки № 4 (свыше 10% разнообразия сообщества) и Эссендуки № 17 (менее 0.3% сообщества). Бактерии этого рода являются органотрофами, способными к различным типам анаэробного дыхания, наиболее геохимически значимым из которых можно считать железоредукцию. В частности, *Desulfotobacterium metallireducens* – культивируемый организм, наиболее близкородственный эссендукскому филоотипу этого рода (94% сходства V4-участка гена 16S рРНК; табл. 1) – способен к восстановлению Fe(III), Mn(IV) и к восстановительному дегалогенированию хлоруглеводородов (Finneran et al., 2002). В осадках морского происхождения, составляющих водоносный горизонт, вскрываемый скважиной 49-Э, хлоруглеводороды могут локально присутствовать как продукты пиролиза или термолиза терпенов, аминокислот, флавоноидов и других компонентов биомассы водорослей (Paul, Pohnert, 2011).

Доля остальных фирмикот в сообществе воды Эссендуки № 4 составляет 13.2% и распределена между 21 филоотипом. Из них наибольшую представленность имеют филоотипы некультивируемых групп D8A-2 (2.3%) и DTU014 Incertae sedis (3.3%), а также филоотипы, относящиеся к классам *Clostridia* (2.3% суммарно) и *Desulfotomaculia* (2.0% суммарно). Последняя группа филоотипов включает в себя термофильных анаэробных автотрофов родов *Ammonifex* и *Thermodesulfomitinos*, восстанавливающих нитраты, серу, или ее соединения с водородом или формиатом в качестве донора электронов, а также синтрофных органотрофов рода *Pelotomaculum* и группу некультивируемых

бактерий SCADC1-2-3 в семействе термофильных сероредукторов *Desulfurisporaceae*. Ближайший культивируемый организм, родственный фило-типу SCADC1-2-3 скважины 49-Э, относится к виду *Desulfofundulus kuznetsovii* (97.0% сходства, табл. 1), выделенному из минеральной подземной тер-мальной воды, и является термофильным ор-ганотрофным сульфатредуктором (Назина и соавт., 1988; Watanabe et al., 2018).

Помимо актинобактерий, метаногенных архей и фирмикут, заметную долю микробного сообще-ства воды типа Эссентуки № 4 составляют фило-типы некультивируемой группы *Parcubacteria* уровня класса в филуме Patescibacteria (5.1%). Класс *Parcu-bacteria* включает в себя несколько различных групп некультивируемых организмов, метаболизм которых остается плохо охарактеризованным, не-смотря на публикацию нескольких неполных ге-номов их представителей. Некультивируемые бактерии класса *Parcubacteria* были ранее детекти-рованы в разнообразных анаэробных экосистемах с высокой концентрацией органики, например, в донных осадках и рубце жвачных, однако наиболь-шая их численность была зафиксирована в холод-ных пресноводных экосистемах Шпицбергена (Sułowicz et al., 2020).

Филотип ТТА-В15 уровня семейства в порядке *Caldisericales* (4.6% сообщества), обнаруженный в воде скважины 49-Э, относится к филуму *Caldiseri-cota*. Ранее этот филотип был детектирован в раз-личных термальных экосистемах (Chen et al., 2004). Клоны, наиболее близкородственные эс-сентукским ТТА-В15 также были выявлены в анаэробных термальных местах обитания – в глу-бинном нефтяном месторождении и термофиль-ном метантенке (табл. 1). Данные о физиологии и геномике этих организмов пока отсутствуют. Единственный культивируемый представитель филума – вид *Caldisericum exile* – не является близкородственным эссентукским филотипам ТТА-В15, которые имеют большее сходство гена 16S рРНК (84.0%) с гипертермофильным ор-ганотрофным фирмикотом *Calditerricola yamamurae* (табл. 1).

Некультивируемая группа бактерий Sh765B-AG-111 уровня порядка в классе *Dehalococcoidia* (филум Chloroflexi, 1.6% сообщества) была впервые детектирована в образцах почвы из хвостохранили-ща уранового рудника в бассейне Колорадо (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/26005692>). Геномные данные и, соответственно, сведения о возможном типе метаболизма представителей этой группы в настоящее время отсутствуют. Клон, филогене-тически идентичный (100% сходства) эссентукским последовательностям группы Sh765B-AG-111, был детектирован в керне морской осадочной поро-ды, в анаэробной среде (табл. 1). Ближайший род-ственный культивируемый организм имеет до-

вольно низкое сходство гена 16S рРНК с эссентук-скими представителями Sh765B-AG-111 (90.6%; табл. 1) и относится к виду *Dehalogenimonas for-micexedens* (табл. 1), катаболизм которого основан на восстановительном дегалогенировании хло-руглеводородов с формиатом или водородом в ка-честве доноров электронов (Key et al., 2017).

Некультивируемые ацидобактерии класса *Aminicenantales* (2.3% сообщества), были впервые детектированы в Обсидиановом горячем источ-нике Йеллоустоунского парка как филотип OP8 и в настоящее время идентифицированы в разно-образных наземных и морских экосистемах. На основании реконструкции генома представителя этого таксона из глубинной нефтепоисковой скважины в Томской области удалось предсказать экологическую роль этих организмов как де-структоров полисахаридов в анаэробных услови-ях путем сбраживания или сопряжения с нитрит-ным дыханием (Kadnikov et al., 2019).

Бактерии класса *Thermodesulfovibrionia*, домини-ровавшие в воде Эссентуки № 17, составили суще-ственно меньшую (2.3%) долю микробного сообще-ства в воде из скважины 49-Э и были представлены видом *Thermodesulfovibrio yellowstonii* – термофильно-го органотрофного сульфатредуктора (табл. 1). Так-же были обнаружены филотипы (1.1% сообщества), близкородственные сульфатредуцирующим бакте-риям рода *Desulfobacca* филума *Desulfobacterota*.

Клостридии представлены в сообществе воды скважины 49-Э широким разнообразием мало-численных филотипов, из которых наибольшую численность имеют термофильные анаэробы ро-да *Thermincola* (0.8%). Представители этого рода способны восстанавливать минералы Fe(III), а также осуществлять электрогенез – перенос элек-тронов на химически инертные аноды, либо на твердые соединения, обладающие электронной проводимостью (Wrighton et al., 2008). Такими со-единениями могут служить минералы перемен-новалентных элементов в водовмещающих пла-стах скважины 49-Э.

Минорная часть микробных сообществ вод обеих исследованных скважин 46 и 49-Э пред-ставлена широким разнообразием филотипов, различных по метаболическим свойствам их куль-тивируемых представителей. Большинство из них обладает тем или иным типом органотрофного ме-таболизма и также может выполнять функцию де-структоров органического вещества в сообществе. Их геохимическая роль неопределенна, особенно, учитывая их низкую численность. Определение конкретной экологической роли малочисленных представителей “разреженной биосферы” в том или ином микробном сообществе невозможно без изучения их культуральными методами, кото-рое зачастую затруднено низкой концентрацией клеток таких микроорганизмов.

Таблица 2. Филогенетический состав накопительных культур, полученных из проб воды Ессентуки № 17 и № 4 скважин 46 и 49-Э, с минералами железа в качестве доноров или акцепторов электронов. Указаны филогенетические группы, представленность которых в культурах составляет $\geq 1\%$

Субстраты	Вода из скважины 46	Вода из скважины 49-Э
Сидерит + CO ₂	<i>Halothiobacillus</i> (82.1%) <i>Desulfovibrio</i> (3.4%) <i>Aerosphaera</i> (3.0%) <i>Comamonas</i> (1.7%) <i>Pseudomonas</i> (1.0%)	<i>Actinotalea</i> (93.5%) <i>Pseudomonas</i> (1.2%)
Биотит + CH ₄	<i>Halothiobacillus</i> (99.9%)	<i>Halothiobacillus</i> (95.7%) <i>Actinotalea</i> (3.8%)
Глауконит + CH ₄	<i>Halothiobacillus</i> (99.8%)	<i>Cellulomonas</i> (95.7%) <i>Peptostreptococcaceae</i> uncultured (0.6%)
Магнетит + CH ₄	<i>Halothiobacillus</i> (99.7%)	<i>Halothiobacillus</i> (92.7%) <i>Actinotalea</i> (6.6%)

Накопительные и чистые культуры из вод скважин 46 и 49-Э. При использовании проб воды скважин 46 и 49-Э в качестве посевного материала на селективных средах (см. Методы) были получены первичные накопительные культуры с минералами железа глауконитом, биотитом, сидеритом и синтезированным магнетитом, выбранными как наиболее распространенные доноры или акцепторы электронов, которые могут быть использованы микроорганизмами, населяющими глубинные водоемещающие породы. Сидерит – минерал, содержащий только Fe(II) – может служить только источником энергии (донором электронов) для микроорганизмов. Все остальные минералы содержат как окисленную (Fe(III)), так и восстановленную (Fe(II)) форму железа и могут быть использованы микроорганизмами как высокопотенциальные акцепторы или доноры электронов. С учетом полученных данных о преобладании CO₂ и метана в газовой фазе вод Ессентуки № 4 и № 17, а также данных о существенной доле потенциальных автотрофов и метанотрофов в микробных сообществах этих вод, в качестве основных источников углерода и, соответственно, акцептора и донора электронов для накопительных культур были выбраны газообразные CO₂ и CH₄. Рост каждой из культур с сидеритом сопровождался изменением цвета минерала с рыжего на светло-серый, окраска остальных минералов в культурах не изменялась. Потребления метана не было зафиксировано ни в одном из вариантов. Во всех культурах доминировали морфотипы некрупных палочек, ассоциированных с минеральными частицами и зачастую образующих плотные агрегаты (рис. 16, 1г). Из-за плотной колонизации поверхности минералов определение численности микроорганизмов было затруднено. Приблизительная численность клеток в культурах с метаном составила не менее 5×10^6 кл./мл, а в культурах с

сидеритом и CO₂ – на порядок ниже, 5×10^5 кл./мл. Добавление витаминов стимулировало рост всех накопительных культур, поэтому дальнейшие их пересевы проводили уже на средах с добавлением раствора витаминов. Второй пересев первичных накопительных культур в те же условия не привел к уменьшению численности микроорганизмов и их морфотипов. Для вторых пересевов накопительных культур был определен филогенетический состав методом высокопроизводительного секвенирования V4-участков генов 16S рРНК. Результаты анализа представлены в табл. 2. В большинстве накопительных культур доминировали гаммапротеобактерии рода *Halothiobacillus* (Whitman, 2015). В культуре из скважины 49-Э, выросшей на глауконите с метаном (рис. 1в, 1г) преобладали актинобактерии рода *Cellulomonas*, а в культуре, выросшей на сидерите с CO₂ – актинобактерии рода *Actinotalea*. Вторые пересевы накопительных культур из воды скважины 46, с метаном и смешанными минералами Fe(II/III), привели к получению почти чистых культур, содержащих до 99.9% *Halothiobacillus* по данным 16S-профилирования.

Методом 10-кратных разведений представитель *Halothiobacillus* из воды типа Ессентуки № 17 скважины 46 был выделен в чистую культуру и обозначен как штамм Es46-Z0520. Анализ полной последовательности гена 16S рРНК выявил 99.6% сходства нового штамма с типовым штаммом вида и рода *Halothiobacillus neapolitanus* (Whitman, 2015). Дальнейшие эксперименты выявили способность выделенного штамма к аэробному росту с тиосульфатом в качестве донора электронов, что позволяет отнести его к факультативным анаэробам.

Численность гаммапротеобактерий этого рода в сообществе воды скважины 46 не превышала 0.3%. Типовой штамм вида *H. neapolitanus* является

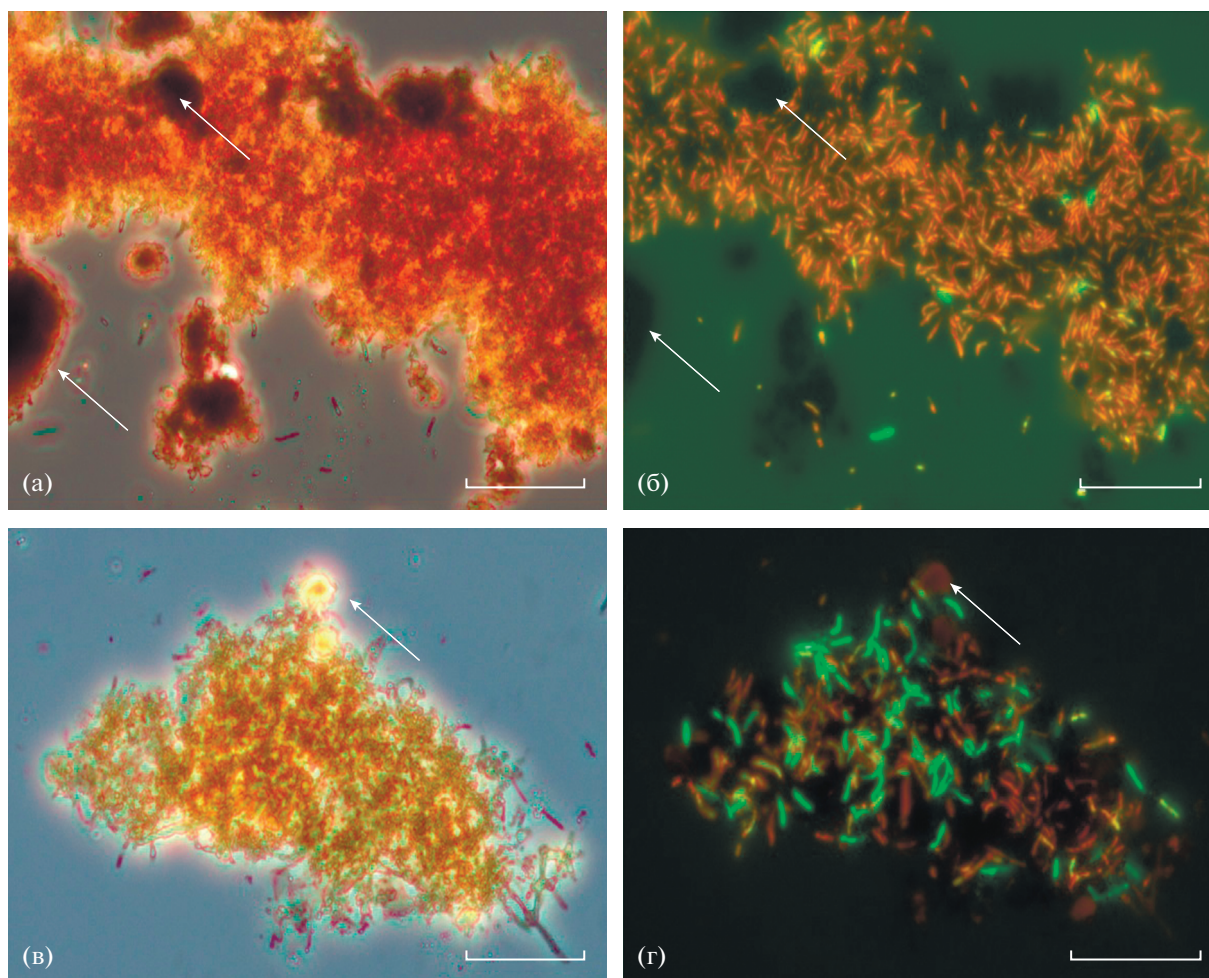


Рис. 1. Фотографии накопительных культур из воды скважины 49-Э (вторые пересевы), выросших на магнетите (а, б) и глауконите (в, г) в присутствии метана в газовой фазе. Слева (а, в) – препараты в световом фазово-контрастном микроскопе, справа (б, г) – те же препараты, окрашенные красителем акридиновым оранжевым, в флуоресцентном микроскопе. Клетки образуют плотные агрегаты вокруг частиц минералов, обозначенных стрелками. Масштабные линейки – 10 мкм.

хемолитоавтотрофом, окисляющим серу в аэробных условиях и фиксирующим CO_2 посредством цикла Кальвина. Этот штамм служит модельным организмом для изучения структуры и функций карбоксисом, содержащих ключевой фермент цикла Кальвина рибулозобисфосфаткарбоксилазу (Menon et al., 2008). Экологическая роль этого минорного компонента микробных сообществ вод типов Эссентуки № 17 и № 4 требует дальнейшего изучения. Не исключено, что численность бактерий данного штамма и его значимость в сообществе как продуцента органического вещества резко возрастает в случае подмешивания аэрированных пресных вод к бескислородным минеральным.

Таким образом, анализ микробных сообществ минеральных вод скважин 46 и 49-Э выявил доминирование в обоих из них некультивируемых микроорганизмов глубоких филогенетических линий (уровня филумов, классов, порядков), кото-

рые, по-видимому, эволюционировали обособленно от поверхностной биосферы и могут представлять собой реликты верхнемеловой микрофлоры. Интересно, что наиболее близкородственные клоны большинства выявленных нами филотипов были детектированы в термальных водных экосистемах или в анаэробных экотопах, приуроченных к месторождениям различных углеводородов (табл. 1). В обоих исследованных нами микробных сообществах широко представлены потенциальные хемосинтезирующие микроорганизмы, способные к фиксации CO_2 в биомассу, метан и/или ацетат, большинство которых еще не выделено в чистые культуры. Такие организмы обуславливают формирование замкнутых сообществ, не связанных непосредственными трофическими связями с поверхностными экосистемами Земли и их фотосинтетической продукцией биомассы. Анализ микробного сообщества воды скважины 46 выявил структуру,

характерную для классической пищевой пирамиды. В нем преобладают потенциально автотрофные микроорганизмы (такие, как *Nadarchaeota*), в то время как органотрофные организмы, зависящие от первичной продукции биомассы и специализирующиеся на потреблении различных ее компонентов (например, археи класса *Thermoplasmata*, нитроспиреи класса *Thermodesulfovibrionia* или фирмикуты группы D8A-2), имеют меньшую представленность, но отличаются большим разнообразием (табл. 1, рис. 2а). Микробное сообщество воды скважины 49-Э характеризуется иной структурой, а именно: значительно большим филогенетическим разнообразием; значительной долей прокариот с неидентифицированным филогенетическим положением (5.4% сообщества, табл. 1); сниженной долей потенциальных автотрофов; широким разнообразием органотрофов, потенциально способных разлагать сложные органические вещества, в том числе, захороненную органику (полисахариды, белки, углеводороды); преобладанием культивируемых гидрогенотрофных метаногенов среди организмов с газовым питанием (рис. 2б). Одной из наиболее вероятных причин этих отличий является нестабильность температурного режима скважины 49-Э (Потапов, 2017), которая, в свою очередь, может быть связана с подмешиванием пресных гидрокарбонатных натриевых вод к минеральным в водопринимном интервале скважины 49-Э (на глубинах 580–865 м). Отсюда и отсутствие классического соотношения авто- и гетеротрофных микроорганизмов в сообществе воды скважины 49-Э, характерного для сбалансированного микробного сообщества воды скважины 46.

Важной общей особенностью микробных сообществ исследованных минеральных подземных вод является преобладание в них микроорганизмов с газовым питанием – в первую очередь, метанотрофов и метаногенов, соответственно, образующих и поглощающих CO_2 . Это наблюдение хорошо согласуется с преобладанием углекислоты в газовой составляющей минеральных вод, а также с существенным (десятки процентов) содержанием в них метана. Таким образом, охарактеризованные микробные сообщества могут оказывать влияние на газовую компоненту вскрываемых минеральных вод, а, следовательно, и на их бальнеологическую ценность. Метаболическая активность доминирующих групп микроорганизмов этих сообществ может быть одной из причин наблюдаемых флуктуаций содержания растворенной и свободной углекислоты, а также концентрации гидрокарбонат-иона в минеральных водах скважин 46 и 49-Э. Высокая численность анаэробных метанотрофов в водах скважины 46 и широкое разнообразие анаэробно дышащих органотрофов в водах скважины 49-Э подразумевают формирование различных синтрофных ассо-

циаций в микробных сообществах этих вод, повышающих термодинамическую эффективность процессов окисления метана или органического вещества в анаэробной восстановительной обстановке. Такие синтрофные ассоциации, как правило, формируются в биопленках, обрастающих твердые поверхности. В условиях водовмещающих пород биопленки могут возникать на поверхности минералов переменновалентных элементов, в первую очередь, серы и железа, которые могут быть использованы в качестве доноров или акцепторов при межвидовом переносе электронов. При высокой метаболической активности синтрофные ассоциации будут оказывать существенное влияние на состав и подвижность соединений железа и серы в водовмещающих отложениях, вскрываемых скважинами 46 и 49-Э Новоблагодарненского участка Эссентукского месторождения. Косвенным подтверждением такого влияния может служить повышенное содержание железа в водах, выведенных скважинами 46 и 49-Э, которое, в свою очередь, может отражать повышенное содержание этого элемента в водовмещающих породах и его активное вовлечение в биогеохимические циклы. Это предположение соотносится с обнаружением в водах, выведенных скважинами 46 и 49-Э, разнообразных таксонов микроорганизмов, для которых показана способность к диссимиляционному восстановлению соединений Fe(III) или серы.

Выявленное нами доминирование некультивируемых микроорганизмов новых глубоких филогенетических линий в обоих микробных сообществах и вероятная независимость этих сообществ от поверхностной биосферы, обеспечиваемая хемосинтетической продукцией биомассы, указывают на необходимость дальнейшего детального изучения функционирования подземных экосистем водовмещающих пород Эссентукского месторождения минеральных вод и региона КМВ в целом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по геолого-гидрохимической характеристике объектов, определению филогенетического состава микробного сообщества, выделению накопительных и чистых культур и анализу данных выполнены при поддержке проекта РФФИ № 21-14-00333. Кроме того, работы СНГ, ААМ, ДГЗ по отбору и фиксации проб для хранения и дальнейшей обработки проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

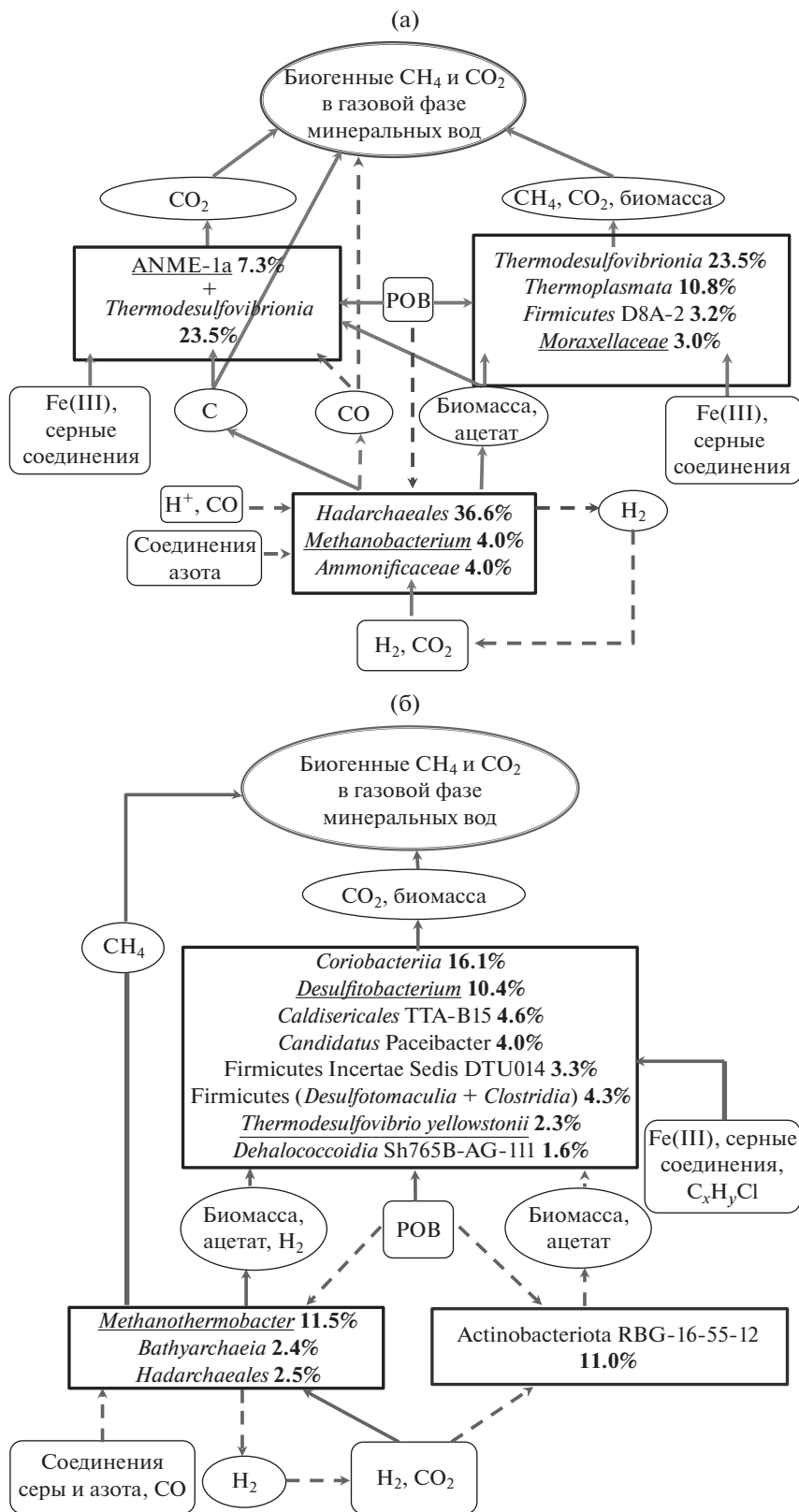


Рис. 2. Предполагаемые трофические связи в микробных сообществах вод и водовмещающих пород, вскрываемых скважинами 46 (а) и 49-Э (б). Пунктиром указаны взаимосвязи, предсказанные с малой достоверностью из-за отсутствия геномных данных об участвующих в них микроорганизмах. Подчеркнуты названия таксонов, для представителей которых имеются достоверные сведения о физиологических свойствах или их геномных детерминантах. POB – растворенное органическое вещество, $\text{C}_x\text{H}_y\text{Cl}$ – хлоруглеводороды, которые могут присутствовать в исследованных водах.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кевбрин В.В., Заварзин Г.А.* Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 812–817.
- Kevbrin V.V., Zavarzin G.A.* The influence of sulfur compounds on the growth of halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum* // Microbiology (Moscow). 1992. V. 61. P. 563–571.
- Кудлаенко Л.Н.* О роли биохимических процессов в изменении состава титонских и валанжинских минеральных вод // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры. 1976. № 3. С. 70–74.
- Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тоцаков С.В.* Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655–664.
- Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V.* Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.
- Муравлева Р.Е., Рублева Г.А., Тимашёва И.Н.* Санитарно-бактериологическая оценка и биологическая активность минеральной воды скважины 9-бис Нагутского месторождения // Курортные ресурсы и их использование. Сб. научных трудов Пятигорского НИИ курортологии и физиотерапии / Под ред. Кривобокова Н.Г. Пятигорск, 1989. С. 113–119.
- Назина Т.Н., Иванова А.Е., Канчавели Л.П., Розанова Е.П.* Новая спорообразующая термофильная метилотрофная сульфатвосстанавливающая бактерия *Desulfotomaculum kuznetsovii* sp. nov. // Микробиология. 1988. Т. 57. С. 823–827.
- Nazina T.N., Ivanova A.E., Kanchaveli L.P., Rozanova E.P.* *Desulfotomaculum kuznetsovii* sp. nov., a new spore-forming thermophilic methylotrophic sulfate-reducing bacterium // Microbiology (Moscow). 1988. V. 57. P. 823–827.
- Потапов Е.Г., Дубинина Г.А., Данилов С.Р., Гаджиханова С.У., Шелкунов А.В., Грабович М.Ю.* Физико-химические и микробиологические исследования подземных минеральных вод района КМВ // Курортная медицина. 2014. № 4. С. 14–20.
- Потапов Е.Г., Данилов С.Р., Гаджиханова С.У.* Генезис углекисло-сероводородных минеральных вод Эссентукского месторождения по данным гидрохимических, микробиологических и изотопных исследований // Курортная медицина. 2017. № 1. С. 11–16.
- Потапов Е.Г.* Аноксическое маастрихт-датское событие и его влияние на гидрохимический облик подземных минеральных вод района Кавказских Минеральных Вод // Курортная медицина. 2019. № 3. С. 4–15.
- Скопина М.Ю., Васильева А.А., Першина Е.В., Пиневиц А.В.* Разнообразие малочисленности: феномен “Разреженной бактериальной биосферы” // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 248–260.
- Skopina M.Yu., Vasileva A.A., Pershina E.V., Pinevich A.V.* Diversity at low abundance: the phenomenon of the Rare Bacterial Biosphere // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 272–282.
- Шинкаренко А.Л.* Гидрогеологическая характеристика и вопросы генезиса Эссентукских углекислых вод. Отчет. Пятигорск: Пятигорский НИИ курортологии и физиотерапии, 1941. 86 с.
- Baker B.J., Saw J.H., Lind A.E., Lazar C.S., Hinrichs K.-U., Teske A.P., Ettema T.J.G.* Genomic inference of the metabolism of cosmopolitan subsurface Archaea, Hadesarchaea // Nat. Microbiol. 2016. V. 1. Art. 16002.
- Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B.* Bergey’s Manual Trust, Hoboken, New Jersey, Wiley, 2015.
- Biddle J.F., Lipp J.S., Lever M.A., Lloyd K.G., Sørensen K.B., Anderson R., Fredricks H.F., Elvert M., Kelly T.J., Schrag D.P., Sogin M.L., Brenchley J.E., Teske A., House C.H., Hinrichs K.U.* Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems of Peru // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 3846–3851.
- Bird J.T., Tague E.D., Zinke L., Schmidt J.M., Steen A. D., Reese B., Marshall I.P.G., Webster G., Weightman A., Castro H.F., Campagna S.R., Lloyd K.G.* Uncultured microbial phyla suggest mechanisms for multi-thousand-year subsistence in Baltic Sea sediments // mBio. 2019. V. 10. e02376-18.
- Chen C.-L., Macarie H., Ramirez I., Olmos A., Ong S.L., Monroy O., Liu W.-T.* Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate // Microbiology (SGM). 2004. V. 150. P. 3429–3440.
- Christopoulou-Aletra H., Togia A., Varlami C.* The “smart” Asclepieion: A total healing environment // Arch. Hellenic Med. 2010. V. 27. P. 259–263.
- Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W.* Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics // Science. 2015. V. 350. P. 434–438.
- Finneran K.T., Forbush H.M., VanPraagh C.V.G., Lovley D.R.* *Desulfitobacterium metallireducens* sp. nov., an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals and humic acids as well as chlorinated compounds // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1929–1935.
- França L., Albuquerque L., da Costa M.S.* *Cavicella subterranea* gen. nov., sp. nov., isolated from a deep mineral-water aquifer, and emended description of the species *Perlucidibaca piscinae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 3812–3817.
- Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B.* An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // Protoc. Exch. 2016. <https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
- He Y., Li M., Perumal V., Feng X., Fang J., Xie J., Sievert S.M., Wang F.* Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments // Nat. Microbiol. 2016. V. 1. Art. 16035.
- Hinrichs K.-U., Hayes, J.M., Sylva S.P., Brewer P.G., DeLong E.F.* Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments // Nature. 1999. V. 398. P. 802–805.
- Huber J.A., Johnson H.P., Butterfield D.A., Baross J.A.* Microbial life in ridge flank crustal fluids // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. P. 88–99.

- Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 5116–5123.
- Iino T., Tamaki H., Tamazawa S., Ueno Y., Ohkuma M., Suzuki K., Igarashi Y., Haruta S. *Candidatus Methanogranum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccales* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata* // *Microbes Environ.* 2013. V. 28. P. 244–250.
- Jousset A., Bienhold C., Chatzinotas A., Gallien L., Gobet A., Kurm V., Küsel K., Rillig M.C., Rivett D.W. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 853–862.
- Kadnikov V., Mardanov A., Beletsky A., Karnachuk O., Ravin N. Genome of the candidate phylum Aminicenantes bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle // *Extremophiles.* 2019. V. 23. P. 189–200.
- Kato S., Hashimoto K., Watanabe K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via semiconductive FeO_x minerals // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. P. 1646–1654.
- Key T.A., Bowman K.S., Lee I., Chun J., Albuquerque L., da Costa M.S., Rainey F.A., Moe W.M. *Dehalogenimonas formicexedens* sp. nov., a chlorinated alkane-respiring bacterium isolated from contaminated groundwater // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 1366–1373.
- Krauze P., Kämpf H., Horn F., Liu Q., Voropaev A., Wagner D., Alawi M. Microbiological and geochemical survey of CO₂-dominated mofette and mineral waters of the Cheb Basin, Czech Republic // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 2446.
- Lloyd K.G., Alperin M.J., Teske A. Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 2548–2564.
- Leclerc H., da Costa M.S. Microbiology of natural mineral waters // *Technology of Bottled Water. Second edn.* / Eds. Senior D., Dege N. Blackwell Publishing Ltd., 2005. P. 325–387.
- Lee J., Koo T., Yulisa A., Hwang S. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition // *J. Environ. Manage.* 2019. V. 241. P. 418–426.
- Lesaulnier C.C., Herbold C.W., Pelikan C., Berry D., Gérard C., Le Coz X., Gagnot S., Niggemann J., Dittmar T., Singer G.A., Loy A. Bottled aqua incognita: microbiota assembly and dissolved organic matter diversity in natural mineral waters // *Microbiome.* 2017. V. 5. P. 126.
- Menon B.B., Dou Z., Heinhorst S., Shively J.M., Cannon G.C. *Halothiobacillus neapolitanus* carboxysomes sequester heterologous and chimeric RubisCO species // *PLoS One.* 2008. Art. 0003570.
- Merino N., Kawai M., Boyd E.S., Colman D. R., McGlynn S.E., Neelson K.H., Kurokawa K., Hongoh Y. Single-cell genomics of novel actinobacteria with the Wood–Ljungdahl pathway discovered in a serpentinizing system // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 1031.
- Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Diversity and metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of Archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // *Life.* 2021. V. 11. P. 953.
- Parkes R.J., Webster G., Cragg B.A., Weightman A.J., Newberry C.J., Ferdelman T.G., Kallmeyer J., Jørgensen B.B., Fry J.C. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time // *Nature.* 2005. V. 436. P. 390–394.
- Parks D.H., Chuvochina M., Chaumeil P.A., Rinke C., Musig A.J., Hugenholtz P. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38. P. 1079–1086.
- Paul C., Pohnert G. Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae // *Nat. Prod. Rep.* 2011. V. 28. P. 186–195.
- Quevedo-Sarmiento J., Ramos-Cormenzana A., Gonzalez-Lopez J. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjarón area (Spain) // *J. Appl. Bacteriol.* 1986. V. 61. P. 365–372.
- Sala-Comorera L., Caudet-Segarra L., Galofré B., Lucena F., Blanch A.R., García-Aljaro C. Unravelling the composition of tap and mineral water microbiota: Divergences between next-generation sequencing techniques and culture based methods // *Int. J. Food Microbiol.* 2020. V. 334. Art. 108850.
- Sohm J.A., Webb E.A., Capone D.G. Emerging patterns of marine nitrogen fixation // *Nature Rev. Microbiol.* 2011. V. 9. P. 499–508.
- Soriano-Lerma A., Pérez-Carrasco V., Sánchez-Marañón M., Ortiz-González M., Sánchez-Martín V., Gijón J., Navarro-Mari J.M., García-Salcedo J.A., Soriano M. Influence of 16S rRNA target region on the outcome of microbiome studies in soil and saliva samples // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. Art. 13637.
- Sułowicz S., Bondarczuk K., Ignatiuk D., Jania J.A., Piotrowska-Seget Z. Microbial communities from subglacial water of naled ice bodies in the forefield of Werenskiöldbreen, Svalbard // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 723. Art. 138025.
- Takai K., Moser D.P., DeFlaun M., Onstott T.C., Frederickson J.K. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 5750–5760.
- The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2014.
- Thomas C., Francke A., Vogel H., Wagner B., Ariztegui D. Microbial life in ridge flank crustal fluids settings // *Microorganisms.* 2020. V. 8. Art. 1736.
- Timmers P.H.A., Welte C.U., Koehorst J.J., Plugge C.M., Jetten M.S.M., Stams A.J.M. Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea // *Archaea.* 2017. P. 1654237. <https://doi.org/10.1155/2017/1654237>
- Umezawa K., Kojima H., Kato Y., Fukui M. *Dissulfurispiria thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic chemolithoautotroph growing by sulfur disproportionation, and proposal of novel taxa in the phylum Nitrospirota to reclassify the genus *Thermodesulfobivrio* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2021. V. 44. Art. 126184.
- Wang F.P., Zhang Y., Chen Y., He Y., Qi J., Hinrichs K.U., Zhang X.X., Xiao X., Boon N. Methanotrophic archaea pos-

sessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways // ISME J. 2014. V. 8. P. 1069–1078.

Wasserfallen A., Nödling J., Pfister P., Reeve J., Conway de Macario E. *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov. and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 43–53.

Watanabe M., Kojima H., Fukui M. Review of *Desulfotomaculum* species and proposal of the genera *Desulfallas* gen. nov., *Desulfofundulus* gen. nov., *Desulfofarcimen* gen. nov. and *Desulfohalotomaculum* gen. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 2891–2899.

Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. w2882–w2888.

Wrighton K.C., Agbo P., Warnecke F., Weber K.A., Brodie E.L., DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Andersen G.L., Coates J.D. A novel ecological role of the Firmicutes identified in thermophilic microbial fuel cells // ISME J. 2008. V. 2. P. 1146–1156.

Zhang Y., Shuikui D., Qingzhu G., Ganjurjav H., Xuexia W., Wei G. “Rare biosphere” plays important roles in regulating soil available nitrogen and plant biomass in alpine grassland ecosystems under climate changes // Agric. Ecosyst. Environ. 2019. V. 279. P. 187–193.

Diversity of Novel Uncultured Prokaryotes in Microbial Communities of the Yessentukskoye Underground Mineral Water Deposit

S. N. Gavrilov¹*, E. G. Potapov², M. I. Prokof'eva¹, A. A. Klyukina¹,
A. Yu. Merkel¹, A. A. Maslov³, and D. G. Zavarzina¹

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

²Pyatigorsk Research Institute of Balneology, Pyatigorsk, 357601 Russia

³Geological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: sngavrilov@gmail.com

Received September 17, 2021; revised September 26, 2021; accepted September 28, 2021

Abstract—Caucasean Mineral Waters is a unique territory, where various types of mineral waters with overall daily flow over 16000 m³ are concentrated in a relatively small area. The Yessentukskoye deposit is characterized by high diversity of water types, of which Yessentuki nos. 17 and 4 are produced in the greatest amounts. Biogeochemical activity of microorganisms inhabiting the subsurface hydrosphere is one of the proposed mechanisms responsible for the genesis of these waters. The influence of microbial communities on the quality of balneological water resources is presently quite poorly studied. This is the first report on characterization of two communities inhabiting the water-bearing rocks and mineral waters of the Yessentukskoye deposit. The 16S rRNA gene profiling of these communities revealed predominance of uncultured archaea of the phylum *Hadarchaeota* (36.6%) in the Yessentuki no. 17 water retrieved from the well 46 and of several new classes of uncultured actinobacteria (29.4%) in the Yessentuki no. 4 water retrieved from the well 49-E. Significant differences were revealed in the structure of microbial communities inhabiting the water-bearing horizons of these two wells having different hydrochemical characteristics. Enrichment and pure cultures of the microorganisms belonging to the less abundant taxa were obtained. Analysis of metadata on genomic properties of prokaryotes of the dominant taxa revealed in this work indicates their ability to grow chemoautotrophically and thus, their potential involvement in redox transformations of the water-bearing rocks and the gas component of mineral waters.

Keywords: mineral waters, subsurface ecosystems, microbial communities, uncultured microorganisms, rare biosphere, chemolithotrophy

МОРФОЛОГИЯ И ФИЛОГЕНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *COLEOCHLAMYS APODA* (MICROTHAMNIALES, CHLOROPHYTA)¹

© 2022 г. В. В. Редькина^а, *, А. Д. Темралеева^а, Е. А. Портная^а, Р. Р. Шалыгина^б

^аИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия

^бИнститут проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ РАН, Анапиты, 184209 Россия

*e-mail: kalmykova_v_v@mail.ru

Поступила в редакцию 14.09.2021 г.

После доработки 24.09.2021 г.

Принята к публикации 24.09.2021 г.

В статье приведены результаты морфологического и филогенетического анализа штамма *Coleochlamys apoda* ACSSI 377, выделенного из образца биологической почвенной корочки с поверхности песчаного субстрата на Севере России (Мурманская область). Подробно описана морфология штамма, отмечено наличие зрелых клеток S-образной формы, характерных для вида *C. oleifera*, впервые зафиксировано образование синзооспор. По данным анализа генов 18S рРНК и *rbcL* штамм является представителем рода *Coleochlamys* внутри порядка *Microthamniales*, относится к виду *C. apoda* и представляет собой первую находку вида на территории России, подтвержденную молекулярно-генетическими методами. Присутствие на филогенетическом дереве гена 18S рРНК клад, состоящих из некультивируемых клонов, свидетельствует о слабой изученности порядка и перспективах обнаружения и описания новых его представителей. На основе литературных данных и собственных наблюдений проанализированы экология и распространение *Coleochlamys* и сестринского рода *Microthamnion*. Представители *Coleochlamys* предпочитают холодные местообитания и имеют ограниченный ареал распространения, в отличие от *Microthamnion*, находки которого многочисленны и зафиксированы в различных регионах.

Ключевые слова: зеленые микроводоросли, почвенные биологические корочки, 18S рРНК, *rbcL*, первая находка, Колская Арктика, Мурманская область

DOI: 10.31857/S0026365622010116

Род эукариотических водорослей *Coleochlamys* был впервые описан советским альгологом А.А. Коршиковым (1953) на основе штамма, выделенного из сфагнового болота на территории Украины, которому было дано название – *Coleochlamys apoda* Korschikov. Среди характерных признаков указывались следующие морфологические характеристики: клетки булавовидные, прямые или изогнутые, но в целом неправильной и очень изменчивой формы, на одном конце широко округлые, на втором – суженные. Хлоропласт пристенный, с одним (изредка двумя) пиреноидом. Размножение зооспорами, образующимися делением протопласта на 16–32–64 части. Одна часть протопласта, лежащая в узком конце клетки, не превращается в зооспору, а, оставаясь на своем месте, покрывается оболочкой и разраста-

ется в новую вегетативную клетку внутри старой оболочки. Зооспоры голые, сначала почти круглые, затем удлинённые, спереди заостренные, с двумя жгутиками и стигмой, освобождаются через глубокий поперечный разрыв оболочки у самой вершины зооспорангия. Позднее в род *Coleochlamys* были включены еще четыре вида: *C. oleifera*, *C. cucumis*, *C. maxima*, *C. perforata*, различающиеся по размеру и форме клеток, типу хлоропласта (Ettl, Gärtner, 2013). Дальнейшая ревизия рода с использованием молекулярно-филогенетического анализа пяти штаммов, идентифицированных как *Coleochlamys*, дала возможность выделить только два четко дифференцированных вида: *C. apoda*, типовой вид рода, и *C. oleifera* (Vargyutė et al., 2021). Они различаются формой клеток, наличием или отсутствием продолжения клеточной стенки, напоминающего сосочек, а также компенсаторными заменами во вторичной структуре ITS2. Кроме того, показано, что роды *Rhopalocystis* и *Fusochloris* являются более поздними синони-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622010116 для авторизованных пользователей.

мами *Coleochlamys*, а водоросли, первоначально описанные как *Characium perforatum* K.W. Lee & Bold и *Rhopalocystis cucumis* Reisingl являются аналогами *C. apoda*. Таксономический статус *C. maxima* остался нерешенным ввиду отсутствия аутентичного штамма и его нуклеотидных последовательностей. Таким образом, на данный момент таксономически признаны два вида рода *Coleochlamys*:

Coleochlamys apoda Korshikov (гетеротипные синонимы: *Characium perforatum* K.W. Lee & H.C. Bold; *Fusochloris perforata* (K.W. Lee & H.C. Bold) G.L. Floyd & Shin Watanabe; *Rhopalocystis cucumis* Reisingl; *Coleochlamys cucumis* (Reisingl) H. Ettl & G. Gärtner), морфология соответствует описанию А.А. Коршикова (1953), основные отличительные черты от вида *C. oleifera* – клетки большей частью широко эллипсоидные, часто с утолщением оболочки в виде сосочка на более узком конце;

Coleochlamys oleifera (Schussnig) Fott (базионим: *Rhopalocystis oleifera* Schussnig), характерная особенность – S-образная форма зрелых клеток, утолщение оболочки на более узком конце не столь выражено, присутствуют многочисленные бесцветные липидные гранулы.

Наиболее близким к *Coleochlamys* является род *Microthamnion*, включающий 5 таксономически признанных видов: *M. curvatum*, *M. exiguum*, *M. strictissimum*, *M. vexator* и голотип – *M. kuetzingianum*. В генетических базах данных имеются нуклеотидные последовательности только *M. kuetzingianum*. И хотя в целом представители рода имеют очень широкое распространение по всему миру, две линии внутри группы включают штаммы из экстремальных сред обитания (Reder, 2019), на основании чего для поиска новых представителей порядка *Microthamniales* предлагается делать акцент на исследовании необычных местообитаний. При этом экстремофилы часто обладают значительным биотехнологическим потенциалом (Varshney, 2015; Leya, 2020). Так, имеются сведения, что *M. kuetzingianum* проявляет устойчивость к повышенной кислотности среды, высоким концентрациям металлов, потенциально способен к извлечению токсикантов из субстрата (Foster, 1982; Lampkin, Sommerfeld, 1982; Vara Prasad, de Oliveira Freitas, 2003; Bray, 2007; Płachno et al., 2015). У *Coleochlamys oleifera* (SAG 6.90) обнаружены антибактериальные свойства против *Bacillus subtilis* (Mudimu, 2014). Кроме того, способность к накоплению липидов как продуктов ассимиляции, отмеченная у представителей *Coleochlamys* и *Microthamnion* (Printz, 1964), вызывает интерес с точки зрения производства биотоплива или нутрицевтиков.

В 2020 году из образца биологической почвенной корочки с поверхности песчаного субстрата нами был выделен штамм зеленой микроводоросли, морфологические признаки которого соответство-

вали описанию рода *Coleochlamys*. Поскольку находки таксона на территории России редки и никогда не были подтверждены молекулярно-генетическими методами, а чистые культуры на тот момент отсутствовали в отечественных альгологических коллекциях, целью работы стал морфологический анализ штамма ACSSI 377 и установление его филогенетического положения внутри порядка *Microthamniales* на основе анализа двух генов – 18S рРНК и *rbcL*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изоляция и культивирование штамма. Объектом исследования послужил штамм из рабочей коллекции QUA-11, изолированный авторами из образца биологической почвенной корочки, сформированной на поверхности песчаного карьера ОАО “Апатитыводоканал” (г. Апатиты, Мурманская обл.). Карьер заложен на флювиогляциальных отложениях, расположен в центральной части Мурманской области (67.600818 N, 33.498229 E), в предгорье Хибин в долине реки Белая, в подзоне северной тайги. Штамм был депонирован в Альгологическую коллекцию Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (Algal Collection of Soil Science Institute) под номером ACSSI 377. Культивирование проводили на агаризованной среде 3N BBM в климатостате (температура 23–25°C, свет 60–75 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, фотопериод 12 ч).

Микроскопия. Морфологию и жизненный цикл штамма ACSSI 377 изучали методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Olympus CX41 (Япония) и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) в ЦКП ИФХиБПП. Результаты наблюдений документированы фотографиями, снятыми с помощью цветных цифровых камер ProgRes Jenoptik (Германия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Сроки наблюдения за штаммом составляли от 1.5 недель до 4 месяцев. Для стимуляции формирования зооспорангиев и выхода зооспор применяли модифицированный способ, описанный В.М. Андреевой (1998). Для этого водоросль из 4-недельной жидкой культуры переносили на агаризованную среду BBM, приготовленную в двух вариантах – содержащую тройное количество азота с добавлением 1.5% глюкозы и лишенную азота без внесения глюкозы. Через два дня водоросль переносили в каплю дистиллированной воды и проводили наблюдение под микроскопом.

Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК. ДНК выделяли из биомассы с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, США), следуя протоколу производителя. При амплификации использовали готовую смесь для ПЦР Screen Mix-HS (“Евроген”, Россия). Прайме-

Таблица 1. Праймеры и условия амплификации генов 18S рРНК и *rbcL*

Ген	Праймер	Последовательность (5'–3')	Условия амплификации
18S рРНК	18SF	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	95°C – 5 мин; 95°C – 1 мин; 55°C – 1 мин; 72°C – 2 мин, 35 циклов; 72°C – 5 мин
	18SR	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	
	416–37R*	ATTTGCGCGCCTGCTGCCTTC	
	1323–44F*	CGAACGAGACCTCAGCCTGCTA	
	898–919R*	TAAATCCAAGAATTTACCTCT	
<i>rbcL</i>	M28F	GGTGTTGGATTWAAAGCTGGTGT	94°C – 5 мин; 94°C – 1 мин 15 с; 56°C – 2 мин; 72°C – 2 мин 15 с, 30 циклов; 72°C – 7 мин
	M1390Ra	CTTTCCAAAYTTCACAAGCAGCAG	
	M633F*	CATGCGTTGGAGAGACCGT	
	M650R*	CGGTCTCTCCAACGCATGA	

* Внутренние секвенирующие праймеры.

ры и условия для амплификации генов 18S рРНК (Katana et al., 2001) и *rbcL* (McManus, Lewis, 2011) указаны в табл. 1. Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле (краситель SYBR Safe). Для дальнейшей очистки ампликонов из геля использовали набор Cleanup S-Cap (“Евроген”, Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО “Евроген” (Россия).

Молекулярно-филогенетический анализ. Для уточнения филогенетического положения штамма ACSSI 377 был осуществлен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей генов 18S рРНК и *rbcL* по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для дальнейшего анализа была составлена выборка из 62 последовательностей ядерного гена 18S рРНК, принадлежащих некультивируемым образцам из природной среды, культивируемым штаммам рода *Coleochlamys* и штаммам других эукариотических водорослей с уровнем гомологии до 94% включительно (табл. S1; дополнительные материалы). Множественное выравнивание было выполнено в программе BioEdit по алгоритму ClustalW. Общая длина анализируемых последовательностей составила 1757 п.н. При выборе модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest и минимальное значение критерия AIC. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) в программе PhyML. В качестве внешней группы, учитывая филогенетическую реконструкцию Barcytė et al. (2021), выбрали представителей класса *Chloro-*

phyceae (*Chlorophyta*) – *Chloromonas rosae* (AB624565) и *Chlamydomonas reinhardtii* (M32703). Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов. Анализ последовательностей гена 18S рРНК методом Байеса (Bayesian Inference, BI) проводили с помощью программы BEAST v1.8.4. со следующими параметрами: 10⁸ МСМС поколений, деревья и оцениваемые параметры записывались каждые 10⁴ поколений. Сходимость результатов анализа оценивалась в Tracer 1.5 с помощью статистики ESS (эффективный размер выборки). Все параметры были оценены достаточно (значения ESS > 300). Первые 25% деревьев были отброшены, на основе остальных с помощью TreeAnnotator v1.8.4 получили консенсусное филогенетическое дерево и апостериорные вероятности его ветвления.

Для уточнения филогенетических отношений на видовом уровне использовали более варибельный пластидный ген *rbcL*, при анализе которого в выборку вошли нуклеотидные последовательности 9 штаммов (табл. S1; дополнительные материалы), принадлежащих родам *Coleochlamys*, *Microthamnion*, и двух штаммов внешней группы – *Chlamydomonas bilatus* (AF517082) и *Chloromonas rosae* (AB022532). Общая длина анализируемых последовательностей составила 1322 п.н. При реконструкции филогенетических взаимосвязей с помощью метода ML статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов. BI анализ проводили с помощью программы BEAST v1.8.4. со следую-

щими параметрами: 10^9 МСМС поколений, деревья и оцениваемые параметры записывались каждые 10^5 поколений. Сходимость результатов анализа оценивалась в Tracer 1.5 с помощью статистики ESS. Все параметры были оценены достаточно (значения ESS > 300). Первые 25% деревьев были отброшены, на основе остальных с помощью TreeAnnotator v1.8.4 получили консенсусное филогенетическое дерево и апостериорные вероятности его ветвления.

Топология деревьев, полученных методами ML и BI, существенно не различалась для обоих маркеров, поэтому в программе FigTree v. 1.3.1 были визуализированы BI-деревья, на которые в качестве статистической поддержки были нанесены бутстрэп-значения (в процентах) и апостериорные вероятности (в долях). Для сравнения топологии деревьев использовали данные статьи Barcytė et al. (2021). Генетические различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических дистанций, мерой которых являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выравненных последовательностей, вычисленных в программе MEGA 6.0. Боксплот генетических дистанций построен в среде статистического программирования R 3.4.4 (<https://www.R-project.org/>). Вариативный регион V9 гена 18S рПНК, предлагаемый в качестве ДНК-баркода для зеленых водорослей (Darienko et al., 2015; Pröschold, Darienko, 2020a), был обнаружен только в трех последовательностях, принадлежащих штамму ACSSI 377 (MZ562721), *M. kuetzingianum* (Z28974) и *Characium perforatum* (M62999), в соответствии с работами Van de Peer et al. (1997) и Pröschold, Darienko (2020b). Фолдинг вторичной структуры региона осуществлен с помощью веб-сервера RNAfold по принципу минимальной энергии и визуализирован в программе PseudoViewer3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология штамма ACSSI 377. Клетки широко эллипсоидные или вытянутые (рис. 1.1), каплевидные (рис. 1.2), грушевидные, в форме треугольника с притупленными углами, иногда S-образной формы (рис. 1.3) или изогнутые в форме бумеранга (рис. 1.8). В культуре присутствуют клетки, имеющие выпуклость оболочки в виде сосочка на одном из концов или сторон (рис. 1.2, 1.9), а также закругленные с обоих полюсов (рис. 1.1). Хлоропласт пристенный, с одним, реже двумя (рис. 1.4) пиреноидами. Пиреноид имеет крахмальную обертку, состоящую из нескольких скорлупок. Единственное ядро достаточно крупное и хорошо различимо (рис. 1.1). Цитоплазма имеет зернистую структуру, содержит липидные капли. Зрелые клетки могут достигать 60 мкм в длину, 20 мкм — в ширину. Размножение автоспорами (рис. 1.5), апла-

носпорами и зооспорами (рис. 1.6). Автоспоры овальной, каплевидной или грушевидной формы, от 8 мкм в длину, иногда значительно увеличиваются в размерах прямо внутри оболочки спорангия, оставаясь некоторое время связанными друг с другом. Зооспоры сначала округлые, затем вытянутые с заостренным передним концом, с двумя жгутиками, по длине примерно равными длине зооспоры. Стигма расположена в переднем конце клетки или занимает почти срединное положение. Размер зооспор $5.3\text{--}6.8 \times 2.2\text{--}3.6$ мкм. Апланоспоры грушевидной формы, имеют стигму, занимающую срединное положение или расположенную ближе к переднему концу клетки, очень редко — в широком ее конце. Хлоропласт содержит пиреноид. Размер апланоспор $6.7\text{--}8.2 \times 2.9\text{--}3.6$ мкм. Чаще всего мы наблюдали зоо- и апланоспорангии, содержащие 32 зоо- или апланоспоры, которые освобождаются путем разрыва материнской оболочки со стороны широкого конца. После выхода зооспор и апланоспор часть протопласта, лежащая в узком конце клетки, остается на месте, в дальнейшем разрастаясь в новую вегетативную клетку (рис. 1.7). Кроме того, в культуре присутствовали многожгутиковые зооспоры, так называемых синзооспоры, — комплексы из двух и более сросшихся зооспор, этот морфологический признак описан впервые.

В целом, штамм соответствует описанию вида *C. apoda*, однако присутствие в культуре клеток S-образной формы, закругленных с обоих концов, сближает наш штамм с другим видом — *C. oleifera*. Кроме того, наши наблюдения и данные Barcytė et al. (2021) свидетельствуют о морфологической изменчивости в зависимости от физиологического состояния культуры и условий культивирования. Морфологическая пластичность в ответ на изменения условий ранее отмечена и для сестринского рода *Microthamnion* (John, Johnson, 1987). Представители этого рода, в отличие от *Coleochlamys*, образуют разветвленные нити, заканчивающиеся тупо закругленными клетками. Единственный париетальный хлоропласт не имеет пиреноида. Однако так же, как и у *Coleochlamys oleifera*, в цитоплазме клеток *Microthamnion* в качестве продукта ассимиляции обнаруживаются липидные капли (Printz, 1964), размножение происходит с помощью зооспор, развивающихся в вегетативных клетках, подвергшихся дифференцировке в зооспорангии (Watson & Arnott, 1973; Watson, 1975; John & Johnson, 1987; Bakker, 1995), половое воспроизводство неизвестно. В лабораторных экспериментах было замечено, что в диапазоне температур $10\text{--}28^\circ\text{C}$ и интенсивности света 3–20 кЛк происходит быстрый рост клеток, в результате чего они становятся более длинными (морфотип *M. strictissimum*), тогда как температуры и интенсивность света ниже этих значений обеспечивают более медленный рост и меньшие размеры клеток

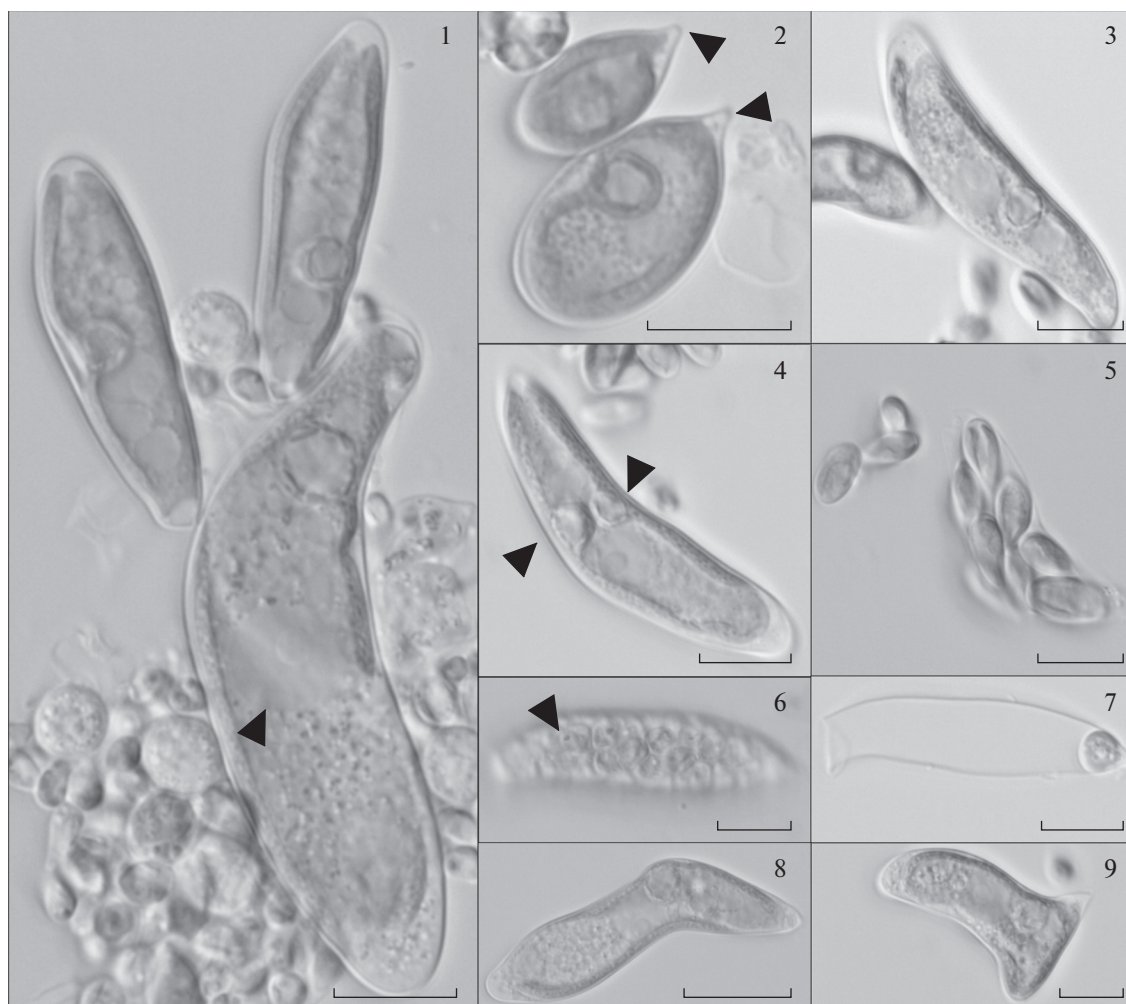


Рис. 1. *Coleochlamys apoda* ACSSI 377. 1 – зрелые вегетативные клетки, черным треугольником отмечено ядро; 2 – молодые клетки с выступом клеточной стенки в виде сосочка (отмечены черными треугольниками); 3 – S-образная форма зрелой клетки; 4 – клетка с двумя пиреноидами (отмечены черными треугольниками); 5 – автоспорангий с автоспорами; 6 – зооспорангий, стигма зооспор отмечена черным треугольником; 7 – оболочка зооспорангия с частью протопласта, не превратившегося в зооспору; 8–9 – зрелые клетки различной формы. Масштабная метка – 10 мкм.

(морфотип *M. kuetzingianum*) (John, Johnson, 1987). Таким образом, морфологическая изменчивость существенно усложняет разграничение видов порядка *Microthamniales* и доказывает необходимость использования молекулярно-генетического анализа для точного определения таксономической принадлежности представителей этой группы.

Филогенетический анализ. На дереве, построенном на основе последовательностей гена 18S рРНК (рис. 2), внутри порядка *Microthamniales* с высоким уровнем статистической поддержки обособлены 5 групп. Три из них (клады 1, 3, 5 на рис. 2) сформированы некультивируемыми эукариотическими клонами из образцов минеральных отложений на поверхности ледника Мидл-Форк-Токлат, расположенного в национальном парке Денали (Аляска, США) (Schmidt, Darcy, 2015). Клада 4 включает все штаммы рода *Coleo-*

chlamys, в том числе, исследуемый нами штамм ACSSI 377. В кладу 2 вошли представители сестринского рода *Microthamnion*. Генетические различия между штаммом ACSSI 377 и штаммами вида *Coleochlamys apoda*, включая аутентичный штамм SAG 28.85, составили 0.1% (табл. S2; дополнительные материалы). В то же время генетические дистанции между штаммом другого вида рода *Coleochlamys* – *C. oleifera* и штаммами, отнесенными к *C. apoda*, включая ACSSI 377, составляли 0.8%. Генетические дистанции между представителями *Coleochlamys* и сестринским родом *Microthamnion* варьировали в пределах 1.4–1.9%. Судя по перекрывающимся диапазонам значений генетических дистанций, межвидовых внутри кладу 4 (0.8%) и между кладами 4 и 5 (0.8–1.7%), группа клонов кладу 5 либо включает представителей отдельного вида рода *Coleochlamys*, либо

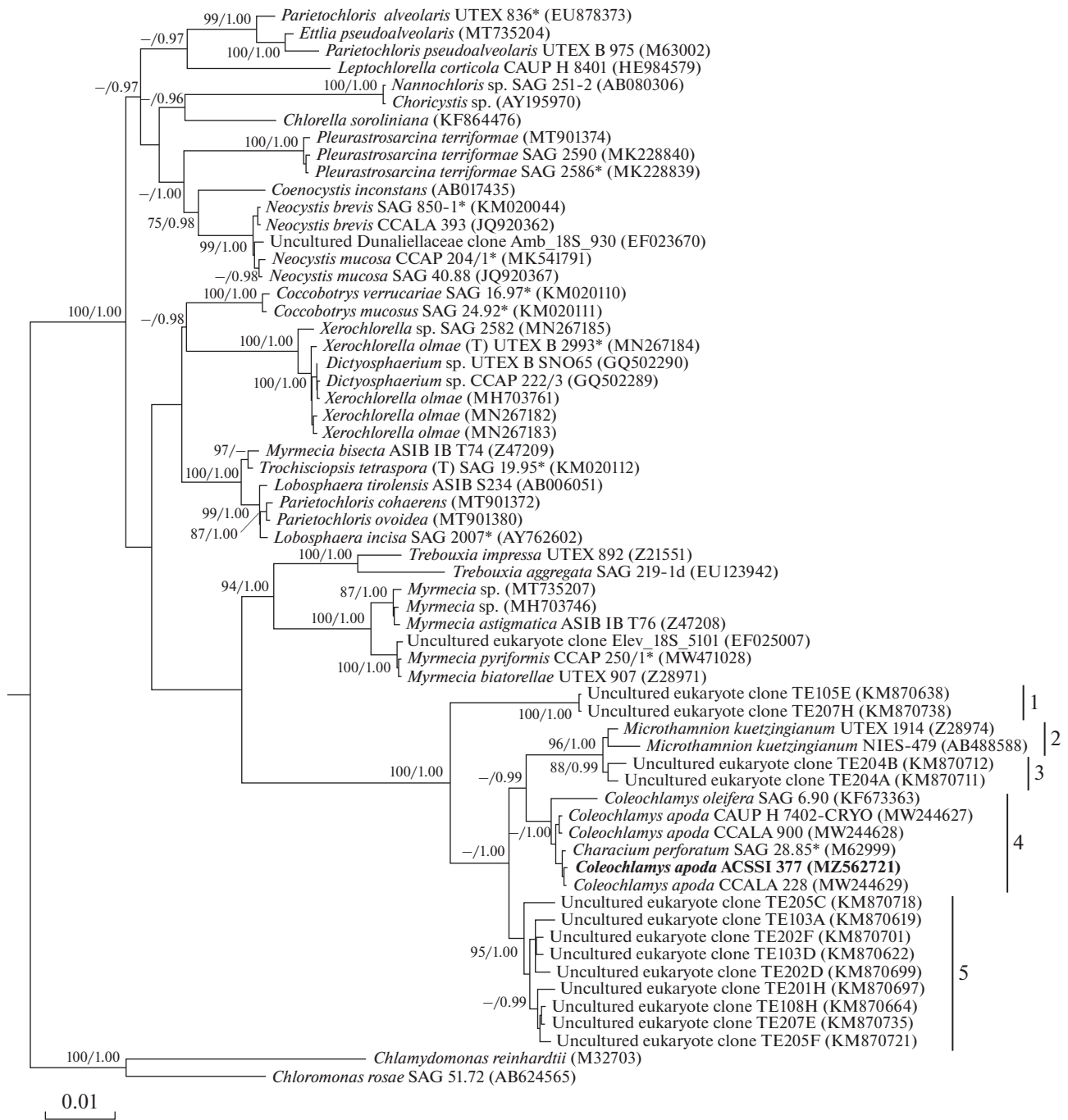


Рис. 2. Укорененное филогенетическое дерево, построенное методом Байеса и ML на основе последовательностей гена 18S рРНК. В качестве статистической поддержки узлов дерева над соответствующими ветвями указаны бутстреп-значения/апостериорные вероятности. Значения менее 70% и менее 0.95 не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. Обозначения: жирным шрифтом выделен штамм ACSSI, (Т) – типовой вид, * – аутентичный штамм.

формирует еще один род внутри порядка *Microthamniales*. Для уточнения их таксономического положения необходим анализ живых культивируемых штаммов, принадлежащих этой группе.

Кроме того, мы проанализировали вторичную структуру варибельного региона V9 гена 18S рРНК у представителей порядка *Microthamniales*,

который предлагается в качестве ДНК-баркода зеленых водорослей. Так как регион расположен в конце гена 18S рРНК, то его часто не секвенируют. Так, из всех изученных 62 нуклеотидных последовательностей он был обнаружен только в трех, включая исследуемый штамм. ACSSI 377 и *C. apoda* (= *Characium perforatum* M62999) имеют

идентичный регион V9, за исключением единственной замены (рис. 3). Штаммы *C. apoda* отличаются от *M. kuetzingianum* (Z28974) верхней частью шпильки V9.

Так как с помощью анализа ядерного гена 18S рРНК мы не получили достаточную поддержку группы *C. apoda* (значение апостериорной вероятности для этого узла – 0.72, а на дереве ML он и вовсе отсутствует), то для усиления филогенетического сигнала был проведен анализ более вариабельного пластидного гена *rbcL*. На *rbcL*-дереве (рис. 4), штамм ACSSI 377 с максимальным уровнем статистической поддержки (100/1.00) группировался с представителями рода *Coleochlamys*. Внутри группы произошла четкое разделение (уровень поддержки 94/1.00) на два вида – *C. apoda*, включая ACSSI 377, и *C. oleifera*. Внутривидовые генетические дистанции составили 0–0.3%, межвидовые – 2.9–3.2%, межродовые дистанции варьировали в пределах 10.9–11.4% (рис. 5), все диапазоны не перекрывались между собой.

Следует отметить, что в генетической базе GenBank кроме последовательностей 18S рРНК и *rbcL* имеются последовательности высоковариабельного спейсера ITS2 пяти штаммов *Coleochlamys*. В работе Barcytė et al. (2021) проведено сравнение вторичных структур ITS2, на основе чего сделан вывод о конспецифичности четырех штаммов *Coleochlamys apoda* (CAUP N 7402-CRYO, SAG 28.85, CCALA 228 и CCALA 900) и о существенном их отличии от штамма *Coleochlamys oleifera* (SAG 6.90).

Таким образом, и анализ спейсера ITS2, и анализ гена *rbcL* способны разрешить филогенетические отношения внутри рода *Coleochlamys*. К схожему выводу пришел Reder (2019), применив различные комбинации молекулярных маркеров для определения границ видов в пределах сестринского рода *Microthamnion*. Деревья, учитывающие последовательности *rbcL*, имели лучшую топологию и уровни статистической поддержки, чем построенные на основе какого-либо одного маркера (гены 18S рРНК, 5.8S рРНК, 28S рРНК, спейсер ITS2). Таким образом, пластидный ген *rbcL* рекомендован в качестве молекулярного маркера для быстрого скрининга новых изолятов *Microthamnion* и для идентификации новых генетических разновидностей (Reder, 2019).

Итак, по данным анализа генов 18S рРНК и *rbcL* штамм ACSSI 377 является представителем рода *Coleochlamys* внутри порядка *Microthamniales* и относится к виду *C. apoda*. Кроме того, на дереве, построенном на основе анализа 18S рРНК, с высоким уровнем статистической поддержки обособлены 3 группы последовательностей некультивируемых эукариотических клонов из образцов минеральных отложений на поверхности ледника (Аляска, США), которые, судя по величинам генетических

дистанций, соответствуют новым неописанным видам и (или) родам порядка *Microthamniales*.

Экология и распространение. Представители рода *Coleochlamys* населяют как пресноводные, так и наземные биотопы. Изученные молекулярно-филогенетическими методами штаммы *Coleochlamys* (Barcytė et al., 2021) были изолированы из холодных местообитаний Арктики (пресная вода, почва), Антарктики (пресная вода) и регионов с умеренным климатом (Словакия, снежный покров в горах). Коллекция культур водорослей Киевского национального университета имени Тараса Шевченко включает 4 штамма *Coleochlamys* cf. *oleifera*, выделенных из мохового покрова на о. Галиндез (Архипелаг Аргентинские о-ва, территория Украинской антарктической станции “Академик Вернадский”) (Костиков и соавт., 2009), однако их нуклеотидные последовательности отсутствуют в генетических базах данных. По результатам флористических исследований, проведенных на архипелаге Шпицберген, сообщается о находках *Coleochlamys* в криоконитовых норах, подледниковых и бесплодных почвах (Kaštovská et al., 2005; Stibal et al., 2006; Kim et al., 2011) и на субстратах антропогенного происхождения, таких как поверхность зданий (Raabová et al., 2016). Имеются сведения о флористических находках *Coleochlamys* в пещерах Ойцовского национального парка Польши (Czerwik-Marcinkowska et al., 2015) и в почве вершин Эцтальских Альп (Австрия) (Gärtner, 2013).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что зеленые водоросли рода *Coleochlamys* являются психротолерантными микроорганизмами и, вероятно, предпочитают более низкие температуры. Однако в коллекции водорослей университета Коимбры в Португалии (Coimbra Collection of Algae, <http://acoi.ci.uc.pt/>) имеется 3 штамма *Coleochlamys*, два из которых выделены из пресной воды на территории страны. В этой же коллекции мы нашли сведения о штамме, отнесенном к роду *Hydrianium* (АСОI 2070, озеро в Португалии), морфология которого, судя по имеющимся на сайте коллекции фотографиям, очень схожа с морфотипом *Coleochlamys*. Это в очередной раз свидетельствует о сложности определения представителей рода и необходимости использования молекулярно-генетических методов идентификации. Кроме того, представители *Coleochlamys* приводятся в списках водорослей, найденных в тропических водоемах с бромелиями в Мексиканском штате Веракрус (Hernández-Rodríguez et al., 2014), а также в пресноводных местообитаниях и на скалах, омываемых водой, в бразильском штате Сан-Паулу (Fernandes, 2008).

Российскими почвенными альгологами ранее сообщалось о флористических находках представителей рода *Coleochlamys* в грунте (мелкозем и

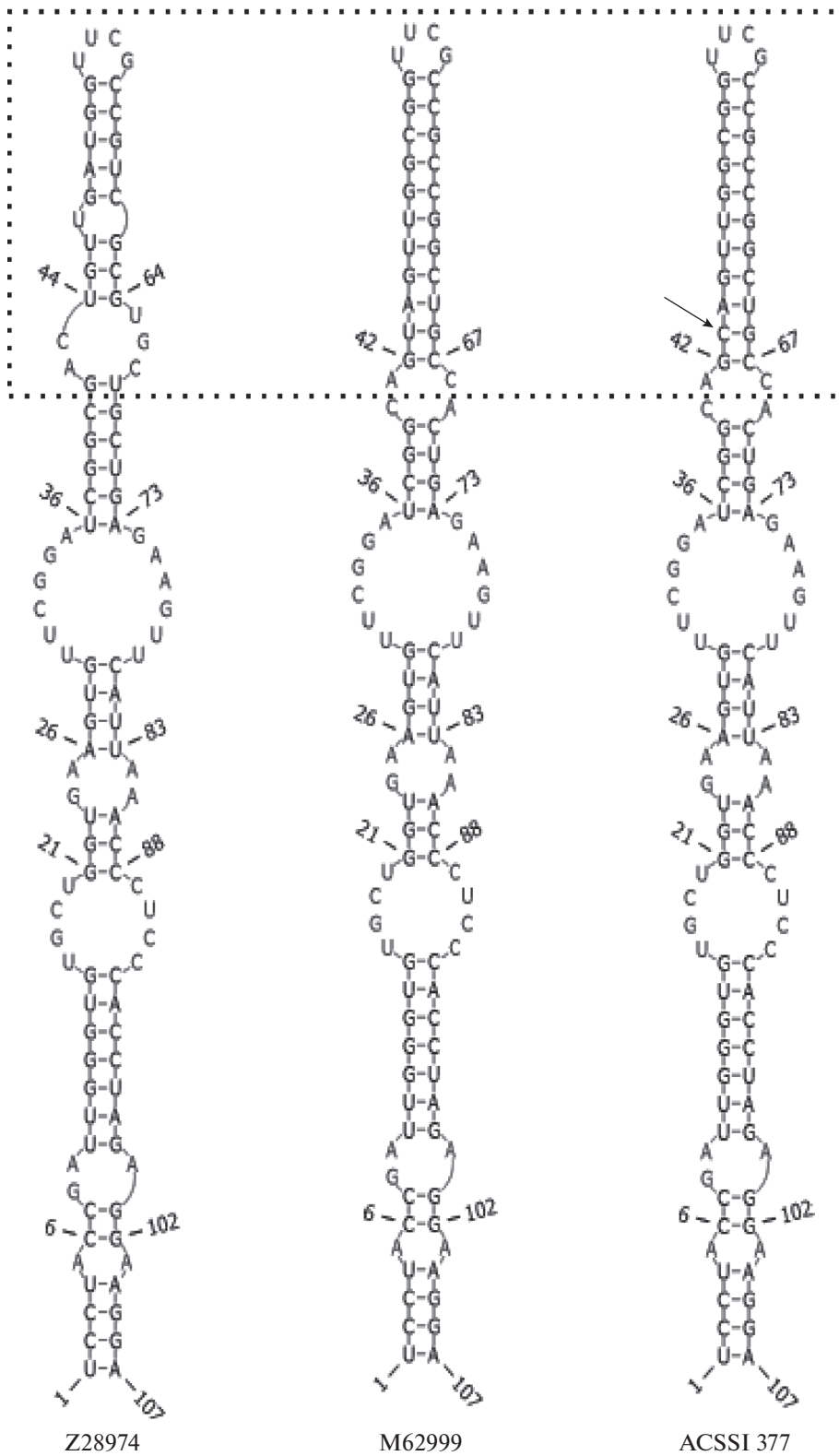


Рис. 3. Вторичная структура варибельного региона V9 гена 18S рРНК у представителей порядка *Microthamniales*. Стрелкой отмечена замена нуклеотида у штамма ACSSI 377 по сравнению со штаммом *Characium perforatum* (M62999). Пунктирным прямоугольником отмечена верхняя часть шпильки V9, отличающаяся у *Microthamnion kuetzingianum* и двух представителей вида *Coleochlamys apoda*.

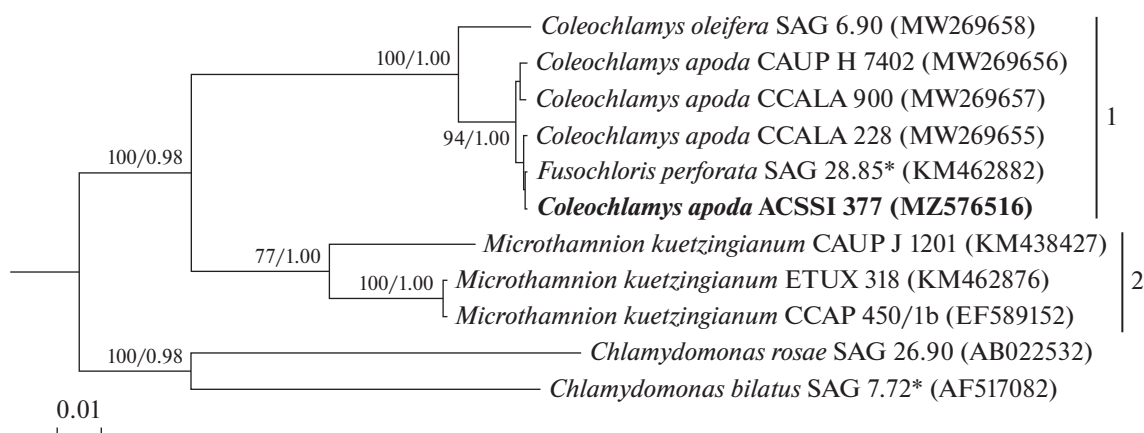


Рис. 4. Укорененное филогенетическое дерево, построенное методом Байеса и ML на основе последовательностей гена *rbcL*. В качестве статистической поддержки узлов дерева над соответствующими ветвями указаны бутстреп-значения/апостериорные вероятности. Модель нуклеотидных замен: GTR + G. Обозначения: жирным шрифтом выделен штамм ACSSI, * – аутентичный штамм.

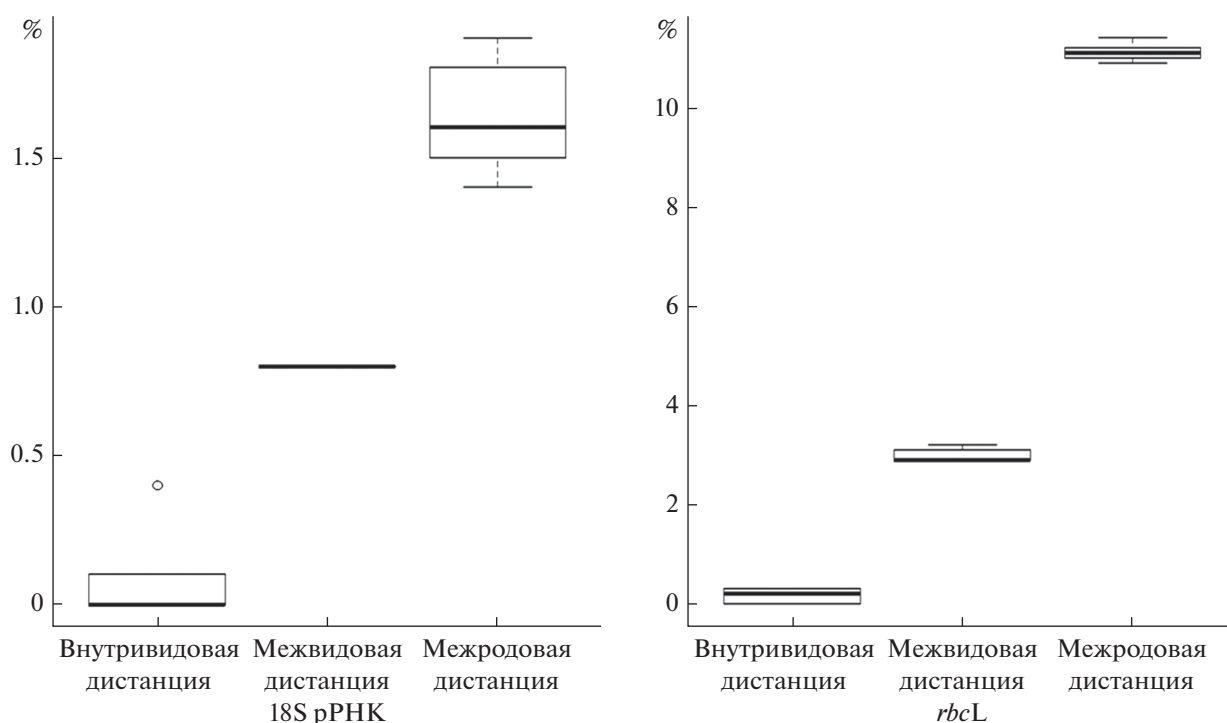


Рис. 5. Боксплоты, построенные на основе значений генетических дистанций у представителей порядка *Microthamniales* – *Coleochlamys* и *Microthamnion*.

щепень) скальной полки в окрестностях российской антарктической станции Новолазаревская (Андреева, 2012), на каменистом субстрате горных тундр Полярного Урала (Андреева, 2004; Андреева, Чаплыгина, 2007) и в почве на территории Печорской низменности (Зимонина, 1998). Во всех случаях идентификацию производили в накопительных культурах, при этом подробное описание морфологических признаков приведе-

но лишь в одном источнике (Андреева, 2012). Обнаруженная водоросль отнесена Андреевой к *Coleochlamys oleifera*, а в качестве отличий отмечалось меньшее разнообразие формы клеток и шаровидная форма спорангиев.

На территории Мурманской области находки *Coleochlamys* до недавнего времени не фиксировались. В 2020 г. в образцах почвы из гольцовых пустынь Хибин (гора Вудьяврчорр) нами была обна-

ружена водоросль с морфотипом, очень схожим со штаммом ACSSI 377 (данные не опубликованы); находка задокументирована с помощью микрофотографий. Представители сестринского рода *Microthamnion*, в частности, *M. kuetzingianum*, приводятся в списке водорослей, найденных в почве горно-тундрового пояса горы Вудьяврчорр (Штина, Ройзин, 1966). Этот вид был обнаружен нами в почве, загрязненной тяжелыми металлами, вблизи поселка Никель (данные не опубликованы), а также в дренажной воде месторождения Терраса близ г. Мончегорск (штамм поддерживается в рабочей коллекции). В целом, представители рода имеют очень широкое распространение по всему миру и обнаруживаются как в стоячей воде, так и в проточных водоемах, в почве, временных и экстремальных местообитаниях (Reder, 2019; *Microthamnion* ..., 2021).

В результате проведенных исследований можно заключить, что морфология штамма ACSSI 377, выделенного в 2020 г. из образца биологической почвенной корочки с поверхности песчаного субстрата на Севере России (Мурманская область), соответствует описанию вида *C. apoda*, за исключением присутствия в культуре клеток S-образной формы, закругленных с обоих концов, что сближает наш штамм с другим видом — *C. oleifera*. На наш взгляд, наличие S-образной формы зрелых клеток не может служить диакритическим признаком, различающим виды *Coleochlamys*.

Анализ литературных данных и собственные наблюдения свидетельствуют о том, что водоросли рода *Coleochlamys* предпочитают холодные местообитания и не имеют широкого распространения, в отличие от сестринского рода *Microthamnion*, находки которого фиксируются по всему миру, в том числе, в экстремальных средах.

Проведенный филогенетический анализ подтвердил принадлежность штамма ACSSI 377 к виду *Coleochlamys apoda*. При этом кластеризация рода *Coleochlamys* на основе ядерного гена 18S рРНК была недостаточная, разрешить межвидовые филогенетические отношения позволил анализ более изменчивого пластидного гена *rbcL*. Несмотря на обнаруженные различия во вторичной структуре верхней части шпильки варибельного региона V9 гена 18S рРНК между *M. kuetzingianum* и *C. apoda*, использовать его в качестве потенциального ДНК-баркода затруднительно, т.к. регион не секвенирован у большинства представителей группы. Внутривидовые генетические дистанции составили 0–0.1 и 0–0.3%, межвидовые — 0.8 и 2.9–3.2%, межродовые — 1.4–1.9 и 10.9–11.4% для ядерного гена 18S рРНК и пластидного гена *rbcL* соответственно. Таким образом, штамм ACSSI 377 представляет собой первую находку вида на территории России, подтвержденную молекулярно-генетическими методами. Кроме того, три не-

зависимые клады, состоящие из некультивируемых клонов и являющиеся новыми видами или родами, демонстрируют то, что порядок *Microthamniales* все еще слабо изучен, и многих его членов только предстоит обнаружить и описать.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность научному сотруднику Института биологии Коми НЦ УрО РАН Новиковской Ирине Владимировне за помощь в поиске информации о находках представителей рода *Coleochlamys* на территории России.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 20-74-00108.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В.М. Почвенные неподвижные зеленые водоросли (*Chlorophyta*) Воркутинской тундры (Республика Коми) // Новости систематики низших растений. 2004. Т. 37. С. 3–8.
- Андреева В.М. Неподвижные зеленые микроводоросли (*Chlorophyta*) из грунтов оазиса Ширмахера (окрестности станции Новолазаревская, Земля Королевы Мод, Антарктида) // Новости систематики низших растений. 2012. Т. 46. С. 4–17.
- Андреева В.М. Почвенные неподвижные зеленые микроводоросли (*Chlorophyta*) Европейского севера России // Новости систематики низших растений. 2007. Т. 41. С. 3–14.
- Андреева В.М., Чаплыгина О.Я. Почвенные неподвижные зеленые микроводоросли (*Chlorophyta*) Полярного Урала // Новости систематики низших растений. 2007. Т. 41. С. 15–18.
- Зимонина Н.М. Почвенные водоросли нефтезагрязненных земель. Киров, 1998. 171 с.
- Костиков И.Ю., Демченко Э.Н., Березовская М.А. Коллекция культур водорослей Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008 г.) // Черноморск. бот. журн. 2009. Т. 5. № 1. С. 37–79.
- Штина Э.А., Ройзин М.Б. Водоросли подзолистых почв Хибин // Бот. журнал. 1966. Т. 51. С. 509–519.
- Bakker M.E. A deviating pattern of cell division in the green alga *Microthamnion*: ultrastructure of vegetative cell divi-

- sion and zoosporogenesis // Arch. Protistenkunde. 1995. V. 146. P. 117–136.
- Barcytė D., Hodač L., Eliáš M. Settling the identity and phylogenetic position of the psychrotolerant green algal genus *Coleochlamys* (*Trebouxiophyceae*) // Phycologia. 2021. V. 60. P. 135–147.
- Bray J.P. The ecology of algal assemblages across a gradient of acid mine drainage stress on the West Coast, South Island, New Zealand // A thesis of Master of Science in Biology, 06.2007. Christchurch: University of Canterbury, 2007. 106 p.
- Czerwik-Marcinkowska J., Wojciechowska A., Massalski A. Biodiversity of limestone caves: aggregations of aerophytic algae and cyanobacteria in relation to site factors // Pol. J. Ecol. 2015. V. 63. P. 481–499.
- Darienko T., Gustavs L., Eggert A., Wolf W., Pröschold T. Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples // PLoS One. 2015. V. 10. e0127838.
- Ettl H., Gärtner G. Syllabus der Boden-, Luft und Flechtenalgen/2, ergänzte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 2014. 773 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-39462-1>
- Fernandes S. As famílias *Chlorococcaceae* e *Coccomyxaceae* no estado de São Paulo: levantamento florístico. Tese de Doutorado, 2008. São Paulo: Instituto de Botanica, 2008. 160 p.
- Foster P.L. Species associations and metal contents of algae from rivers polluted by heavy metals // Freshwater Biol. 1982. V. 12. P. 17–39.
- Gärtner G. Vorarbeiten zu einer Kryptogamenflora von Obergurgl (Ötztal, Tirol) // Ber. Nat.-Med. Verein Innsbruck. 2013. V. 98. P. 47–114.
- Hernández-Rodríguez B., Estrada-Vargas L., Novelo E. Las microalgas de *Tillandsia multicaulis* Steud. (Bromeliaceae) de la Reserva Ecológica “La Martinica”, Veracruz // TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas. 2014. V. 17. P. 117–125.
- John D.M., Johnson L.R. Observations on the developmental morphology, growth rate, and reproduction of *Microthamnion kuetzingianum* Naegeli (*Pleurastraceae*, *Pleurastrales*) in culture and a taxonomic assessment of the genus // Nova Hedwigia. 1987. V. 44. P. 25–53.
- Kaštovská K., Elster J., Stibal M., Šantrůčková H. Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (High Arctic) // Microb. Ecol. 2005. V. 50. P. 396–407.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakrýs B., Szalacha E., Szymańska H. Phylogenetic position of *Koliella* (*Chlorophyta*) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // J. Phycol. 2001. V. 37. P. 443–451.
- Kim G.H., Klochkova T.A., Han J.W., Kang S.H., Choi H.G., Chung K.W., Kim S.J. Freshwater and terrestrial algae from Ny-Ålesund and Blomstrandhalvøya island (Svalbard) // Arctic. 2011. V. 64. P. 25–31.
- Korshikov A.A. Vznachnik prsnovodnihk vodorostey Ukrainykoji RSR [Vyp] V. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). Bakuol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales) [The Freshwater Algae of the Ukrainian SSR. V. Subclass Protococcineae. Vacuolales and Protococcales]. AN. URSR, Kiev, 1953. 439 p.
- Lampkin A.J., Sommerfeld M.R. Algal distribution in a small, intermittent stream receiving acid mine-drainage // J. Phycol. 1982. V. 18. P. 196–199.
- Leya T. The CCCryo Culture Collection of Cryophilic Algae as a valuable bioresource for algal biodiversity and for novel, industrially marketable metabolites // Appl. Phycol. 2020. P. 1–22.
<https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1753572>
- McManus H.A., Lewis L.A. Molecular phylogenetic relationships in the freshwater family *Hydrodictyaceae* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyceae*), with an emphasis on *Pediastrum duplex* // J. Phycol. 2011. V. 47. P. 152–163.
- Microthamnion* Nägeli, 1849 in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset accessed via GBIF.org on 2021-09-02.
<https://doi.org/10.15468/39omei>
- Mudimu O., Rybalka N., Bauersachs T., Born J., Friedl T., Schulz R. Biotechnological screening of microalgal and cyanobacterial strains for biogas production and antibacterial and antifungal effects // Metabolites. 2014. V. 4. P. 373–393.
- Płachno B.J., Wołowski K., Augustynowicz J., Łukaszek M. Diversity of algae in a thallium and other heavy metals-polluted environment // Ann. Limnol. – Int. J. Lim. 2015. V. 51. P. 139–146.
- Printz H. Die Chaetophorales der Binnengewässer // Hydrobiologia. 1964. V. 24. P. 1–376.
- Pröschold T., Darienko T. The green puzzle *Stichococcus* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*): New generic and species concept among this widely distributed genus // Phytotaxa. 2020. V. 441. P. 113–142.
- Pröschold T., Darienko T. *Choricystis* and *Lewinosphaera* gen. nov. (*Trebouxiophyceae* *Chlorophyta*), two different green algal endosymbionts in freshwater sponges // Symbiosis. 2020 V. 82. P. 175–188.
<https://doi.org/10.1007/s13199-020-00711-x>
- Raabová L., Elster J., Kováčik L. Phototrophic microflora colonizing substrates of man-made origin in Billefjorden Region, Central Svalbard // Czech. Polar Rep. 2016. V. 6. P. 21–30.
- Reder T. A case study of species delimitation with molecular methods: the algal genus *Microthamnion* (*Microthamniales*, *Trebouxiophyceae*). Dissertation des Doktorgrades, 30.10.2019. Köln: Universität zu Köln, 2019. 123 p.
- Schmidt S.K., Darcy J.L. Phylogeny of ulotrichalean algae from extreme high-altitude and high-latitude ecosystems // Polar Biol. 2015. V. 38. P. 689–697.
- Stibal M., Šabacká M., Kaštovská K. Microbial communities on glacier surfaces in Svalbard: impact of physical and chemical properties on abundance and structure of cyanobacteria and algae // Microb. Ecol. 2006. V. 52. P. 644–654.
- Vara Prasad M.N., de Oliveira Freitas H.M. Metal hyperaccumulation in plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology // Electron. J. Biotechnol. 2003. V. 6. P. 285–321.
<https://doi.org/10.4067/S0717-34582003000300012>
- Varshney P., Mikulic P., Vonshak A., Beardall J., Wangikar P.P. Extremophilic micro-algae and their potential contribution

in biotechnology // Bioresour. Technol. 2015. V. 184. P. 363–372.

Watson M.W. Flagellar apparatus, eyespot and behaviour of *Microthamnion kuetszingianum* (*Chlorophyceae*) zoospores // J. Phycol. 1975. V. 11. P. 439–448.

Watson M.W., Arnott H.J. Ultrastructural morphology of *Microthamnion zoospores* // J. Phycol. 1973. V. 9. P. 15–29.

Van de Peer Y., Jansen J., De Rijk P., De Wachter R. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 111–116. <https://doi.org/10.1093/nar/25.1.111>

Morphology and Phylogeny of the Microalga *Coleochlamys apoda* (*Microthamniales*, *Chlorophyta*)

V. V. Redkina^{1, *}, A. D. Temraleeva¹, E. A. Portnaya¹, and R. R. Shalygina²

¹*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences – Subdivision of PSCBR RAS, Pushchino, Russia*

²*Institute of North Industrial Ecology Problems – Subdivision of KSC RAS, Aaptity, 184209 Russia*

*e-mail: kalmykova_v_v@mail.ru

Received September 14, 2021; revised September 24, 2021; accepted September 24, 2021

Abstract—The results of morphological and phylogenetic analysis of *Coleochlamys apoda* strain ACSSI 377, isolated from the biological soil crust on the surface of a sandy substrate in Northern Russia (Murmansk region) are presented. Morphology is described, including the presence of mature S-shaped cells typical of the species *C. oleifera*, and formation of synzoospores was reported for the first time for the species. Analysis of the 18S rRNA and *rbcL* gene sequences indicated that the strain belonged to the species *Coleochlamys apoda* (order *Microthamniales*); this is the first finding of this species found in the Russian territory confirmed by molecular genetic techniques. The presence of clades consisting of uncultured clones on the 18S rRNA gene tree was an indication of the order being insufficiently studied and of the prospects of detection and description of its new members. Ecology and distribution of *Coleochlamys* and of the sister genus *Microthamnion* were analyzed based on the literature data and the authors' observations. Members of the genus *Coleochlamys* prefer cold habitats and occur within a limited geographic range, in contrast to *Microthamnion*, which has been repeatedly found in various regions.

Keywords: green microalgae, biological soil crusts, 18S rRNA, *rbcL*, first finding, Kola Arctic, Murmansk region

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКОБИОТЫ ПОЧВ ЗЕМЛИ ФРАНЦА-ИОСИФА МЕТОДАМИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПОСЕВА И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2022 г. Д. А. Никитин^а, *, М. В. Семенов^а

^аПочвенный институт имени В.В. Докучаева, Москва, 119017 Россия

*e-mail: dimnik90@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2021 г.

После доработки 06.09.2021 г.

Принята к публикации 22.09.2021 г.

При помощи методов микробиологического посева и ПЦР в реальном времени охарактеризована микобиота псаммоземов, пелоземов, криоземов, литоземов и серогумусовых почв архипелага Земля Франца-Иосифа (ЗФИ). Суммарная численность микроскопических грибов составляла от 3.10×10^1 КОЕ/г почвы в глубоких минеральных горизонтах до 6.56×10^3 КОЕ/г почвы в поверхностных органогенных слоях. Выделено 47 видов микромицетов, относящихся к 32 родам из 3 отделов. Преобладали психротолерантные штаммы, растущие как при 5°C, так и при 25°C. Наибольшим видовым разнообразием характеризовались роды *Penicillium* (5 видов), *Cadophora* (4 вида), *Cladosporium*, *Phoma* и *Thelebolus* (по 3 вида). Наиболее многочисленными являлись характерные для холодных экосистем и сапротрофные роды *Penicillium*, *Hyphozyma*, *Phoma*, *Antarctomyces* и *Pseudogymnoascus*. В посевах чаще всего (более 40% встречаемости) были отмечены *Pseudogymnoascus pannorum*, *Hyphozyma variabilis* var. *variabilis*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Thelebolus microsporus* и *Goffeauzyma gilvescens*. Значительная часть (30%) выявленных видов входит в базу данных BSL патогенных для человека и животных видов. Численность копий ITS рРНК грибов варьировала от 1.0×10^9 до 4.40×10^{10} копий генов/г почвы в минеральных и органогенных слоях соответственно. Пространственная неоднородность микобиоты в почвах архипелага ЗФИ выявлена в пределах верхнего 5-сантиметрового слоя, тогда как более глубокие горизонты характеризовались схожей структурой сообществ микромицетов.

Ключевые слова: Арктика, экстремальные экосистемы, почвы, микроскопические грибы, количественная ПЦР, численность КОЕ

DOI: 10.31857/S0026365622010098

Земля Франца-Иосифа (ЗФИ) — самый северный архипелаг восточного полушария (с юга на север простирается от 79° с.ш. до 82° с.ш.), в состав которого входит 192 острова (Мосеев и соавт., 2019). Большая часть островов покрыта покровными ледниками мощностью от 100 до 500 м, определяющими физико-географические условия местных ландшафтов (Горячкин и соавт., 2017). Климат ЗФИ морской арктический с продолжительной холодной (до -24.4°C) зимой, сильными ветрами (до 40–50 м/с) и существенными осадками (до 200–300 мм/год) (Дженюк, 2014). Почвенный покров ЗФИ представлен сложным чередованием псаммоземов, литоземов, криоземов, серогумусовых мерзлотных почв, а также криотурбированных пелоземов (Горячкин и соавт., 2017; Никитин и

соавт., 2020). Одни геоботаники относят ЗФИ к зоне полярных пустынь (Александрова, 1981, 1983; Матвеева и соавт., 2015), а другие — к полярной подзоне тундры (Сафронова, Юрковская, 2015). Растительный покров архипелага сильно разрежен (Матвеева и соавт., 2015), что предопределяет главенствующую биогеоценологическую роль микроорганизмов в местных экосистемах (Никитин и соавт., 2021a).

Почвенные микроорганизмы выполняют важные экологические функции (осуществление многих этапов циклов макроэлементов, трансформации органического вещества, выветривания горных пород и др.), поэтому их комплексное изучение является приоритетным направлением в понимании природы полярных регионов (Floss et al., 2019). Большая часть микроорганизмов в тундровых почвах (до 90% от общей микробной биомассы) представлена грибами (He et al., 2020), которые играют важную роль для всех наземных

Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622010098 для авторизованных пользователей.

экосистем – разлагают и трансформируют органическое вещество, преобразуют геологические породы, участвуют почвообразовании и питании растений (Добровольская и соавт., 2015). Изучение грибов высокоарктических территорий России ведется более 60 лет (Матвеева и соавт., 2015), но внимание микологов до сих пор преимущественно сконцентрировано на лишайниках (Журбенко, 2011) и макромицетах (Матвеева и соавт., 2015; Ежов и соавт., 2016). По микроскопическим грибам ЗФИ опубликовано лишь четыре работы (Bergero et al., 1999; Кирцидели, 2015, 2016; Никитин и соавт., 2019), и только одна выполнена с применением молекулярно-биологических методов (Никитин и соавт., 2017б). Первые данные о таксономическом разнообразии и экологии микромицетов ЗФИ были получены недавно по отдельным точкам островов Галля, Нортбрук, Кейна (Bergero et al., 1999) и Хейса (Кирцидели, 2015, 2016). В настоящее время признано, что видовое богатство микобиоты ЗФИ изучено фрагментарно (Матвеева и соавт., 2015).

Целью работы являлась оценка численности рибосомальных генов ITS рРНК грибов, а также количества КОЕ и таксономического разнообразия культивируемых микромицетов в псаммоземах, пелоземах, криоземах, литоземах и серогумусовых почвах архипелага Земля Франца-Иосифа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Условия местных ландшафтов. Средняя температура воздуха в июле на исследуемой территории не превышает 0.7°C. Особенностью архипелага являются частые туманы и высокая относительная влажность воздуха в течение всего года 88–100% (Дженюк, 2014).

Рельеф ЗФИ низкогорен (от 600 до 670 м) и слабо расчленен эрозионно-денудационными равнинами (Мосеев и соавт., 2019). Большинство островов представляют собой останцы почти горизонтального базальтового плато (от 50 до 300 м), расчлененного тектоническими разломами, почти полностью погребенными под ледниковым покровом. Горные породы ЗФИ сложены алевропелитовыми отложениями, песчаниками и известняками, перекрытыми базальтами (Кирцидели, 2015).

На архипелаге произрастает более 50 видов сосудистых растений, в том числе полярный мак, камнеломки, крупки и другие (Мосеев, Сергеенко, 2017). Однако ведущее значение в формировании растительного покрова ЗФИ имеют мхи и лишайники, представленные 124 и 229 видами соответственно (Мосеев и соавт., 2019).

Почвенный покров ЗФИ представлен: псаммоземами глееватыми в пустошах о. Алджер; псаммоземами криотурбированными мерзлот-

ными и серогумусовыми грубогумусированными мерзлотными почвами в тундрах о. Ферсмана; псаммоземами глееватыми, псаммоземами мерзлотными брioniфицированными и криоземами глееватыми в тундрах и пустошах о. Хейса; литоземами грубогумусированными и серогумусовыми почвами в тундрах о. Гукера; литоземами грубогумусовыми мерзлотными, серогумусовыми мерзлотными и серогумусовыми перегнойно-грубогумусированными почвами, пелоземами перегнойными криотурбированными в тундрах о. Земля Александры (Горячкин и соавт., 2017; Никитин и соавт., 2020).

Исследованные почвы расположены на островах ЗФИ – Земля Александры, Ферсмана, Хейса, Алджер и Гукера, ключевые точки которых представлены на рис. 1. На о. Алджер изучен профиль ZFI-A-01 псаммозема глееватого/Turbic Cryosol (Arenic), расположенного в точке с координатами 80°21'34.5" с.ш., 56°13'20.2" в.д. На о. Ферсмана проанализирован профиль ZFI-F-02 серогумусовой грубогумусированной мерзлотной почвы/Haplic Cryosol (Humic), расположенный в точке с координатами 80°37'43.4" с.ш., 57°58'42.4" в.д. Кроме того, на данном острове исследован профиль ZFI-F-03 псаммозема криотурбированного мерзлотного/Turbic Cryosol (Humic) в 80°37'46.9" с.ш., 57°58'40.4" в.д. Изучен профиль ZFI-H-05 криозема глееватого Oxyaquic Cryosol (Arenic) мыса Зенит о. Хейса, расположенного в точке с координатами 80°36'47.4" с.ш., 57°29'38.4" в.д. На о. Гукера в районе бухты Тихой, в точке 80°20'18.1" с.ш., 52°47'07.9" в.д. проанализирован профиль литозема грубогумусированного/Eutric Leptosol (Loamic, Humic) ZFI-НК-08. Кроме того, на мысе Мелехова о. Земля Александры, в точке с координатами 80°42'59.9" с.ш., 47°53'33.8" в.д. исследован профиль ZFI-AX-10 литозема грубогумусированного мерзлотного/Skeletal Oxyaquic Cryosol (Loamic, Humic).

Условия отбора и хранения образцов, а также детальное описание почвенных разрезов приведены ранее (Никитин и соавт., 2021а). Координаты ключевых точек, классификационный статус почв и некоторые физико-химические свойства исследованных образцов представлены в таблице. Влажность образцов составляла около 45% и учитывалась при расчете количества копий генов ITS рРНК, а также КОЕ микромицетов на 1 г сухой почвы.

Количественную оценку содержания рибосомальных генов грибов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени по стандартной методике для почвенных образцов (Никитин и соавт., 2020). Для учета грибов использовали праймеры на регион ITS. Реакцию проводили в амплификаторе Real-Time CFX96 Touch ("EvaGreen Supermix"). Реакционную



Рис. 1. Ключевые точки исследования на островах архипелага Земля Франца-Иосифа.

смесь готовили из препарата EvaGreen Supermix (“Bio-Rad”). В качестве количественных стандартов концентрации генов ITS рДНК для грибов использовали растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Meyen 1B-D1606. Для каждого образца реакцию проводили в 3-х повторностях. Концентрацию генов рассчитывали с помощью программного обеспечения CFX Manager, пересчитывая количество генов в ДНК на 1 г почвы с учетом разведений и массы навески. Формула пересчета концентрации генов такова:

$$N = (n \times V) / (v \times m) \times W\% / (100\% - W\%),$$

где N – количество копий региона ITS2 грибов в 1 г сухой почвы; n – количество копий региона ITS2 грибов в 1 мкл ДНК; V – суммарный объем раствора ДНК (100 мкл); v – используемый объем раствора ДНК для РТ-ПЦР (1 мкл); m – масса навески почвы (0.5 г); W – влажность почвы.

Численность КОЕ и таксономический состав культивируемых микроскопических грибов определяли методом микробиологического посева (Звягинцев, 1991). Для этого почвенную суспензию перед посевом обрабатывали с помощью встряхивателя Vortex (Латвия) в течение 5 мин при 3500 об./мин. Аликвоту 100 мкл суспензии почвы с разведением 1 : 100 помещали на дно стерильных чашек Петри, в которые заливали расплавленную и охлажденную до 50°C среду Чапека (Domsch et al., 2007) с добавлением стрептомицина (100 мг/л) для предотвращения роста бактерий. Данную методику применяли, поскольку небольшой прогрев и равномерный контакт поверхности грибных спор и мицелия с питательной средой оказывают благоприятное воздействие на рост микроскопиче-

ских грибов, рост которых не лимитируется низким содержанием кислорода (Литвинов, 1969). Инкубацию посевов проводили в термостатах при температуре 25°C в течение 2–3 нед., а также при 5°C в течение 3–4 нед., чтобы дополнительно выделить психротолерантные виды микромицетов и дрожжей (Hassan et al., 2016). Посев осуществляли в пятикратной повторности для каждого образца при каждой температуре инкубации. По прошествии выше указанного времени производили учет общего числа колоний мицелиальных грибов и дрожжей, а также их первичную идентификацию по макро- и микрокультуральным признакам (Domsch et al., 2007; Seifert, Gams, 2011) с помощью микроскопа Биомед-5 (“Биомед”, Россия).

Для изолятов неясного таксономического положения и стерильных мицелиев идентификацию проводили по молекулярно-биологическим признакам с анализом участков ITS1–ITS2 рДНК. Выделение ДНК из чистых культур проводили по методике Глушаковой и соавт. (2011): биомассу 5–6-суточной культуры переносили в 2 мл эппендорфы, добавляли 400 мкл стеклянных шариков (диаметром 300–500 мкм) и 500 мкл лизирующего буфера (TrisBase 50 mM, NaCl 250 mM, ЭДТА 50 mM, SDS 0.3%; pH 8). Приготовленную смесь взбалтывали на вортексе на скорости 3500 об./мин в течение 15 мин, затем инкубировали 1 ч при температуре 65°C, после снова встряхивали на вортексе 15 мин и центрифугировали (13.4 об./мин) 10 мин, отбирали надосадочную жидкость. Для амплификации региона рДНК, содержащего D1/D2 домен региона 26S рДНК, использовали праймеры ITS1f (5'-CTTGGTTCATTTAGAG-GAAGTA) и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-

GG) и смеси для ПЦР ScreenMix (ЗАО “Евроген”, Москва). Амплификатор использовали по следующей программе: (начальная денатурация – 2 мин при температуре 96°C; затем 35 циклов: денатурация – 20 с при температуре 96°C, отжиг праймеров – 50 с при температуре 52°C, синтез ДНК – 1.5 мин при температуре 72°C; конечная достройка 7 мин при температуре 72°C). Очистку ПЦР-продукта проводили с использованием набора BigDye Terminator Purification Kit (“Applied Biosystems”, США). Для секвенирования использовали праймер NL4. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer в Научно-производственной компании “Синтол” (Москва). Идентификацию по полученным хроматограммам проводили, используя данные генбанка NCBI и SABI Bioscience Database Index Fungorum.

Общее α -разнообразие грибных сообществ оценивали по индексу Шеннона; β -разнообразие сообществ микромицетов оценивали с использованием многомерного неметрического шкалирования (nMDS) по метрике Брэя–Кертиса (Семенов и соавт., 2019а, 2019б). Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2019 и Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количественная оценка содержания рибосомальных генов микобиоты. Численность копий генов ITS рРНК грибов в образцах почв ЗФИ варьировала от 1.00×10^9 до 4.40×10^{10} копий генов/г почвы. Наименьшие значения выявлены в минеральных горизонтах ВС литозема грубогумусового мерзлотного о. Земля Александры (профиль ZFI-Ax-10) и ВС₂ литозема грубогумусового о. Гукера (профиль ZFI-НК-08) (рис. 2). Несколько больше грибов (от 1.11×10^9 до 1.12×10^9 копий генов/г почвы) обнаружено в глубинном 2CR и надмерзлотном горизонте С_г криозема глееватого о. Хейса (профиль ZFI-Н-05) и в породе С серогумусовой грубогумусованной мерзлотной почве о. Ферсмана (профиль ZFI-F-02). Наибольшая численность копий генов ITS грибов определена для поверхностного горизонта W псаммозема глееватого о. Алджер (профиль ZFI-A-01). Также высокие значения (4.21 – 4.40×10^{10} копий генов/г почвы) отмечены в моховом очесе О литозема грубогумусового мерзлотного о. Земля Александры (профиль ZFI-Ax-10), в поверхностном горизонте О_{ао} криозема глееватого о. Хейса (профиль ZFI-Н-05) и в органогенном поверхностном горизонте WO псаммозема глееватого мерзлотного о. Хейса (профиль ZFI-Н-04). В целом содержание копий ри-

босомальных генов грибов всех исследованных профилей резко сокращается от поверхностных к надмерзлотным горизонтам вниз по профилю. Наибольшая разница (почти 2 математических порядка) между численностью копий рибосомальных генов грибов в поверхностных и глубинных горизонтах характерна для литозема грубогумусового о. Гукера (профиль ZFI-НК-08) и литозема грубогумусового мерзлотного о. Земля Александры (профиль ZFI-Ax-10). Суммарная доля грибов в органогенных горизонтах от их общего количества по всему профилю варьирует от 65% для литозема грубогумусового мерзлотного о. Земля Александры (профиль ZFI-Ax-10) до 84–95% в серогумусовой грубогумусованной мерзлотной почве о. Ферсмана (профиль ZFI-F-02). В то же время, для псаммозема глееватого мерзлотного о. Хейса (профиль ZFI-Н-04) выявлен второй максимум значений содержания рибосомальных генов грибов в надмерзлотном горизонте С_г. Говоря обо всей толще почвенного профиля, наименьшее количество грибных генов (5.10×10^{10} копий генов/г почвы) было обнаружено в серогумусовой грубогумусованной мерзлотной почве о. Ферсмана (профиль ZFI-F-02), а больше всего (1.18×10^{11} копий генов/г почвы) – в псаммоземе глееватом мерзлотном о. Хейса (профиль ZFI-Н-04).

Численность КОЕ и таксономический состав сообществ культивируемых микромицетов. Численность колоний микромицетов в почвах ЗФИ варьировала от 3.10×10^1 до 6.56×10^3 КОЕ/г почвы (рис. 3). Наименьшие значения (порядка 30–70 КОЕ/г почвы) выявлены в надмерзлотном горизонте С_г псаммозема глееватого мерзлотного о. Хейса (профиль ZFI-Н-04). Максимум микромицетов (от 2.21×10^3 до 6.56×10^3 КОЕ/г почвы) обнаружен в поверхностном горизонте W псаммозема глееватого о. Алджер (профиль ZFI-A-01), в моховом очесе О и подповерхностном АУ литозема грубогумусового о. Гукера (профиль ZFI-НК-08). Для 14% образцов количество микромицетов не превышало 10^1 КОЕ/г почвы; для 41% образцов – 10^2 КОЕ/г почвы; для 45% – 10^3 КОЕ/г почвы. В целом численность культивируемых микромицетов уменьшается вниз по почвенному профилю.

Выделено 47 видов микромицетов, относящихся к 32 родам из 3 отделов (табл. 1S), а также 2 типа (гиалиновый и меланизированный) стерильного мицелия. Отдел *Mucoromycota* представлен родами *Mortierella*, *Mucor* и *Umbelopsis*. Отдел *Ascomycota* – 3 телеоморфными (*Antarctomyces*, *Pseudogymnoascus*, *Thelebolus*) и 18 анаморфными родами. Отдел *Basidiomycota* представлен исключительно дрожжами родов *Cryptococcus*, *Glaciozyma*, *Goffeauzyma*, *Leucosporidium*, *Mrakia*, *Phenoliferia* и *Rhodotorula*. Наибольшее число родов (по 3) принадлежит к порядкам *Eurotiales*, *Hypocreales* и *Mucorales*.

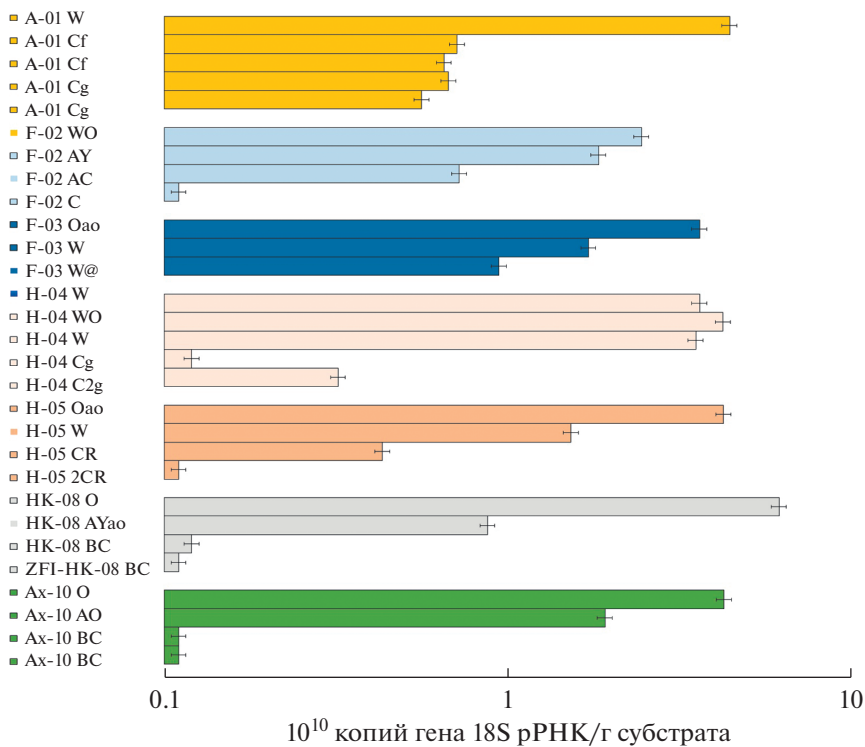


Рис. 2. Количество копий генов ITS рРНК грибов.

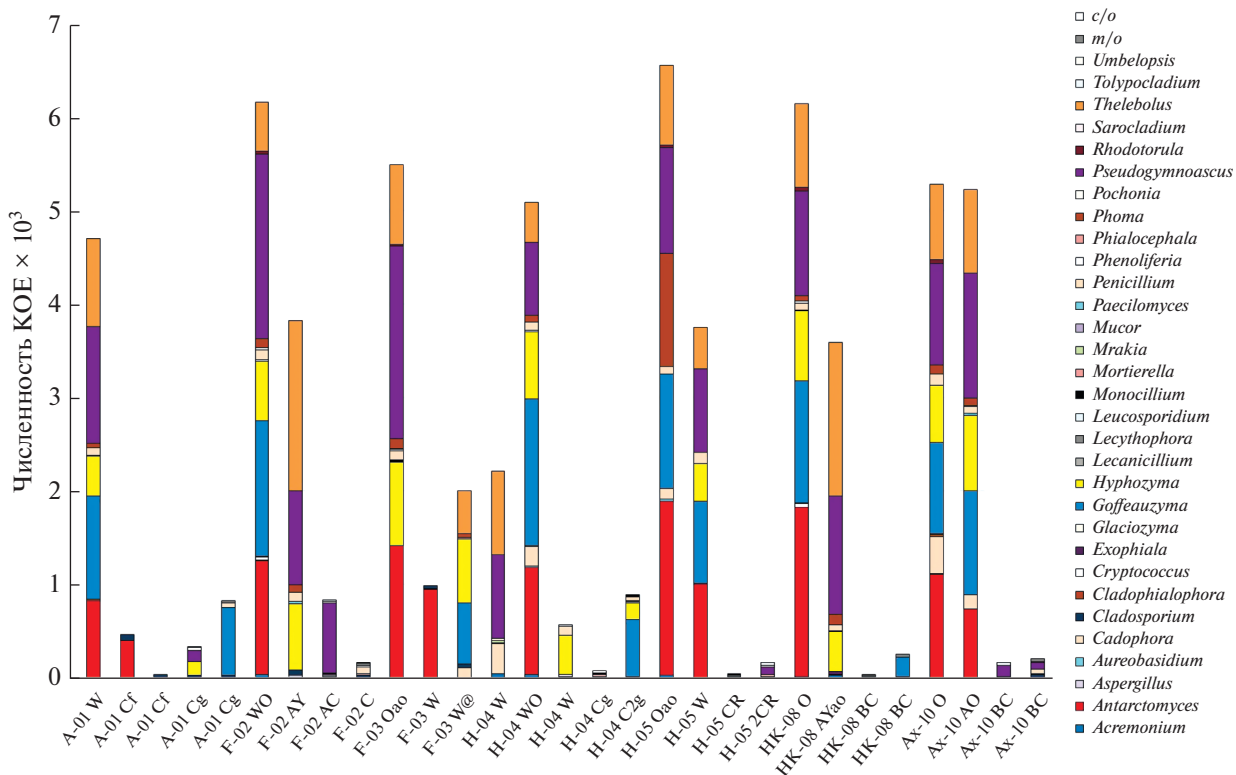


Рис. 3. Численность КОЕ и таксономическое разнообразие микроскопических грибов.

Таблица 1. Свойства исследованных почв Земли Франца-Иосифа (Никитин и соавт., 2021a)

Горизонт	Глубина, см	C, %	N, %	Плотность, г/см ³
о. Алджер. Псаммозем глееватый/TurbicCryosol (Arenic)				
W, трещина	0–1	1.54	0.08	0.8
WCf, полигон	0–2	0.19	0.02	0.8
Cf, полигон	2–13	0.08	0.01	1.3
Cf, трещина	20–22	1.03	0.03	1.3
Cg, трещина	13–45	0.08	0.01	1.4
Cg, трещина	13–45	0.06	0.01	1.4
о. Ферсмана. Серогумусовая грубогумусированная мерзлотная/HaplicCryosol (Humic)				
Корка лишайника	0.3–0	6.29	0.41	1.0
AУ	0–5	1.04	0.07	0.7
AC	5–17	0.87	0.06	1.0
C	17–40	1.11	0.07	1.2
о. Ферсмана. Псаммозем криотурбированный мерзлотный/TurbicCryosol (Humic)				
Oao	0–2	27.9	1.13	0.6
Корка	0–5	3.18	0.28	1.0
W	2–5	1.29	0.13	1.0
W@	2–5 (10)	1.55	0.15	0.9
[AO1]@	10–30 (35)	3.76	0.35	0.9
BC@, h	5–35 (45)	0.79	0.08	0.9
[AO2]@	35–48	5.87	0.55	1.0
D	46–48	0.80	0.05	1.2
о. Хейса, мыс Зенит. Псаммозем глеевый мерзлотный/ReductaquicCryosol (Arenic)				
W	0–5	0.49	0.10	0.9
Корка лишайника	0–3	3.22	0.21	1.0
W	1–2	1.34	0.13	1.0
Cg	20–25	0.06	0.01	1.2
C2g	40–50	0.09	0.01	1.2
о. Хейса, мыс Зенит. Криозем глееватый OxyaquicCryosol (Arenic)				
Oao	3–0	3.07	0.21	0.6
W	0–5	0.44	0.05	0.9
Bg	5–15	0.13	0.04	1.2
CR	15–20	0.08	0.01	1.2
2CR	20–50	0.09	0.01	1.1
о. Гукера, бухта Тихая. Литозем грубогумусированный/EutricLeptosol (Loamic, Humic)				
O	0–5	30.66	1.69	0.6
AУao	5–6 (10)	3.69	0.36	0.9
BC	6 (10)–15	1.46	0.17	1.2
BC2	15–30	1.27	0.12	1.3
о. Земля Александры. Литозем грубогумусовый мерзлотный/SkeletalOxyaquicCryosol (Loamic)				
O	0–2	–	–	–
AO	2–8	1.11	0.09	0.8
BC	8–15	0.63	0.06	1.2
BC	15–25	0.45	0.04	1.3

Таксономическое разнообразие микромицетов изученных почв различалось. Псаммозем глееватый о. Алджер (профиль ZFI-A-01) характеризовался минимальным числом видов — 16, в то время как в псаммоземе криотурбированном мерзлотном о. Ферсмана (профиль ZFI-F-03) обнаружено 20 видов; в криоземе глееватом о. Хейса (профиль ZFI-H-05) — 24 вида; в литоземе грубогумусированном о. Гукера (профиль ZFI-НК-08) — 26 видов; в литоземе грубогумусовом мерзлотном о. Земля Александры (профиль ZFI-Ax-10) — 28 видов; в серо-гумусовой грубогумусированной мерзлотной почве о. Ферсмана (профиль ZFI-F-02) — 31 вид; а в криоземе глееватом о. Хейса (профиль ZFI-H-05) — 32 вида.

Одни штаммы микромицетов (например, *Antarctomyces psychrotrophicus* и *Goffeauzyma gilvescens*) выявлены в посевах только при 5°C, что позволяет отнести их к психрофилам; другие (например, *Aspergillus versicolor* и *Mucor hiemalis*) — лишь при 25°C, то есть относились к мезофильной по отношению к температуре экологической группе; а большинство учтенных штаммов росло при обеих температурах инкубирования, являясь психротолерантами (табл. 1S).

Учтенные микромицеты также относились к различным эколого-трофическим группам (табл. 1S). Преобладали сапротрофы и характерные для холодных экосистем таксоны. Среди выделенных микромицетов практически не было видов, экологически связанных с растениями — эпифитов, эндофитов или эккрисотрофов. Относительно мало целлюлолитиков, фитопатогенов и видов, условно патогенных для человека и животных.

Наибольшим разнообразием характеризовался род *Penicillium* — 5 видов (табл. 1S). Род *Cado-phora* содержал представителей 4 видов — *C. finlandica*, *C. luteo-olivacea*, *C. malorum*, *C. novi-eboraci*. По 3 вида у родов *Cladosporium*, *Phoma* и *Thelebolus*. Представителей 2 видов имели роды *Aspergillus*, *Leucosporidium* и *Mortierella*. Наиболее многочисленными были характерные для холодных экосистем и сапротрофные роды: *Penicillium* (до 1.20×10^2 КОЕ/г почвы и до 2%), *Hu-phozyma* (до 9.00×10^2 КОЕ/г почвы и до 16%), *Phoma* (до 1.20×10^3 КОЕ/г почвы и до 18%), *Antarctomyces* (до 1.87×10^3 КОЕ/г почвы и до 29%) и *Pseudogymnoascus* (до 2.06×10^3 КОЕ/г почвы и до 38%) (рис. 2, табл. 1S). Доминанты отмечены исключительно для поверхностных органогенных горизонтов, в то время как в глубинных минеральных слоях все таксоны характеризовались равномерным распределением в составе сообществ. Некоторые обнаруженные таксоны можно считать индикаторными, поскольку они выявлены только в определенных субстратах или островах (табл. 1S, 2S).

Характеристика α -разнообразия микромицетов. Для сообществ почвенных микромицетов

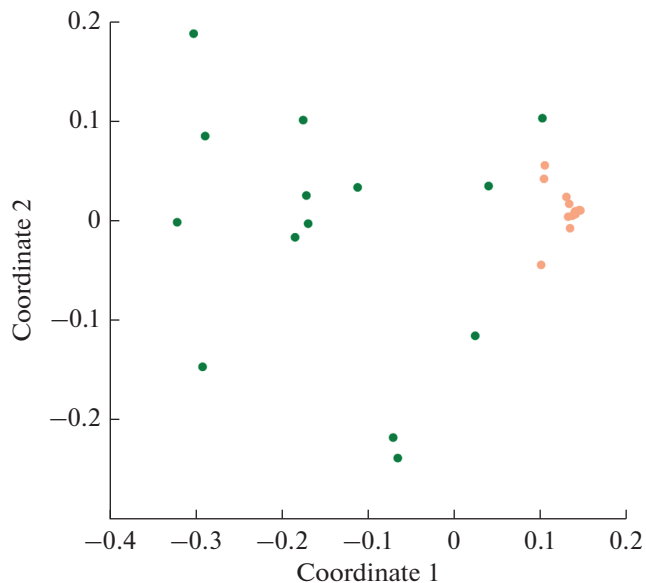


Рис. 4. Бета-разнообразие сообществ микромицетов почв ЗФИ с использованием неметрического многомерного шкалирования (NMS) и метрики Брэя–Кертиса. Зеленым цветом отмечены сообщества микроскопических грибов в пределах верхнего 5-сантиметрового слоя, оранжевым — в более глубоких слоях (до 48–50 см).

изучаемых вариантов рассчитан индекс Шеннона (рис. 1S), по которому можно оценить α -разнообразие. Значения индекса Шеннона варьировали от 1.01 до 2.67. Минимальное α -разнообразие отмечено в надмерзлотном горизонте C_T псаммозема глееватом о. Алджер (профиль ZFI-A-01). Максимальные значения индекса Шеннона для микромицетов выявлены в моховом очесе О литозема грубогумусового мерзлотного о. Земля Александры (профиль ZFI-Ax-10). Высокое α -разнообразие (до 2 по индексу Шеннона) также обнаруживалось в поверхностном горизонте всех исследованных профилей, кроме псаммозема глеевого мерзлотного о. Хейса (профиль ZFI-H-04), где наибольшее разнообразие (2.44 по индексу Шеннона) выявлено в подповерхностном слое.

Характеристика β -разнообразия микромицетов. Оценка β -разнообразия показала, что сообщества микромицетов четко кластеризуются по фактору глубины обитания в профиле (рис. 4). Структура сообществ микромицетов рассматриваемых почв существенно различалась в пределах верхнего 5-сантиметрового слоя, тогда как более глубокие горизонты вплоть до 50 см характеризовались схожей структурой сообществ микромицетов (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Количественная оценка содержания рибосомальных генов микобиоты. Схожие по порядку

значения численности копий генов ITS рРНК грибов с полученными в настоящей работе, отмечены как для других почв ЗФИ (Никитин и соавт., 2017б), так и для северной части Кольского полуострова (Корнейкова, Никитин, 2021). В то же время количество рибосомальных генов микобиоты исследованных почв ЗФИ на два порядка выше по сравнению с отмеченным для почв более южного архипелага Новая Земля (НЗ) (Никитин и соавт., 2021а). Это может быть связано с иссушающим/охлаждающим действием самого большого покровного ледника в России на НЗ (Никитин и соавт., 2019, 2020). Широко известно лимитирующее влияние ледников на развитие почвенной биоты (Castle et al., 2016; Никитин и соавт., 2021а).

Закономерным кажется максимальное количество копий рибосомальных генов в поверхностных горизонтах и их резкое убывание вниз по почвенным профилям, поскольку с возрастанием глубины уменьшается содержание С и N (табл. 1). Схожую закономерность отмечали по распределению численности рибосомальных геном ITS рРНК грибов для почв Шпицбергена (Blaud et al., 2015).

Феномен второго максимума численности копий рибосомальных генов в подповерхностных слоях можно объяснить формированием горизонта ретинизации над мерзлотой, где могут скапливаться органика и клетки микроорганизмов (Лысак и соавт., 2018). Также есть сведения о подобном эффекте в Антарктиде, где почвенная биота развивается преимущественно в подповерхностных горизонтах, более защищенных от негативных абиотических факторов (резкие перепады температура, повышенный уровень ультрафиолетового излучения, сильные ветры и др.) (Марфенина и соавт., 2016; Никитин и соавт., 2018; Лысак и соавт., 2018).

Наибольшие значения численности копий генов грибов выявлены в биогенных корках W псаммозема глееватого о. Алджер, что может быть связано преобладанием в них лишайников, микобиоты которых содержат ITS участки ДНК грибов (Агур, 2002). Вероятно, из почвы была экстрагирована ДНК не только свободноживущих грибов, но и лишайников (лихенезированных грибов), что привело к завышенным значениям численности копий рибосомальных генов микобиоты.

Микроскопические грибы изученных почв островов Алджер, Ферсмана, Хейса и Земля Александры имели такую же по порядку значений численность КОЕ, как и почвы о. Нортбрук, находящегося в пределах ЗФИ (Никитин и соавт., 2019), а также почвы Шпицбергена (Кирцидели и соавт., 2020). Количество КОЕ выявленных микромицетов также соответствует данным по почвам и грунтам о. Хейса, исследованным микологами ранее (Кирцидели, 2015, 2016). Однако полученные

в данной статье значения численности КОЕ микроскопических грибов на порядок ниже по сравнению с обнаруженными для почв севера НЗ (Никитин и соавт., 2021б), почво-грунтов о. Визе (Кирцидели и соавт., 2018) и почво-грунтов Восточной Антарктиды (Марфенина и соавт., 2016; Никитин и соавт., 2017а; Лысак и соавт., 2018; Kochkina et al., 2019; Abirami et al., 2021), что можно объяснить географическим положением и климатом указанных территорий.

Таксономическое разнообразие микромицетов почв островов Алджер, Ферсмана, Хейса и Земля Александры во многом сходно с отмеченным как для других почв ЗФИ (Кирцидели, 2015; Никитин и соавт., 2019), так и для прочих территорий Арктики и Антарктики (Марфенина и соавт., 2016; Никитин и соавт., 2017а, 2017б; Лысак и соавт., 2018; Kochkina et al., 2019; Tsuji, Hoshino, 2019; Кирцидели и соавт., 2020; Никитин и соавт., 2021б; Abirami et al., 2021).

Ряд выделенных штаммов родов *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Cladophialophora humicola*, *Glaciozyma*, *Goffeauzyma*, *Hyphozyma*, *Mrakia frigida*, *Phenoliferia* и *Tolypocladium* не росли при температуре 25°C и, следовательно, являются психрофилами, в то время как большинство изолятов были способны расти и при 5°C, и при 25°C (табл. 1S). Данное наблюдение подтверждает гипотезу о том, что большая часть полярных штаммов микроскопических грибов относится не к психрофильным, а к психротолерантным формам (Кирцидели, 2015; Wang et al., 2015; Hassan et al., 2016).

Существенная часть выявленных родов микромицетов ранее была описана в иных холодных экосистемах: полярных регионах (Марфенина и соавт., 2016; Hassan et al., 2016; Лысак и соавт., 2018; Никитин и соавт., 2019; Kochkina et al., 2019), высокогорных областях (Wang et al., 2015), донных отложениях морей (Бубнова, Никитин, 2017; Khusnullina et al., 2018; Bubnova, Konovalova, 2019) и т.п. Это подтверждает правило Бейеринка “Везде есть все, но среда отбирает” (De Wit, Bouvier, 2006) и дает возможность предполагать большую схожесть сообществ микроорганизмов территорий с близкими экологическим условиями.

Значительная часть (30%) обнаруженных на ЗФИ видов входит в базу данных BSL патогенных для человека и животных видов (de Hoog et al., 2000). Данное явление свидетельствует о значительной антропогенной деятельности и не раз отмечалось микологами для полярных территорий (Кирцидели, 2015; Kirtsideli et al., 2017). Способность многих выявленных BSL видов к росту исключительно при повышенной температуре (25°C) говорит об инвазивном происхождении этих штаммов микромицетов (Власов и соавт., 2012; Кирцидели, 2015). Относительно низкое количество целлюлолитиков и фитопатогенов в исследован-

ных почвах кажется закономерным ввиду крайней разреженности растительного покрова ЗФИ (Матвеева и соавт., 2015).

Наибольшим видовым разнообразием в проанализированных образцах обладал род *Penicillium* (табл. 1S). Представители данного таксона – типичные почвенные обитатели, которых обнаруживают во многих полярных регионах (Yadav et al., 2018; Abirami et al., 2021). Вторым по количеству видов являлся род *Cadophora*, многие представители которого выявляли как в Арктике (Никитин и соавт., 2019; Iiushin, 2020), так и в Антарктике (Никитин и соавт., 2017a; Лысак и соавт., 2018; Kochkina et al., 2019; Abirami et al., 2021).

Немаловажным представляется факт большого разнообразия дрожжей среди выявленных микромицетов ЗФИ. Обнаружено 8 родов дрожжей, 7 из которых представлены базидиомицетовым аффинитетом, а *Aureobasidium* – аскомицетовым аффинитетом (табл. 1S). Значительное разнообразие и численность дрожжевых грибов отмечено микологами для многих полярных регионов (Connell et al., 2014; Buzzini et al., 2017; Tsuji, Hoshino, 2019) и других холодных экосистем (Sannino et al., 2017). По-видимому, дрожжи имеют ряд адаптаций, которые позволяют им успешнее выживать в суровых климатических условиях Арктики и Антарктики по сравнению с мезофильными микромицетами (Panikov, 2014).

Пространственная неоднородность микобиоты в почвах архипелага ЗФИ выявлена в пределах верхнего 5-сантиметрового слоя. Таким образом, разные типы почв (псаммозем, пелозем, криозем, литозем и серогумусовая), находящиеся на расстояниях десятков и сотен километров и характеризующиеся разным содержанием органического вещества, различались лишь в приповерхностных горизонтах и имели сходные характеристики микобиоты в нижележащих слоях. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что основная биогеохимическая активность микобиоты почв ЗФИ происходит в верхней 5-сантиметровой толще.

Итак, впервые с помощью методов ПЦР в реальном времени и микробиологического посева охарактеризована почвенная микобиота островов Алджера, Ферсмана, Гукера и Земля Александры, входящих в архипелаг Земля Франца-Иосифа (ЗФИ). Многие микромицеты изученных территорий ЗФИ были представлены не мицелиальными, а дрожжеподобными формами, что, по-видимому, важно для адаптации микобиоты к экстремально холодному климату. Таксономический состав культивируемой микобиоты этих территорий существенно отличается от отмеченного для почв умеренного климата. Так, отдел *Basidiomycota* в исследованных почвах ЗФИ практически полностью представлен дрожжами, а представители от-

дела *Zygomycota* – отсутствуют. Характерной особенностью проанализированных образцов является относительная однородность таксономического состава микромицетов в глубинных горизонтах всех почвенных профилей. В тоже время, численность КОЕ микроскопических грибов может достигать существенных величин лишь в поверхностных горизонтах, богатых органическим веществом.

Количественные параметры (численность копий рибосомальных генов ITS рРНК грибов и КОЕ микромицетов), а таксономическое разнообразие выявленных микромицетов для почв островов Алджер, Ферсмана, Хейса и Земля Александры во многом сходно с показанным для других территорий Высокой Арктики и Антарктики. Поэтому можно предложить, что структура сообществ почвенной микобиоты экстремальных экосистем, в первую очередь, определяется основными лимитирующими факторами, основным из которых в данном случае является суровый арктический климат.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят проект “Арктический плавучий университет” САФУ им. М.В. Ломоносова и лично К.С. Зайкова за организацию полевых работ на Земле Франца-Иосифа. Также авторы благодарят сотрудников отдела географии и эволюции почв Института географии РАН и лично С.В. Горячкина за помощь в определении таксономической принадлежности исследованных почв.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 20-04-00328 (проведение микробиологических исследований) и № 18-05-60279 (отбор, описание и химические анализы объектов исследования).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова В.Д. Открытые растительные группировки полярной пустыни острова Земля Александры (Земля Франца-Иосифа) и их классификация // Бот. журн. 1981. Т. 66. № 5. С. 26–36.
- Александрова В.Д. Растительность полярных пустынь СССР. Л., 1983. 148 с.

- Бубнова Е.Н., Никитин Д.А.* Грибы в донных грунтах удаленных от берега районов Баренцева и Карского морей // Биология моря. 2017. Т. 45. С. 366–372. <https://doi.org/10.1134/S1063074017050029>
- Bubnova E.N., Nikitin D.A.* Fungi in bottom soils of the Barents and Kara seas distant from the coast // Russian J. Mar. Biol. 2017. V. 45. P. 400–406.
- Власов Д.Ю., Зеленская М.С., Кирицели И.Ю., Абакумов Е.В., Крыленков В.А., Лукин В.В.* Грибы на природных и антропогенных субстратах в западной Антарктике // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46. С. 20–26.
- Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю.* Особенности динамики эпифитных и почвенных дрожжевых сообществ в зарослях недотроги железконосной на перегнойно-глеевой почве // Почвоведение. 2011. Т. 44. С. 966–972.
- Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Yu.* Specific features of the dynamics of epiphytic and soil yeast communities in the thickets of Indian balsam on mucky gley soil // Euras. Soil Sci. 2011. V. 44. P. 886–892. <https://doi.org/10.1134/S1064229311080059>
- Горячкин С.В., Долгих А.В., Мергелов Н.С.* Почвы островов Земли Франца-Иосифа: география, морфогенетические особенности, классификация и роль в углеродном цикле // Комплексная научно-образовательная экспедиция “Арктический плавающий университет-2017”. [Электронный ресурс]: материалы экспедиции. Под ред. Поликина Д.Ю. Архангельск: КИРА, 2017. С. 15–36.
- Goryachkin S.V., Dolgikh A.V., Mergelov N.S.* Soils of the islands of Franz Josef Land: geography, morphogenetic features, classification and role in the carbon cycle // Complex scientific and educational expedition “Arctic Floating University-2017” [Electronic resource]: materials of the expedition. Arkhangelsk: KIRA, 2017. P. 15–36. (in Russian)
- Дженюк С.Л.* Климатообразующие факторы и климатические особенности Земли Франца-Иосифа // Тр. Кольского научного центра РАН. 2014. № 4(23). С. 61–69.
- Добровольская Т.Г., Звягинцев Д.Г., Чернов И.Ю., Головченко А.В., Зенова Г.М., Лысак Л.В., Манучарова Н.А., Марфенина О.Е., Полянская Л.М., Степанов А.Л., Умаров М.М.* Роль микроорганизмов в экологических функциях почв // Почвоведение. 2015. Т. 48. С. 1087–1096. <https://doi.org/10.7868/S0032180X15090038>
- Dobrovol'skaya T.G., Zvyagintsev D.G., Chernov I.Y., Golovchenko A.V., Zenova G.M., Lysak L.V., Manucharova N.A., Marfenina O.E., Polyanskaya L.M., Stepanov A.L., Umarov M.M.* The role of microorganisms in the ecological functions of soils // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 959–967. <https://doi.org/10.1134/S1064229315090033>
- Ежов О.Н., Ершов Р.В., Змитрович И.В.* О находках базидиомицетов в условиях арктической пустыни (Земля Франца-Иосифа) // Бюлл. Моск. об-ва испытателей природы. Отделение биологии. 2012. Т. 117. № 4. С. 81–83.
- Ежов О.Н., Гаврило М.В., Змитрович М.В.* Грибы архипелага Земля Франца-Иосифа // Тр. Кольского научного центра РАН. 2014. № 4(23). С. 288–299.
- Ежов О.Н., Змитрович И.В., Ершов Р.В.* Новые данные о макромицетах архипелага Земля Франца-Иосифа // Бюлл. Моск. об-ва испытателей природы. Отделение биологии. 2016. Т. 121. № 5. С. 65–71.
- Журбенко М.П.* Лихенофильная микобиота Российской Арктики: таксономический анализ // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. С. 387–396.
- Звягинцев Д.Г.* Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. С. 60.
- Кирицели И.Ю.* Микроскопические грибы в почвах острова Хейса (Земля Франца-Иосифа) // Новости сист. низш. раст. 2015. Т. 49. С. 151–160.
- Кирицели И.Ю.* Микроскопические грибы в почвах и грунтах арктических горных систем // Биосфера. 2016. Т. 8. С. 63–78.
- Кирицели И.Ю., Власов Д.Ю., Зеленская М.С., Баранцевич Е.П., Новожилов Ю.К., Крыленков В.А., Чуркина И.В., Соколов В.Т.* Антропогенная модификация микобиоты на острове Визе в Карском море // Гигиена и санитария. 2018. Т. 97. С. 1058–1063. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1058-63>
- Kirtsideli I.Yu., Vlasov D.Yu., Zelenskaya M.S., Barantsevich E.P., Novozhilov Yu.K., Krylenkov V.A., Churkina I.V., Sokolov V.T.* Anthropogenic modification of mycobiota on the Vize island in the Kara Sea // Gigiyena i sanitariya. 2018. V. 97. P. 1058–1063. (in Russian)
- Кирицели И.Ю., Власов Д.Ю., Зеленская М.С., Ильюшин В.А., Новожилов Ю.К., Чуркина И.В., Баранцевич Е.П.* Оценка антропогенной инвазии микроскопических грибов в арктические экосистемы (архипелаг Шпицберген) // Гигиена и санитария. 2020. Т. 99. С. 145–151. <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-2-145-151>
- Kirtsideli I.Yu., Vlasov D.Yu., Zelenskaya M.S., Ilyushin V.A., Novozhilov Yu.K., Churkina I.V., Barantsevich Ye.P.* Assessment of anthropogenic invasion of microscopic fungi in arctic ecosystems (Svalbard archipelago) // Gigiyena i sanitariya. 2020. V. 99. P. 145–151. (in Russian)
- Корнейкова М.В., Никитин Д.А.* Качественные и количественные характеристики почвенного микробиома в зоне воздействия выбросов Кандалакшского алюминиевого завода // Почвоведение. 2021. Т. 54. С. 725–734. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21060083>
- Korneykova M.V., Nikitin D.A.* Qualitative and quantitative characteristics of the soil microbiome in the impact zone of the Kandalaksha aluminum smelter // Euras. Soil Sci. 2021. V. 54. P. 897–906. <https://doi.org/10.1134/S1064229321060089>
- Литвинов М.А.* Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969. 121 с.
- Лысак Л.В., Максимова И.А., Никитин Д.А., Иванова А.Е., Кудинова А.Г., Соина В.С., Марфенина О.Е.* Микробные сообщества почв Восточной Антарктиды // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2018. Т. 73. С. 132–140.
- Lysak L.V., Maksimova I.A., Nikitin D.A., Ivanova A.E., Kudina A.G., Soina V.S., Marfenina O.E.* Soil Microbial Communities of Eastern Antarctica // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. V. 73. P. 104–112.
- Марфенина О.Е., Никитин Д.А., Иванова А.Е.* Структура грибной биомассы и разнообразие культивируемых микромицетов в почвах Антарктиды (станции Прогресс и Русская) // Почвоведение. 2016. Т. 49. С. 991–999. <https://doi.org/10.7868/S0032180X16080074>

- Marfenina O.E., Nikitin D.A., Ivanova A.E.* The structure of fungal biomass and diversity of cultivated micromycetes in Antarctic soils (Progress and Russkaya stations) // *Euras. Soil Sci.* 2016. V. 49. P. 934–941. <https://doi.org/10.1134/S106422931608007X>
- Мосеев Д.С., Сергиенко Л.А.* К флоре островов архипелага Земля Франца-Иосифа и северной части архипелага Новая Земля (аннотированный список видов) // *Ученые записки Петрозаводского гос. ун-та.* 2017. № 4(165). С. 48–64.
- Мосеев Д.С., Сергиенко Л.А., Кузьмина Е.Ю., Сони́на А.В., Зори́на А.А.* Растительный покров морских террас архипелага Земля Франца-Иосифа // *Бот. журн.* 2019. № 104. С. 1355–1385. <https://doi.org/10.1134/S0006813619090096>
- Moseev D.S., Sergienko L.A., Kuzmina E.Yu., Sonina A.V., Zorina A.A.* Vegetation cover of sea terraces of the Franz Josef Land archipelago // *Botanicheskiy zhurnal.* 2019. V. 104. P. 1355–1385. (in Russian).
- Матвеева Н.В., Заноха Л.Л., Афонина О.М., Потемкин А.Д., Патова Е.Н., Давыдов Д.А., Андреева В.М., Журбенко М.П., Конорева Л.А., Змитрович И.В., Ежов О.Н., Ширяев А.Г., Кирицели И.Ю.* Растения и грибы полярных пустынь Северного полушария. Российская академия наук, Ботанический институт им. В.Л. Комарова. СПб.: Изд-во “Марафон”. 2015, 314 с.
- Никитин Д.А., Марфенина О.Е., Максимова И.А.* Использование сукцессионного подхода при изучении видового состава микроскопических грибов и содержания грибной биомассы в антарктических почвах // *Микология и фитопатология.* 2017а. Т. 51. С. 211–219.
- Никитин Д.А., Семенов М.В., Тхакахова А.К., Железова А.Д., Бгажба Н.А., Кутовая О.В.* Численность копий рибосомальных генов микобиоты в почвах и почвоподобных телах Земли Франца-Иосифа и Новой Земли // *Комплексная научно-образовательная экспедиция “Арктический Плавающий Университет-2017”.* 2017б. [Электронный ресурс]: материалы экспедиции. Под ред. Поликина Д.Ю. Архангельск: КИРА, 2017. С. 35–39.
- Никитин Д.А., Семенов М.В., Семиколенных А.А., Максимова И.А., Качалкин А.В., Иванова А.Е.* Биомасса грибов и видовое разнообразие культивируемой микобиоты почв и субстратов о. Нортбрук (Земля Франца-Иосифа) // *Микология и фитопатология.* 2019. Т. 53. С. 210–222. <https://doi.org/10.1134/S002636481904010X>
- Никитин Д.А., Иванова Е.А., Железова А.Д., Семенов М.В., Гаджиумаров Р.Г., Тхакахова А.К., Чернов Т.И., Ксенофонтова Н.А., Кутовая О.В.* Оценка влияния технологии no-till и вспашки на микробиом южных агрочерноземов // *Почвоведение.* 2020. Т. 53. С. 1508–1520. <https://doi.org/10.31857/S0032180X20120084>
- Nikitin D.A., Ivanova E.A., Zhelezova A.D., Semenov M.V., Gadzhumarov R.G., Tkhakakhova A.K., Chernov T.I., Xenophonova N.A., Kutovaya O.V.* Assessment of the impact of no-till and conventional tillage technologies on the microbiome of southern agrochernozems // *Euras. Soil Sci.* 2020. V. 53. P. 1782–1793. <https://doi.org/10.1134/S106422932012008X>
- Никитин Д.А., Лысак Л.В., Бадмадашиев Д.В., Холод С.С., Мергелов Н.С., Долгих А.В., Горячкин С.В.* Биологическая активность почв севера архипелага Новая Земля: влияние крупнейшего ледника России // *Почвоведение.* 2021. Т. 54. № 10. с. 1207–1230. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21100087>
- Nikitin D.A., Lysak L.V., Badmadashiev D.V., Kholod S.S., Mergelov N.S., Dolgikh A.V., Goryachkin S.V.* Biological activity of soils in the north of the Novaya Zemlya archipelago: the influence of the largest glacier in Russia // *Euras. Soil Sci.* 2021. V. 54, pp. 1207–1230. doi 10.1134/S1064229321100082
- Никитин Д.А.* Экологические особенности грибов Антарктиды // *Микология и фитопатология.* 2021. Т. 55. С. 79–104. <https://doi.org/10.31857/S0026364821020070>
- Никитин Д.А., Лысак Л.В., Кутовая О.В., Грачева Т.А.* Эколого-трофическая структура и таксономическая характеристика сообществ микроорганизмов почв северной части архипелага Новая Земля // *Почвоведение.* 2021. Т. 54. № 11. С. 1346–1362. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21110101>
- Nikitin D.A., Lysak L.V., Kutovaya O.V., Gracheva T.A.* Ecological and trophic structure and taxonomic characteristics of communities of soil microorganisms in the northern part of the Novaya Zemlya archipelago // *Euras. Soil Sci.* 2021. V. 54. P. 1346–1362. doi 10.1134/S1064229321110107
- Сафронова И.Н., Юрковская Т.К.* Зональные закономерности растительного покрова равнин Европейской России и их отображение на карте // *Бот. журн.* 2015. Т. 100. С. 1121–141. <https://doi.org/10.1134/S0006813615110010>
- Safronova I.N., Yurkovskaya T.K.* Zonal patterns of the vegetation cover of the plains of European Russia and their display on the map // *Bot. zhurn.* 2015. V. 100. P. 1121–141. (in Russian).
- Семенов М.В., Никитин Д.А., Степанов А.Л., Семенов В.М.* Структура бактериальных и грибных сообществ ризосферного и внекорневого локусов серой лесной почвы // *Почвоведение.* 2019а. Т. 52. С. 355–369. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19010131>
- Semenov M.V., Nikitin D.A., Stepanov A.L., Semenov V.M.* The structure of bacterial and fungal communities in the rhizosphere and root-free loci of gray forest soil // *Euras. Soil Sci.* 2019. V. 52. P. 319–332. <https://doi.org/10.1134/S1064229319010137>
- Семенов М.В., Манучарова Н.А., Краснов Г.С., Никитин Д.А., Степанов А.Л.* Биомасса и таксономическая структура микробных сообществ в почвах правобережья р. Оки // *Почвоведение.* 2019б. Т. 52. С. 974–985. <https://doi.org/10.1134/S0032180X19080124>
- Semenov M.V., Manucharova N.A., Krasnov G.S., Nikitin D.A., Stepanov A.L.* Biomass and taxonomic structure of microbial communities in soils of the right-bank basin of the Oka River // *Euras. Soil Sci.* 2019. V. 52. P. 971–981.
- Abirami B., Manigundan K., Radhakrishnan M., Gopikrishnan V., Bhaskar P.V., Shanmugasundaram T., Dastager S.G.* Diversity and bioprospecting potentials of antarctic (polar) microbes // *Microbiome-Host Interactions* / Eds. D. Dhanasekaran, Dhiraj Paul, N. Amaresan, A. Sankaranarayanan, Yogesh S. Shouche. Boca Raton: CRC Press, 2021. P. 349.
- Arup U.* PCR techniques and automated sequencing in lichens // *Protocols in Lichenology: Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring* / Eds. Kraner I., Beckett R.P., Varma A.K. N.Y.: Springer-Verlag,

2002. P. 392–411.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-56359-1_24
- Bergero R., Girlanda M., Varese G.C., Intili D., Luppi A.M. Psychrooligotrophic fungi from Arctic soils of Franz Joseph Land // *Polar Biol.* 1999. V. 21. P. 361–368.
<https://doi.org/10.1007/s003000050374>
- Blaud A., Phoenix G.K., Osborn A.M. Variation in bacterial, archaeal and fungal community structure and abundance in High Arctic tundra soil // *Polar Biol.* 2015. V. 38. P. 1009–1024.
<https://doi.org/10.1007/s00300-015-1661-8>
- Bubnova E.N., Konovalova O.P. Fungi in bottom sediments of the Chukchi Sea // *Russian J. Mar. Biol.* 2019. V. 45. P. 86–95.
<https://doi.org/10.1134/S1063074019020020>
- Buzzini P., Turk M., Perini L., Turchetti B., Gunde-Cimerman N. Yeasts in polar and subpolar habitats // *Yeasts in natural ecosystems: diversity* / Eds. Buzzini P., Lachance M.A., Yurkov A. Springer, Cham. 2017. P. 331–365.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_11
- Castle S.C., Lekberg Y., Affleck D., Cleveland C.C. Soil abiotic and biotic controls on plant performance during primary succession in a glacial landscape // *J. Ecol.* 2016. V. 104. P. 1555–1565.
<https://doi.org/10.1111/1365-2745.12615>
- Connell L.B., Rodriguez R.R., Redman R.S., Dalluge J.J. Cold-adapted yeasts in Antarctic deserts // *Cold-Adapted Yeasts. Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance* / Eds. Buzzini P., Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. P. 75–98.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_4
- de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi (No. Ed. 2). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). 2000. 1126 p.
- de Wit R., Bouvier T. ‘Everything is everywhere but the environment selects’; what did Baas Becking and Beijerinck really say? // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. P. 755–758.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01017.x>
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi / Ed. Gams W. 2nd taxonomically revised edn. Eching: IHW-Verlag, 2007. 627 p.
- Flocco C.G., Mac Cormack W.P., Smalla K. Antarctic soil microbial communities in a changing environment: their contributions to the sustainability of Antarctic ecosystems and the bioremediation of anthropogenic pollution // *The Ecological Role of Micro-Organisms in the Antarctic Environment* / Ed. Castro-Sowinski S. Springer, Cham. 2019. P. 133–161.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-02786-5_7
- Hassan N., Rafiq M., Hayat M., Shah A.A., Hasan F. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2016. V. 15. P. 147–172.
<https://doi.org/10.1007/s11157-016-9395-9>
- He L., Mazza Rodrigues J.L., Soudzilovskaiac N.A., Barceló M., Pål Axel Olsson, Song Ch., Tedersoo L., Fenghui Yuana, Fengming Yuan, Lipson D.A., Xu X. Global biogeography of fungal and bacterial biomass carbon in topsoil // *Soil Biol. Biochem.* 2020. V. 151. Art. 108024.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108024>
- Iliushin V.A. First find of *Cadophora Antarctica* Rodr.-Andrade, Stehigel, Mac Cormack & Cano in the Arctic // *Czech. Polar Rep.* 2020. V. 10. P. 147–152.
<https://doi.org/10.5817/CPR2020-2-11>
- Khusnullina A.I., Bilanenko E.N., Kurakov A.V. Microscopic fungi of White Sea sediments // *Contemp. Probl. Ecol.* 2018. V. 11. P. 503–513.
<https://doi.org/10.1134/S1995425518050062>
- Kirtsideli I.Y., Vlasov D.Y., Abakumov E.V., Barantsevich E.P., Novozhilov Y.K., Krylenkov V.A., Sokolov V.T. Airborne fungi in arctic settlement Tiksi (Russian Arctic, coast of the Laptev Sea) // *Czech Polar Rep.* 2017. V. 7. P. 300–310.
<https://doi.org/10.5817/CPR2017-2-29>
- Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Lupachev A.V., Starodumova I.P., Vasilenko O.V., Ozerskaya S.M. Diversity of mycelial fungi in natural and human-affected Antarctic soils // *Polar Biol.* 2019. V. 42. P. 47–64.
<https://doi.org/10.1007/s00300-018-2398-y>
- Panikov N.S. Subzero Activity of Cold-Adapted Yeasts / *Cold-adapted Yeasts.* 2014. P. 295–323.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_14
- Sannino C., Tasselli G., Filippucci S., Turchetti B., Buzzini P. Yeasts in nonpolar cold habitats // *Yeasts in natural ecosystems: Diversity* / Eds. Buzzini P., Lachance M.A., Yurkov A. Springer, Cham., 2017. P. 367–396.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_12
- Seifert K.A., Gams W. The genera of *Hyphomycetes* – 2011 update // *Persoonia.* 2011. V. 27. P. 119.
<https://doi.org/10.3767/003158511X617435>
- Tsuji M., Hoshino T. Fungi in Polar Regions / Eds. Tsuji M., Hoshino T. CRC Press. Taylor and Francis Group. 2019.
- Yadav A.N., Verma P., Kumar V., Sangwan P., Mishra S., Panjari N., Gupta V.K., Saxena A.K. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats // *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* / Ed. Vijai Kumar Gupta. Elsevier, 2018. P. 3–18.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>
- Wang M., Jiang X., Wu W., Hao Y., Su Y., Cai L., Xiang M., Liu X. Psychrophilic fungi from the world’s roof / *Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi.* 2015. V. 34. P. 100–112.
<https://doi.org/10.3767/003158515X685878>

Characterization of Franz Josef Land Soil Mycobiota by Microbiological Plating and Real-Time PCR

D. A. Nikitin¹ * and M. V. Semenov¹

¹Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, 119017 Russia

*e-mail: dimnik90@mail.ru

Received July 6, 2021; revised September 6, 2021; accepted September 22, 2021

Abstract—The mycobiota of the following soils of the Franz Josef Land archipelago was characterized using the classical plating techniques and real-time PCR methods: Cryosols (Arenic), Cryosols (Loamic), Oxyaquic Cryosols (Loamic), Leptosols (Loamic), and Cryosols (Loamic, Humic). The total abundance of mi-

microscopic fungi varied from 3.10×10^1 CFU/g soil in deep mineral horizons to 6.56×10^3 CFU/g soil in the upper organogenic soil horizons. A total of 47 micromycete species were isolated, which belonged to 32 genera from 3 divisions. Psychrotolerant strains, growing at both 5 and 25°C, were predominant. The genera *Penicillium* (5 species), *Cadophora* (4 species), *Cladosporium*, *Phoma* and *Thelebolus* (3 species each) exhibited the highest species diversity. The most numerous genera, *Penicillium*, *Hyphozyma*, *Phoma*, *Antarctomyces*, and *Pseudogymnoascus* were saprotrophic and common in cold ecosystems. *Pseudogymnoascus pannorum*, *Hyphozyma variabilis* var. *variabilis*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Thelebolus microsporus*, and *Goffeauzyma gilvescens* were the species most often revealed by plating (over 40% occurrence). A significant part (30%) of identified species were those included in the BSL database of species pathogenic for humans and animals. The number of copies of the fungal ITS rRNA ribosomal genes varied from 1.00×10^9 to 4.40×10^{10} copies/g soil in the mineral and organogenic layers, respectively. Spatial heterogeneity of mycobiota in the soils of the Franz Josef Land archipelago was revealed within the upper 5-cm layer, while deeper horizons were characterized by a uniform structure of micromycete communities.

Keywords: Arctic, extreme ecosystems, soils, microscopic fungi, real-time PCR, CFU numbers

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФОТОТРОФНОГО
ПИКОПЛАНКТОНА МОРЕЙ КАРСКОГО И ЛАПТЕВЫХ© 2022 г. Т. А. Белевич^{a, b, *}, И. А. Милютина^b^aБиологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия^bНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

*e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 12.08.2021 г.

После доработки 30.08.2021 г.

Принята к публикации 31.08.2021 г.

В работе дана оценка видового состава фототрофных эукариот (ФЭ) с размером клеток менее 3 мкм в осеннем фитопланктоне Карского моря и моря Лаптевых. Метагеномное секвенирование области V4 гена 18S рРНК выявило присутствие в пикофракции планктона исследуемых морей представителей 15 классов водорослей из пяти отделов: *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Chlorophyta*, *Ochrophyta* и *Dinoflagellata*. Основной вклад в общее число прочтений ФЭ вносили динофлагелляты и зеленые водоросли класса *Mamiellophyceae*. Наибольшим таксономическим разнообразием характеризовался отдел *Chlorophyta*, в его составе выявлены представители семи классов: *Mamiellophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Nephroselmidophyceae*, *Palmophyllophyceae*, *Pyramimonadophyceae*, *Chlorodendrophyceae* и *Chlorophyceae*. Такие представители *Bolidophyceae*, как *Triparma strigata* и *T. laevis*, а также диатомея *Skeletonema marinoi* впервые выявлены, соответственно, в морях Карском и Лаптевых. Разнообразие таксонов ФЭ определялось гидрологическими условиями районов расположения станций. Индексы видового разнообразия на станциях, расположенных в верхней части эстуария р. Хатанга и в районах обоих морей, прилегающих к эстуариям рек Хатанга и Обь, были выше, чем на самой северной станции моря Лаптевых. Полученные данные показали, что таксономический состав самой мелкой фракции фитопланктона двух шельфовых морей российской Арктики был сходен с выявленным для других арктических районов.

Ключевые слова: пикофитопланктон, фототрофные эукариоты, видовой состав, ДНК-метабаркодинг, Карское море, море Лаптевых

DOI: 10.31857/S0026365622010025

К пикопланктону относятся фототрофные и гетеротрофные организмы с размером клеток менее 3 мкм (Moon-van der Staay et al., 2001; Vaultot et al., 2008). Фототрофные эукариоты (ФЭ) пикоразмера являются одним из ключевых компонентов планктона, дающим существенный вклад в биомассу фитопланктона и первичную продукцию в арктических районах Мирового океана (Tremblay et al., 2009; Demidov et al., 2021). В то же время таксономический состав этой фракции фитопланктона до сегодняшнего дня остается слабоизученным. Идентификация ФЭ пикоразмера традиционными методами микроскопического анализа затруднено из-за отсутствия у многих таксонов выраженных морфологических признаков и разрушения нежных форм при фиксации. В настоящее время для определения видового богатства ФЭ с размером клеток менее 3 мкм с успехом применяются молекулярно-генетические методы, например, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и метод высокопроизводительного секвенирова-

ния (HTS). Генетическое разнообразие ФЭ исследовано во многих районах Мирового океана, включая Арктику (Kirkham et al., 2013; Kiliyas et al., 2014; Metfies et al., 2016), однако сведения о составе этой размерной фракции фитопланктона в Карском море и море Лаптевых ограничены двумя работами, в которых данные представлены одной пробой из моря Лаптевых и двумя пробами из Карского моря (Metfies et al., 2016; Белевич и соавт., 2020). Наиболее подробно в морях российской Арктики исследовано разнообразие и пространственное распределение пиководорослей класса *Mamiellophyceae* (*Chlorophyta*) (Belevich et al., 2021a). В то же время видовой состав ФЭ пикофракции планктона намного разнообразнее и насчитывает представителей более 10 классов водорослей (Vaultot et al., 2008).

Моря Карское и Лаптевых относятся к эпиконтинентальным арктическим водоемам и находятся под влиянием мощного пресноводного стока рек Оби и Енисея, Лены и Хатанги соответственно

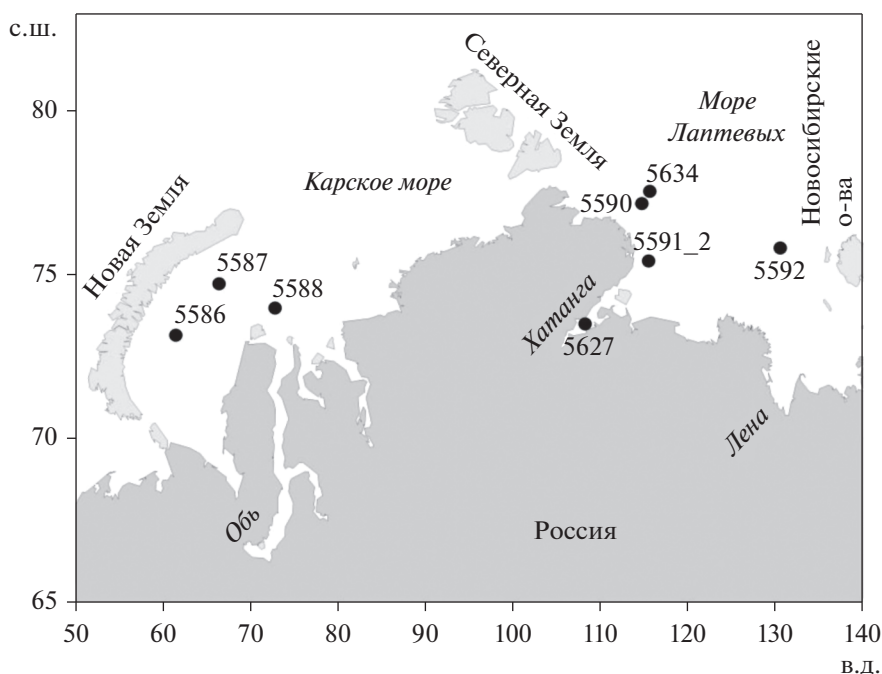


Рис. 1. Схема расположения станций отбора проб в Карском море и море Лаптевых.

(Gordeev et al., 1996; Stain, 2000). Гидрофизические и гидрохимические условия в Карском и Лаптевых морях, складывающиеся под влиянием речного стока, во многом определяют структуру и видовой состав микро- и нанофракций фитопланктона (Суханова и соавт., 2010, 2012, 2019). Можно предположить, что таксономический состав и структура сообществ ФЭ пикоразмера также будет зависеть от биотопических условий среды.

Цель настоящей работы состояла в оценке таксономического состава и структуры сообществ фототрофных эукариот пикофракции планктона морей Карского и Лаптевых в конце августа–начале сентября 2017 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Материалом для работы послужили пробы, отобранные в ходе 69-го рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” в конце августа–начале сентября 2017 г. на трех станциях Карского моря и пяти станциях моря Лаптевых между 73°06′–77°32′ с.ш. и 61°18′–130°29′ в.д. (рис. 1).

Для оценки таксономического состава фотавтотрофных пикоэукариот пробы воды объемом 3–5 л были отобраны с глубины максимума флуоресценции хлорофилла на основании данных вертикального зондирования STD-зондом Sea-Bird-911, оснащенного флуориметром (Белевич и соавт., 2019) (табл. 1). Для удаления нано- и микропланктона пробу воды пропускали через камеру обратной фильтрации (диаметр пор фильтра

3 мкм), фильтрат осаждали на картридж Sterivex (“Millipore”, США) с диаметром пор 0.2 мкм, заполняли его лизирующим раствором (50 мМ Tris-HCl, 0.75 М сахарозы и 40 мМ EDTA; pH 8.3), замораживали и хранили в жидком азоте до дальнейшего анализа.

Выделение, амплификация и секвенирование ДНК. Для выделения ДНК использовали набор Nucleospin Plant (“Macherey-Nagel”, Германия), амплификацию проводили с праймерами на область V4 гена 18S рРНК: прямой – EuF-V4 и обратный – picoR2 (Belevich et al., 2018). Для амплификации использовали набор Encyclo Plus PCR Kit (ЗАО “Евроген”, Россия). Условия амплификации следующие: начальная денатурация 94°C – 3 мин; 28 циклов: 94°C – 15 с, отжиг праймеров 64°C – 15 с, элонгация 72°C – 30 с; заключительная элонгация 5 мин. Продукты амплификации были отделены от праймеров препаративным электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с последующим выделением из агарозы с помощью набора MinElute Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Секвенирование ПЦР продуктов осуществлялось ООО “БиоСпарк” (<http://biospark.pro>) на платформе “Illumina MiSeq” (США), результаты депонированы в SRA NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), биопроект № PRJNA636255.

Биоинформационный анализ. Анализ полученных по результатам секвенирования нуклеотидных последовательностей, длина которых составляла около 250 н.о., был проведен с использованием алгоритма DADA2 в R (v3.5.2) (Callahan

Таблица 1. Характеристики станций и молекулярно-генетического разнообразия ФЭ

Станции	<i>H</i>	Широта, с.ш. долгота, в.д.	<i>R</i> _{общ}	<i>r</i>	<i>r</i> _{ФЭ}	ASVs _{ФЭ}	<i>N</i> _{такс}	Индекс разнообразия		
								Simpson	Shannon	Chao
5586	45	73°06.2' 61°18.9'	75746	67052	8887	219	49	0.79	2.21	49
5587	0	74°47.7' 66°34.9'	92663	60766	14486	282	45	0.72	1.83	45
5588	5	73°54.4' 72°59.2'	86444	74581	15116	309	54	0.89	2.75	54
5590	15	77°10.2' 114°40.0'	111868	105083	11771	234	50	0.77	2.06	50
5591_2	0	75°24.7' 115°26.6'	73164	67372	25010	243	50	0.36	1.10	50
5592	0	75°48.5' 130°29.7'	76713	70748	11868	267	42	0.78	2.04	42
5627	0	73°29.6' 108°10.9'	125185	112731	52829	399	71	0.89	2.74	71
5634	5	77°38.7' 115°35.6'	68897	62646	33275	248	35	0.38	0.94	35

Обозначения: *H*, м – глубина отбора проб; *R*_{общ} – число качественных прочтений; *r* – число прочтений, относящихся к простейшим; *r*_{ФЭ} – число простейших, относящихся к ФЭ; ASVs_{ФЭ} – число вариантов последовательностей ампликона ФЭ; *N*_{такс} – число таксонов разного ранга.

et al., 2016). Биоинформационная обработка включала фильтрацию по качеству и длине, объединение прямых и обратных прочтений, учет одинаковых последовательностей, исключение синглтонов, удаление химерных последовательностей и их классификация с использованием метода варианта последовательности ампликона (ASV). Биоинформационная обработка проводилась согласно протоколу (Vaulot 2018; Tutorial R Dada2 metabarcode analysis https://vaulot.github.io/tutorials/R_dada2_tutorial.html#load-the-necessary-libraries). Для таксономического анализа классификацию полученных ASVs проводили по базе Protist Ribosomal Reference database (PR2 version 4.12.0 <https://github.com/pr2database/pr2database/releases/>). Уровень сходства для всех таксономических уровней превышал 97%. Результаты анализа представлены в дополнительных материалах, находящихся в открытом доступе на платформе Figshare (https://figshare.com/articles/dataset/Table_S1_The_abundance_of_protists_ASVs_in_each_sample_and_their_taxonomy_against_PR2_/15152178).

Статистический анализ. Анализ данных проводили с помощью программы PRIMER Version 6 (Clarke, Gorley, 2006) Сходство между пробами рассчитывали на основе индекса Брея–Кёртиса. На основании полученных матриц сходства проводили ординацию проб методом многомерного шкалирования (MDS). Ординация выполнялась для данных, трансформированных путем извлечения квадратного корня из величин относитель-

ного числа прочтений каждого таксона водорослей для уменьшения влияния на оценки сходства прочтений доминирующих таксонов. Достоверность различий групп проб по структуре сообществ фитопланктона оценивали методом ANOSIM. Оценку вклада отдельных видов в сходство внутри группы проб и различий между группами проб проводили с помощью процедуры SIMPER. Для расчета индексов разнообразия использовали PAST v.3 (Hammer et al., 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общий состав пикофракции планктона. Общее число качественных прочтений при секвенировании проб составило 710680, доля последовательностей, относившихся к простейшим, колебалась от 66 до 94% (табл. 1). Основной вклад вносили представители супергруппы SAR (*Stramenopiles*, *Alveolata*, *Rhizaria*), включающей последовательности *Ochrophyta*, *Pseudofungi*, *Opalozoa*, *Sagenista*, *Ciliophora*, *Dinoflagellata*, *Perkinsea*, *Radiolaria* и *Cercozoa* (рис. 2). Также выявлены представители супергрупп *Archaeplastida* (*Chlorophyta*), *Hacrobia* (*Cryptophyta*, *Haptophyta*, *Picozoa*, *Telonemia*, *Centroheliozoa*, *Katablepharidophyta*), *Opisthokonta* (*Choanoflagellida*), *Amoebozoa* (*Lobosa*) и *Apusozoa* (*Apusomonadidae*) (рис. 2).

Простейшие, относящиеся к *Rhizaria* и *Opisthokonta*, являются исключительно гетеротрофными формами, в то время как представители *Alveolata*,

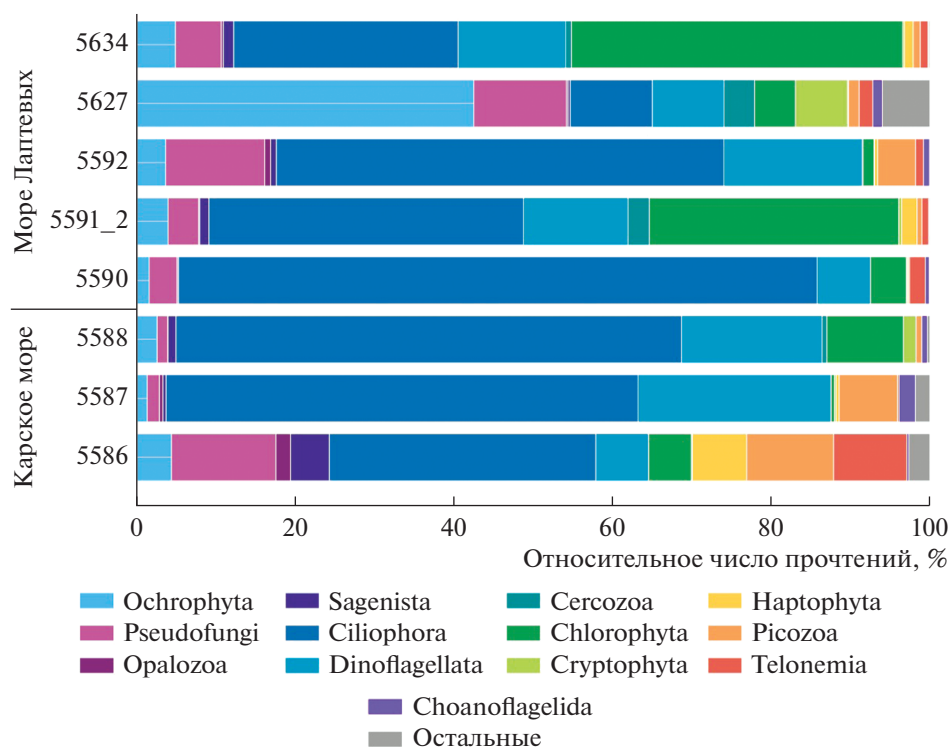


Рис. 2. Вклад прочтений, относящихся к разным таксономическим группам в пробах Карского и Лаптевых морей. Группа “Остальные” включает представителей *Radiolaria*, *Lobosa*, *Apusomonadidae*, *Centroheliozoa* и *Katablepharidophyta*.

Hacrobia и *Stramenopiles* включают в себя фотоавтотрофные, миксотрофные и гетеротрофные организмы. Относительное обилие прочтений *Radiolaria*, *Lobosa*, *Apusomonadidae*, *Centroheliozoa* и *Katablepharidophyta* не превышало 1% в каждой пробе. Число выявленных ASVs, принадлежавших к таксонам разного ранга, варьировало от 219 до 399 (табл. 1). При уровне сходства выше 97% до уровня класса и порядка были идентифицированы 80 и 27% всех ASVs соответственно, до уровня рода – 10%, большинство родов были представлены несколькими ASVs.

Поскольку целью наших исследований являются фотоавтотрофные планктонные организмы, то из последующего анализа нами были исключены группы, состоящие исключительно из гетеротрофных форм, а также ASVs из групп, включающих организмы разной трофности, определенные до вида, с гетеротрофным типом питания.

Видовой состав фототрофных эукариот. Число последовательностей ФЭ существенно варьировало между пробами, составляя в среднем 28% от общего числа прочтений простейших (табл. 1). Выявленные ASVs соответствовали таксонам, относящимся к пяти филогенетическим группам, включающим 15 классов водорослей (рис. 3). Всего идентифицировано 126 таксонов, из которых до уровня вида – 43, до уровня рода – 22, остальные относились к группам более высокого ранга –

семействам, порядкам и классам водорослей (дополнительные материалы).

Основной вклад в общее число последовательностей фототрофных организмов исследуемой фракции вносили динофлагелляты и зеленые водоросли класса *Mamiellophyceae*. Доля последовательностей *Dinophyceae* и *Mamiellophyceae* варьировала от 5 до 92% и от 1 до 83% соответственно (рис. 3). Таксоны, чей вклад в общее число прочтений фототрофных эукариот превышал 1%, при дальнейшем изложении будут называться доминирующими.

Среди динофлагеллят доминирующими были роды и виды *Gymnodinium* sp., *Heterocapsa* sp., *H. pygmaea* и *Prorocentrum* sp. (рис. 4). Большая часть последовательностей динофитовых водорослей была идентифицирована до более высокого уровня – класса (*Dinophyceae*) и семейства (*Gymnodiniaceae*), вклад этих групп в общее число прочтений фототрофных организмов колебался от 2 до 50% и от 1 до 36% соответственно (рис. 4).

Наибольшим таксономическим разнообразием характеризовался отдел *Chlorophyta*, в его составе выявлены представители семи классов: *Mamiellophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Nephroselmidophyceae*, *Palmophyllophyceae*, *Pyramimonadophyceae*, *Chlorodendrophyceae* и *Chlorophyceae* (рис. 3). *Mamiellophyceae* доминировали по числу прочтений и были представлены наиболее широко – идентифицированы

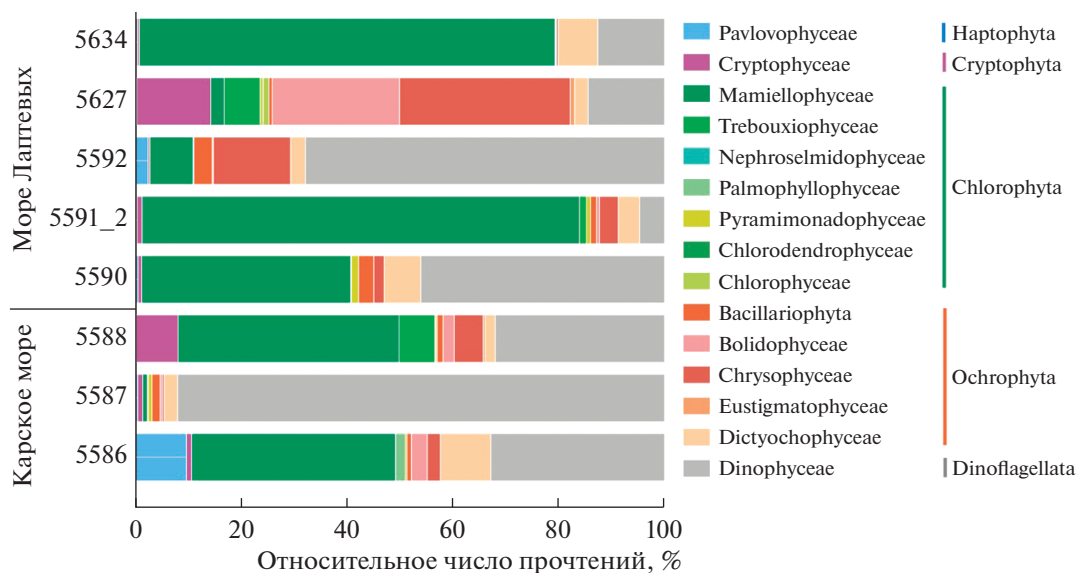


Рис. 3. Относительное обилие прочтений разных таксономических групп ФЭ (<3 мкм) в пробах морей Карского и Лаптевых.

Bathycoccus prasinus, *Mantoniella beaufortii*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri*, *Micromonas polaris*, *Micromonas commoda* и *Micromonas* клада В3 согласно Tragin и Vaulot (2019) или клада F согласно Belevich et al. (2018). Последовательности *M. polaris* были выявлены почти во всех пробах, его вклад варьировал от 2 до 78% от общего числа прочтений фототрофных эукариот (рис. 4). Также в состав доминирующих таксонов вошли *B. prasinus*, *M. squamata* и *Micromonas* клада В3 (F) (рис. 4). *Trebouxiophyceae* были наиболее широко представлены на станциях 5588, 5627 и 5591_2, расположенных в районах эстуариев Оби и Хатанги. Представители *Chlorodendrophyceae* и *Chlorophyceae* были выявлены только на ст. 5627; их доля в общем числе прочтений ФЭ составила 0.1 и 1.1%. Остальные классы *Chlorophyta* также были представлены большим числом видов и более крупными таксономическими группами, однако вклад каждого в общее число прочтений не превышал 1% (доп. материалы). Исключение составили два рода – *Picochlorum* sp. (*Trebouxiophyceae*) и *Prasinoderma* sp. (*Palmophyllophyceae*), их доля в Карском море составила 4% (ст. 5588) и 1% (ст. 5586) соответственно (рис. 4).

Криптофитовые водоросли *Hemiselmis cryptocromatica*, *Plagioselmis prolunga*, *Teleaulax gracilis*, *Rhodomonas* sp. и крупная таксономическая группа *Cryptophyceae*-1 X sp. также вошли в состав доминирующих таксонов (рис. 4). Наибольшее обилие *Cryptophyta* было выявлено на ст. 5627 и в сумме достигало 14% от общего числа прочтений.

Среди диатомовых водорослей представители рода *Chaetoceros* – *Ch. decipiens* и *Chaetoceros* sp., входили в состав доминирующих видов на ст. 5992

моря Лаптевых. Остальные диатомовые, определенные до вида/рода *Actinocyclus curvatus*, *Attheya* sp., *Ch. cinctus*, *Ch. contortus*, *Ch. neogracilis*, *Cyclotella* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Fragilariopsis cylindrus*, *Nitzschia* sp., *Porosira glacialis*, *Skeletonema* sp., *S. marinoi*, *Thalassiosira* sp., *Th. guillardii* и *Th. nordenskiöldii*, а также более крупные группы, такие как *Polarcentric-Mediophyceae*, *Raphid-pennate*, *Naviculales* и *Bacillariophyta*, были представлены малым числом последовательностей, и вклад каждой не превышал 1%.

Chrysophyceae были представлены двумя родами – *Spumella elongata* и *Dinobryon fauliferum*, а также несколькими крупными кладами *Chrysophyceae* – С, F, I, H, G и E. В состав доминирующих видов *Chrysophyceae* вошла *S. elongata*, ее вклад составил 2%. Максимальный вклад *Chrysophyceae* был выявлен на ст. 5627 (рис. 3).

Также следует отметить присутствие водорослей, относящихся к *Bolidophyceae* и *Dictyochophyceae*, и представителей *Haptophyta*. Из последних двух упомянутых крупных таксономических групп в состав доминирующих вошли *Florenciella parvula* и *Chrysochromulina* sp., их вклад превышал 5 и 2% соответственно. Также выявлены гаптофитовые водоросли *Phaeocystis pouchetii* и *Phaeocystis* sp., диктихофитовые *Apedinella radians*, *Pseudochattonella* sp., *Pseudopedinella* sp. и *Pseudopedinella elastica*, болидофитовые водоросли клады *Triparma laevis* и *Tr. pacifica*, вклад каждого из них не достигал 1% (см. доп. материалы). *Bolidophyceae* доминировали по числу прочтений в составе сообществ ФЭ на ст. 5627 (рис. 3).

Структура и разнообразие сообществ ФЭ. Анализ видового богатства с использованием как

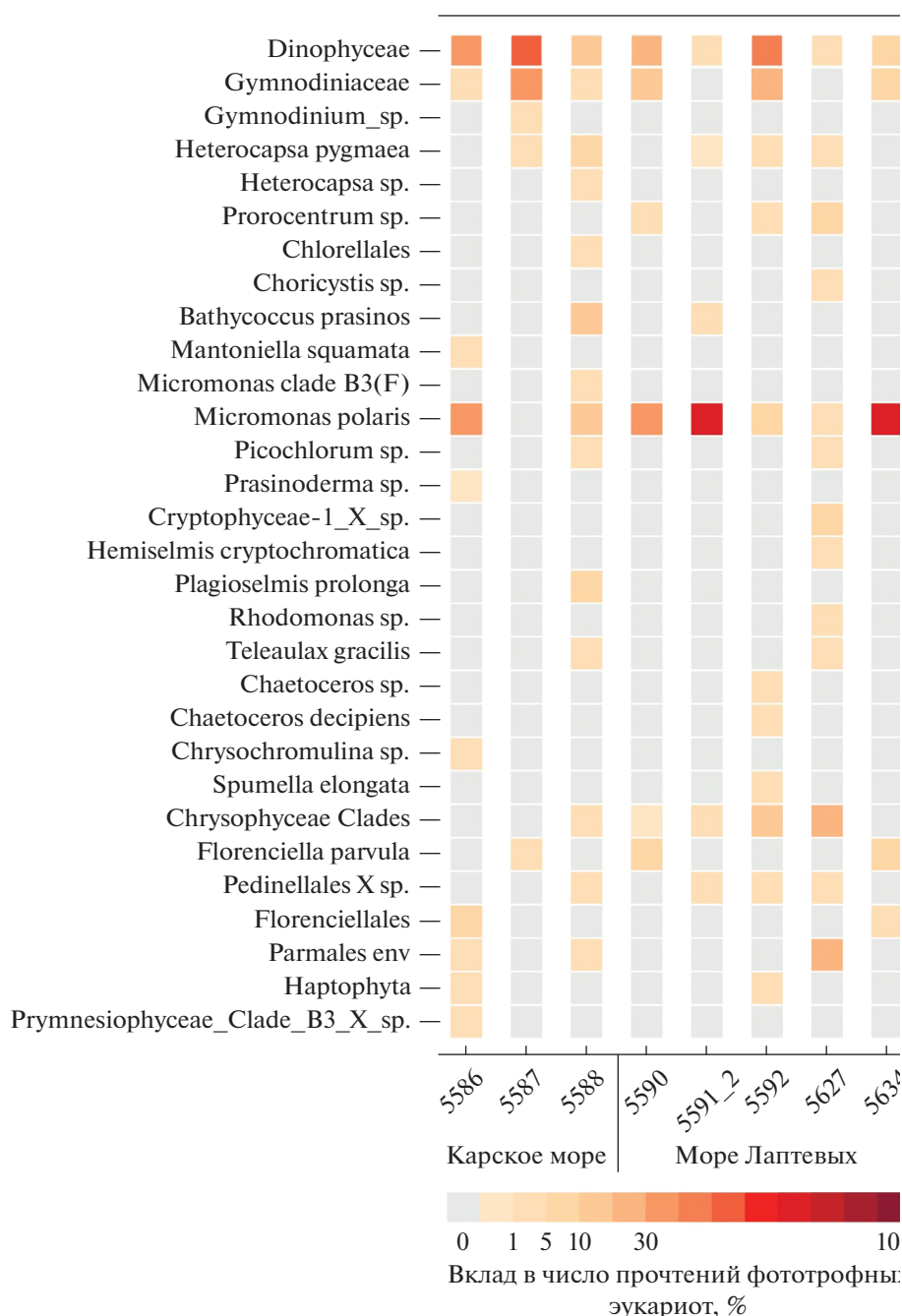


Рис. 4. Основные виды и таксономические группы (вклад >1%) и их относительный вклад в общее число прочтений фототрофных эукариот в пикофракции планктона морей Карского и Лаптевых.

классических, широко распространенных в экологии индексов разнообразия Шеннона и Симпсона, так и довольно специфических, предложенных относительно недавно – $Chao1$, показал, что наиболее разнообразным было сообщество фототрофных эукариот на ст. 5627, расположенной в эстуарии р. Хатанга, в то время как видовой состав пикофракции планктона на самой северной станции 5634, расположенной в море Лаптевых выше 77° с.ш., был наименее богатым (табл. 1).

Анализ структуры сообществ ФЭ, проведенный на основе сходства индекса Брея–Кертиса, выявил две группы станций – I и II (рис. 5). Первая группа (I) включила 3 станции (5588, 5591_2 и 5627), расположенные в устье рек Хатанга и Обь и, следовательно, подверженные влиянию речного стока. Сходство сообществ ФЭ в группе I составило 45%, наибольший вклад вносили *M. polaris* и *H. pygmaea*. Группа II объединила остальные станции, расположенные на шельфе обоих исследуемых

морей. Сходство ФЭ составило 50% и было обусловлено вкладом *Dinophyceae* (22%) – крупной группы, включающей неопределенные до уровня рода/семейства ASVs. Проверка методом ANOSIM показала, что разделение на группы неслучайно, значение *R*-статистики высоко ($R = 0.7$), однако уровень значимости относительно низок и составляет 0.5%. Различие между группами I и II составило 64%.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе охарактеризован таксономический состав фототрофных эукариот во фракции менее 3 мкм осеннего планктона Карского и Лаптевых морей. При использовании фракционной фильтрации в фильтраатах помимо пикоформ регистрируются организмы нано- и микропланктона, что обусловлено разрушением нежных форм даже при самой мягкой фильтрации, прохождением через поры фильтра простейших с эластичной клеточной оболочкой, а также присутствием в воде пула растворенной ДНК организмов разных размерных групп (Vaulot et al., 2008; Sørensen et al., 2013). Хотя фракционная фильтрация не дает полного отделения пикофракции от нано- и микроорганизмов, при метагеномном секвенировании она способствует снижению риска недоучета пикоформ из-за малого числа копий их генов (Zhu et al., 2005).

Гидрофизические и гидрохимические условия в районах исследования подробно описаны в работах Белевич и соавт. (2019а, 2019б, 2021), поэтому в данной работе хотелось бы подчеркнуть только основные моменты. На станции 5627, расположенной в эстуарии р. Хатанга, а также на станциях 5591_2 и 5588, находящихся в районах, прилегающих к эстуариям рек Хатанга и Обь, соленость поверхностного слоя воды составила 3.5, 20 и 22‰ соответственно, концентрация кремния – одного из основных параметров, показывающих речное происхождение вод, превышала 25.5 мкмоль/л. В то же время на остальных исследуемых станциях соленость изменялась от 26 до 32‰, а концентрация кремния варьировала от 0.3 до 12.1 мкмоль/л.

Согласно ранее опубликованным работам, параметры обилия, концентрация хлорофилла “а” пикофитопланктона, а также его вклад в концентрацию общего хлорофилла “а” существенно варьировали по акватории исследованных морей (Белевич и соавт., 2019а, 2019б; Belevich et al., 2021b). Так, в Карском море средние значения биомассы и концентрации хлорофилла “а” ФЭ в фотическом слое составили 2.2 ± 1.75 мг С/м³ и 0.5 ± 0.27 мг/м³ соответственно. В море Лаптевых эти показатели составили по биомассе – 4.1 ± 3.0 мг С/м³, по содержанию хлорофилла “а” – 0.1 ± 0.05 мг/м³. Вклад пикофракции в общий хлоро-

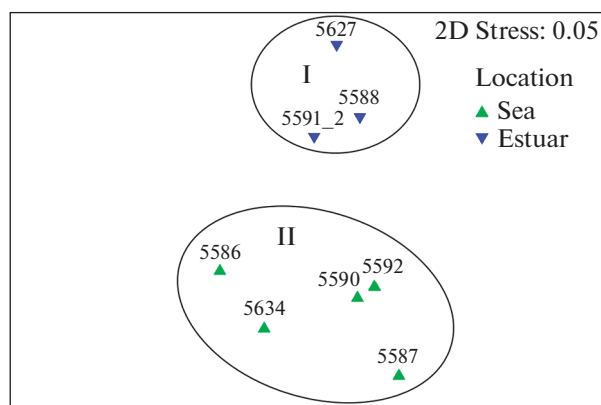


Рис. 5. Ординация методом MDS на основе данных таксономического состава сообществ фототрофных эукариот Карского моря и моря Лаптевых.

филл “а” в Карском море варьировал от 17 до 45%, в море Лаптевых – от 8 до 56%; минимальные значения были приурочены к зонам эстуариев. Полученные оценки биомассы планктонных фотосинтезирующих пикоформ и их вклада в содержание хлорофилла “а” свидетельствуют о существенной роли пикофитопланктона в пелагических сообществах западных частей Карского и Лаптевых морей, тогда как в водах эстуариев Оби и Хатанги вклад пикоформ был невысоким.

Относительно высокая доля последовательностей *Dinophyceae* в пикофракции осеннего планктона согласуется с сезонной сукцессией развития фитопланктона в арктических морях (Makarevich et al., 2012; Суханова и соавт., 2015; Сергеева и соавт., 2020). Метагеномные исследования, проведенные в море Бофорта, показали, что во фракции менее 5 мкм доля последовательностей динофлагеллят достигает 40% (Joli et al., 2018). Ранее показано, что в сентябре 2012 г. в северной части моря Лаптевых *Dinophyceae* составляли около 15% от общего количества прочтений (Metfies et al., 2016). Динофитовые водоросли относят к нано- и микропланктону, на сегодняшний день не обнаружено ни одного представителя фототрофных динофлагеллят с размером клетки менее 3 мкм. В то же время ряд авторов предполагает, что пикодинофлагелляты присутствуют как в океанических, так и в неритических водах, и наиболее вероятно могут относиться к роду *Symbiodinium* (Lajeunesse et al., 2005; Lin et al., 2006), однако в исследуемых пробах представители этого рода не обнаружены.

Как и во многих арктических районах на большинстве исследованных станций выявлен высокий вклад *Chlorophyta* (Kilias et al., 2014; Zhang et al., 2015; Metfies et al., 2016). Наибольшее число прочтений принадлежало *M. polaris*, который относится к арктическим видам, максимальное его обилие выявлено в районах с температурой воды около

0°C. Доминирование *M. polaris* ранее было отмечено в пикофракции летнего планктона моря Бофорта (Balzano et al., 2012), в проливе Фрама его вклад в число последовательностей класса *Mamiellophyceae* достигал 66% (Tragin, Vaultot, 2019).

Относительно высокий вклад *Trebouxiophyceae* выявлен на станциях, расположенных в эстуарии р. Хатанга (ст. 5627), и в районах, примыкающих к эстуариям рек Оби и Хатанги (ст. 5588 и 5691_2). Только на этих станциях присутствовали *Nephroselmidophyceae*, *Chlorodendrophyceae* и *Chlorophyceae*. Представители этих классов относятся как к пресноводным, так и солоноватоводным и морским видам. Учитывая, что на станциях, расположенных на шельфе исследуемых морей, представители этих трех классов водорослей практически отсутствовали, можно предположить, что выявленные филоциты относятся к пресноводным или солоноватоводным видам, и речной сток является основным источником этих водорослей в пикофракции фитопланктона.

Все определенные до рода и вида *Cryptophyceae* относятся к нано- и микроформам. Среди криптофитовых водорослей не известны виды, имеющие размеры клеток <3 мкм, за исключением водоросли *Hillea marina* (Vaultot et al., 2008), однако в генбанке NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) последовательность данного вида отсутствует. Ранее *Cryptophyceae* регистрировались в пикофракции планктона при использовании фракционной фильтрации (Vaultot et al., 2008; Majaneva et al., 2012; Белевич и соавт., 2020). Однако уверенно утверждать, что выявленные ASVs относятся к пикофракции, а также являются фототрофными криптофитовыми водорослями, возможно только после выделения этих таксонов в культуру и их описания. Выявленное высокое обилие криптофитовых водорослей в эстуарии р. Хатанга обусловлено вкладом крупной таксономической группы *Cryptophyceae*-1. Это позволяет предположить, что представители этой группы относятся к пресноводным и/или солоноватоводным формам.

Диатомовые водоросли присутствовали в составе фитопланктона на всех исследованных станциях. Большинство филоцитов были представлены малым количеством прочтений, что подтверждает эффективность использования фракционной фильтрации для клеток с жестким панцирем. Видовой состав пикофракции морских *Bacillariophyta* насчитывает не более 20 видов (Vaultot et al., 2008). Из всех выявленных таксонов *Bacillariophyta* к пикоформам можно отнести представителей рода *Chaetoceros*, который включает виды с размерами клеток <3 мкм, представленные как колоничальными формами, так и видами с одиночными клетками. Это дает основание полагать, что обнаруженные в планктоне морей Российской Арктики виды этого рода могут быть представлены в

пикофракции отдельными клетками. Например, присутствие колоний *Chaetoceros socialis* нано- и микро размеров неоднократно регистрировалось в планктоне Карского моря и моря Лаптевых, что может быть обусловлено наличием в пикофракции отдельных клеток этой водоросли. К пикоцитомеям можно отнести *S. marinoi*, минимальные размеры отдельных клеток которой соответствуют пикофракции, последовательности этой водоросли выявлены на трех из семи исследуемых станциях. Ранее *S. marinoi* уже была зарегистрирована в пикофракции планктона северо-западной части Карского моря (Белевич и соавт., 2020), в то время как для моря Лаптевых этот вид определен впервые.

Среди *Bolidophyceae* в составе пикофракции планктона доминировали представители порядка *Parmales*. Метагеномный анализ мелкоклеточной (<5 мкм) фракции природных сообществ водорослей в разных районах Мирового океана выявил значительное число филоцитов *Bolidophyceae* (Kiliyas et al., 2014; Ichinomiya et al., 2016), при этом большинство из них не было идентифицировано до уровня рода и даже порядка (за исключением числа описанных (культивируемых) организмов этого класса. Сведения о составе *Bolidophyceae* морей российской Арктики до настоящего времени было ограничено одной пробой, отобранной в северо-западной части Карского моря, которая показала присутствие в пикофракции фитопланктона *Triparma strigata* (Белевич и соавт., 2020). Последовательности *T. pacifica* и клады *T. laevis* впервые выявлены в Карском море. В море Лаптевых эти виды не обнаружены, все последовательности болидофитовых водорослей относились к различным некультивируемым кладам порядка *Parmales*, максимальное обилие которых было приурочено к эстуарию р. Хатанга.

Проведенное исследование позволило оценить таксономический состав ФЭ пикоразмера в море Лаптевых и дополнить ранее полученные данные по видовому разнообразию самой мелкой фракции планктона Карского моря. Метагеномный анализ проб, отобранных в Карском море и профильтрованных через фильтр с диаметром пор 3 мкм, выявил представителей 13 классов водорослей, относящихся к 38 родам, в море Лаптевых разнообразие было выше — обнаружено 15 классов и 48 родов водорослей. В связи с методическими трудностями, связанными с фракционированием, в составе сообществ присутствовали как пикопланктонные формы, так и виды, клеточные размеры которых относятся к нано- и микрофракциям. В то же время нельзя исключать, что крупные фототрофные таксономические группы, определенные, например, на уровне семейств или отрядов, могут включать в себя пока еще не описанные организмы пикоразмера. Таким образом, включение таких групп в анализ оправданно.

Состав исследуемых сообществ определялся гидрологическими условиями районов расположения станций. На станциях, расположенных в верхней части эстуария р. Хатанга, а также в прилегающих к эстуариям районах обоих морей, видовое разнообразие было шире за счет присутствия солоноватоводных и пресноводных форм водорослей. Число таксонов на самой северной станции (море Лаптевых) было наименьшим. В целом видовой состав пикофракции фитопланктона шельфовых районов обоих морей был сходен и соответствовал выявленному для других арктических районов. Полученные данные охватывают осенний период и только западные части обоих морей. Для планктонных пикоавтотрофов характерна выраженная пространственно-временная изменчивость состава и обилия (Worden 2006; Majaneva et al., 2012; Terrado et al., 2013; Kiliyas et al., 2013). Для полной оценки таксономического состава ФЭ необходимы исследования с применением метагеномного подхода в другие сезоны и в других районах морей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках тем государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова часть 2 (тема № 121032300135-7 и АААА-А17-117120540067-0) и Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды” при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-05-00026).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белевич Т.А., Ильяш Л.В., Арашкевич Е.Г., Флинт М.В. Пикофитопланктон моря Лаптевых в осенний период // ДАН. 2019а. Т. 48. № 5. С. 619–623.
- Белевич Т.А., Ильяш Л.В., Демидов А.Б., Флинт М.В. Распределение пикофитопланктона на Обском разрезе и в западной части Карского моря // Океанология. 2019б. Т. 59. С. 964–973.
- Belevich T.A., Ilyash L.V., Demidov A.B., Flint M.V. Pico-phytoplankton distribution at the Ob River section and in the western part of the Kara Sea // Oceanology. 2019. V. 59. P. 871–880.
- Белевич Т.А., Милютин И.А., Троицкий А.В., Флинт М.В. Пикофитопланктон залива Благополучия (Архипелаг Новая Земля) и прилегающего района Карского моря // Океанология. 2020. Т. 60. С. 545–555.
- Belevich T.A., Milyutina I.A., Troitsky A.V., Flint M.V. Pico-phytoplankton in Blagopoluchia bay (Novaya Zemlya Archipelago) and adjacent part of the Kara Sea // Oceanology. 2020. V. 60. P. 473–482.
- Сергеева В.М., Суханова И.Н., Флинт М.В., Полухин А.А., Кременецкий В.В., Федоров А.В., Сахарова Е.Г., Георгиева Е.Ю., Ланге Е.К., Шука С.А. Фитопланктон желоба Св. Анны: влияние абиотических факторов // Океанология. 2020. Т. 60. С. 528–544.
- Sergeeva V.M., Sukhanova I.N., Flint M.V., Poluhin A.A., Kremenetskiy V.V., Fedorov A.V., Lange E.K., Shchuka S.A., Sakharova E.G., Georgieva E.U. Phytoplankton of the St. Anna Trough: influence of abiotic factors // Oceanology. 2020. V. 60. P. 458–472.
- Суханова И.Н., Флинт М.В., Мошаров С.А., Сергеева В.М. Структура сообществ фитопланктона и первичная продукция в Обском эстуарии и на прилежащем Карском шельфе // Океанология. 2010. Т. 50. № 5. С. 785–800.
- Sukhanova I.N., Flint M.V., Mosharov S.A., Sergeeva V.M. Structure of the phytoplankton communities and primary production in the Ob River estuary and over the adjacent Kara Sea Shelf // Oceanology. 2010. V. 50. P. 743–758.
- Суханова И.Н., Флинт М.В., Сергеева В.М. Фитопланктон поверхностной опресненной линзы Карского моря // Океанология. 2012. Т. 52. № 5. С. 688–699.
- Sukhanova I.N., Flint M.V., Sergeeva V.M. Phytoplankton of the surface desalted lens of the Kara Sea // Oceanology. 2012. V. 52. P. 635–645.
- Суханова И.Н., Флинт М.В., Дружкова Е.И., Сажин А.Ф., Сергеева В.М. Фитопланктон северо-западной части Карского моря // Океанология. 2015. Т. 55. С. 605–619.
- Sukhanova I.N., Flint M.V., Sazhin A.F., Sergeeva V.M., Druzhkova E.I. Phytoplankton in the northwestern Kara Sea // Oceanology. 2015. V. 55. P. 547–560.
- Суханова И.Н., Флинт М.В., Фёдоров А.В., Сахарова Е.Г., Артемьев В.А., Маккавеев П.Н., Недоспасов А.А. Фитопланктон Хатангского залива, шельфа и континентального склона западной части моря Лаптевых // Океанология. 2019. Т. 59. С. 724–733.
- Sukhanova I.N., Flint M.V., Artemyev V.A., Makkaveev P.N., Nedospasov A.A., Fedorov A.V., Sakharova E.G. Phytoplankton of the Khatanga Bay, shelf and continental slope of the western Laptev Sea // Oceanology. 2019. V. 59. P. 648–657.
- Balzano S., Marie D., Gourvil P., Vaulot D. Composition of the summer photosynthetic pico and nanoplankton communities in the Beaufort Sea assessed by T-RFLP and sequences of the 18S rRNA gene from flow cytometry sorted samples // ISME J. 2012. V. 6. P. 1480–1498.
- Belevich T.A., Milyutina I.A., Abyzova G.A., Troitsky A.V. The pico-sized *Mamiellophyceae* and a novel *Bathycoccus* clade from the summer plankton of Russian Arctic Seas and adjacent waters // FEMS Microbiol. Ecol. 2021a. V. 97. Art. fiae251.
- Belevich T.A., Demidov A.B., Makkaveev P.N., Shchuka S.A., Flint M.V. Picophytoplankton distribution along Khatanga Bay-shelf-continental slope environment gradients in the western Laptev Sea // Heliyon. 2021b. V. 7. e06224. P. 1–9.
- Belevich T.A., Ilyash L.V., Milyutina I.A., Logacheva M.D., Goryunov D.V., Troitsky A.V. Photosynthetic picoeukaryotes

- in the land-fast ice of the White Sea, Russia // *Microb. Ecol.* 2018. V. 75. P. 582–597.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., McMurdie P.J., Holmes S.P. Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses [version 2; peer review: 3 approved] F1000Research. 2016. 5. P. 1492–1541.
- Clarke K.R., Gorley R.N. PRIMER v6.: User Manual/Tutorial. PRIMER-E. Plymouth, 2006. 192 p.
- Demidov A.B., Sukhanova I.N., Belevich T.A., Flint M.V., Gagarin V.I., Sergeeva V.M., Ereemeeva E.V., Fedorov A.V. Size-fractionated surface phytoplankton in the Kara and Laptev seas: environmental control and spatial variability // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 2021. V. 664. P. 59–77.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontol. Electron.* V. 4. Art. 4. P. 1–9.
- Gordeev V.V., Martin J.M., Sidorov I.S., Sidorova M.V. A reassessment of the Eurasian river input of water, sediment, major elements, and nutrients to the Arctic Ocean // *Amer. J. Sci.* 1996. V. 296. P. 664–691.
- Ichinomiya M., Lopes dos Santos A., Gourvil P., Yoshikawa S., Kamiya M., Ohki K., Audic S., de Vargas C., Noel M.-H., Vaultot D., Kuwata A. Diversity and oceanic distribution of the Parmales (Bolidophyceae), a picoplanktonic group closely related to diatoms // *ISME J.* 2016. V. 10. P. 2419–2434.
- Joli N., Gosselin M., Ardyna M., Babin M., Onda D.F., Tremblay J.-É., Lovejoy C. Need for focus on microbial species following ice melt and changing freshwater regimes in a Janus Arctic Gateway // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. Art. 9405.
- Kilias E., Wolf C., Nöthig E.-M., Peeken I., Metfies K. Protist distribution in the western Fram Strait in summer 2010 based on 454-pyrosequencing of 18S rDNA // *J. Phycol.* 2013. V. 49. P. 996–1010.
- Kilias E.S., Nöthig E.-M., Wolf C., Metfies K. Picoeukaryote plankton composition of West Spitsbergen at the entrance to the Arctic Ocean // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2014. V. 61. P. 569–579.
- Kirkham A.R., Lepère C., Jardillier L.E., Not F., Bouman H., Mead A., Scanlan D.J. A global perspective on marine photosynthetic picoeukaryote community structure // *ISME J.* 2013. V. 7. P. 922–936.
- LaJeunesse T.C., Lambert G., Anderson R.A., Coffroth M.A., Galbraith D. W. *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates // *J. Phycol.* 2005. V. 41. P. 880–886.
- Lin S., Zhang H., Hou Y., Miranda L., Bhattacharya D. Development of a dinoflagellate-oriented PCR primer set leads to detection of picoplanktonic dinoflagellates from Long Island sound // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 5626–5630.
- Majaneva M., Rintala J.M., Piisila M., Fewer D.P., Blomster J. Comparison of wintertime eukaryotic community from sea ice and open water in the Baltic Sea, based on sequencing of the 18S rRNA gene // *Polar Biol.* 2012. V. 35. P. 875–889.
- Makarevich P., Druzhkova E., Larionov V. Primary producers of the Barents Sea, diversity of ecosystems // *Diversity of Ecosystems* / Ed. Prof. Mahamane Ali. InTech, 2012. P. 367–392.
- Metfies K., von Appen W.-J., Kilias E., Nicolaus A., Nöthig E.-M. Biogeography and photosynthetic biomass of Arctic marine pico-eukaryotes during summer of the record sea ice minimum 2012 // *PLoS One.* 2016. V. 11. e0148512. P. 1–20.
- Moon-van der Staay S.Y., De Wachter R., Vaultot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity // *Nature.* 2001. V. 409. P. 607–610.
- Sørensen N., Daugbjerg N., Richardson K. Choice of pore size can introduce artefacts when filtering Picoeukaryotes for molecular biodiversity studies // *Microb. Ecol.* 2013. V. 65. P. 964–968.
- Stain R. Circum Arctic river discharge and its geological record // *Int. J. Earth Sci.* 2000. V. 89. P. 447–449.
- Terrado R., Scarcella K., Thaler M., Vincent W.F., Lovejoy C. Small phytoplankton in Arctic seas: vulnerability to climate change // *Biodiversity.* 2013. V. 14. P. 2–18.
- Tragin M., Vaultot D. Novel diversity within marine *Mamielophyceae* (Chlorophyta) unveiled by metabarcoding // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 5190.
- Tremblay G., Belzile C., Gosselin M., Poulin M., Roy S., Tremblay J.-É. Late summer phytoplankton distribution along a 3500 km transect in Canadian Arctic waters: strong numerical dominance by picoeukaryotes // *Aquat. Microb. Ecol.* 2009. V. 54. P. 55–70.
- Vaultot D., Eikrem W., Viprey M., Moreau H. The diversity of small eukaryotic phytoplankton ($\leq 3 \mu\text{m}$) in marine ecosystems // *FEMS Microb. Rev.* 2008. V. 32. P. 795–820.
- Worden A.Z. Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean // *Aquat. Microb. Ecol.* 2006. V. 43. P. 165–175.
- Zhang F., He J., Lin L., Jin H. Dominance of picophytoplankton in the newly open surface water of the central Arctic Ocean // *Polar Biol.* 2015. V. 38. P. 1081–1089.
- Zhu F., Massana R., Not F., Marie D., Vaultot D. Mapping of picoeukaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 52. P. 79–92.

Species Diversity of Phototrophic Picoplankton in the Kara and Laptev Seas

T. A. Belevich^{1, 2, *} and I. A. Milyutina²

¹ Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

*e-mail: belevich@mail.bio.msu.ru

Received August 12, 2021; revised August 30, 2021; accepted August 31, 2021

Abstract—Species diversity of phototrophic eukaryotes (PE) with cell size $< 3 \mu\text{m}$ in autumn phytoplankton of the Kara and Laptev seas was studied. High-throughput sequencing of the 18S rRNA gene V4 region re-

vealed 15 classes of algae in the plankton picofraction, which belonged to five divisions: *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Chlorophyta*, *Ochrophyta*, and *Dinoflagellata*. *Dinoflagellata* and green algae of the class *Mamiellophyceae* were the main contributors to total PE sequences. *Chlorophyta* was the most diverse section, represented by seven classes: *Mamiellophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Nephroselmidophyceae*, *Palmophyllophyceae*, *Pyramimonadophyceae*, *Chlorodendrophyceae*, and *Chlorophyceae*. *Bolidophyceae* species *Triparma strigata* and *T. laevis*, as well as the diatom *Skeletonema marinoi*, were first identified in the Kara and Laptev seas, respectively. The hydrological conditions on the stations determined the PE taxonomic composition. The diversity indices were higher at the stations located in the upper estuary of river Khatanga and at the areas of both seas adjacent to the Khatanga and Ob estuaries than at the northernmost Laptev Sea station. The obtained data showed that the taxonomic composition of the smallest phytoplankton fraction of the two shelf seas of the Russian Arctic was similar to that found in other Arctic regions.

Keywords: picophytoplankton, phototrophic eukaryotes, species composition, metabarcoding, the Kara Sea, the Laptev Sea

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ ПРИКРЕПЛЕННЫХ СООБЩЕСТВ ХОЛОДНОГО ВЫСОКОСУЛЬФИДНОГО ВОДОЕМА ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

© 2022 г. М. Ю. Горбунов^а, *, Ю. А. Хлопко^б, В. Я. Катаев^б, М. В. Уманская^а

^аСамарский федеральный исследовательский центр РАН,
Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, 445003 Россия

^бИнститут клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, 460000 Россия

*e-mail: tuigor1960@gmail.com

Поступила в редакцию 19.08.2021 г.

После доработки 29.09.2021 г.

Принята к публикации 30.09.2021 г.

С помощью высокопроизводительного секвенирования переменных участков V3–V4 гена 16S рРНК исследовано разнообразие бактерий в прикрепленных сообществах анаэробной части ветланда Солодовка (Самарская обл., Россия), питающегося холодными карстовыми родниками с высоким содержанием сульфидов (>3 мМ). Полученные последовательности были сгруппированы в 370 операционных таксономических единиц (ОТЕ); в отдельных матах и обрастаниях количество ОТЕ варьировало в широких пределах, от 52 до 277; таксономическое разнообразие зависело от типа мата, температуры и концентрации сульфидов. Наибольшее разнообразие обнаружено в типичных мягких цианобактериальных матах; состав бактерий в жестких пленочных и пористых микробиолитах был беднее. Основу всех исследованных сообществ образуют фототрофные организмы. В составе матов преобладали цианобактерии, которым сопутствовали *Chloroflexales*, составляющие 7–13% общего числа последовательностей. Жесткие обрастания и мат, развивающийся при наибольшей концентрации сульфидов, характеризуются низкой представленностью этих таксонов, но высокой долей фототрофных протеобактерий и *Chlorobiaceae*. В нефототрофной части сообществ преобладали бактерии цикла серы, *Desulfobacterota* и *Campylobacterota*. Организмы с броидильным метаболизмом и факультативные хемолитотрофы представлены большим количеством ОТЕ, но минорны по численности; последовательности широко распространенных в аэробных водных экосистемах бактерий филумов *Actinobacteria* и *Acidobacteria* вообще не обнаружены. В целом, состав хемотрофных компонентов исследованных сообществ был близок таковому прикрепленных сообществ из пещерных водотоков и сообществ различных подземных водоносных горизонтов. Фототрофная часть сообществ формируется относительно независимо от хемотрофной части с участием окружающей поверхностной микробиоты. Последовательности, наиболее сходные с некоторыми из массовых ОТЕ, обнаруженных в ветланде, были выделены из зон хемоклина стратифицированных, в т.ч. меромиктических, озер.

Ключевые слова: сульфидные источники, прикрепленные микробные сообщества, биоразнообразие, таксономический состав, 16S рРНК метабаркодинг

DOI: 10.31857/S0026365622010049

Микробные маты являются одним из древнейших типов микробных сообществ (Hickman-Lewis et al., 2018). Появившись еще в архее, они продолжают существовать в самых различных современных природных биомах. Вероятно, существует единственное, но очень существенное в сегодняшних условиях, ограничение распространения матов: они очень неустойчивы к выеданию беспозвоночными и биотурбации (Farmer, 1992; Заварзин, 2004) и поэтому ограничены в своем распростра-

нении местообитаниями, в которых развитие Metazoa невозможно или сильно затруднено.

Ключевым признаком матов является их выраженная вертикальная гетерогенность. Сообщества матов – это “спрессованные” в интервал нескольких миллиметров или сантиметров градиентные ассоциации микроорганизмов, осуществляющие широкий спектр трансформаций разнообразных метаболических субстратов, как поступающих извне, так и синтезируемых другими организмами матов (Mendes Monteiro et al., 2020). Высокая

сложность микробных, зачастую исключительно прокариотических, сообществ, а также их длительная геологическая история, позволяющая считать их аналогами древнейших экосистем, объясняют высокий исследовательский интерес к сообществам существующего сегодня многообразия микробных матов. Исторически, первыми были исследованы микробные маты экстремальных местообитаний — термальных водотоков вулканического происхождения в кальдере Йеллоустоун в США (Brock, 1969; Pierson, Castenholz, 1974) и на Камчатке в России (Orleanskiy et al., 1984), а также гиперсолевых лагун (Semikhatov et al., 1979; Javor, Castenholz, 1981).

Наряду с высокой температурой и высоким содержанием солей, фактором, ограничивающим развитие Metazoa и тем самым благоприятствующим формированию матов, является аноксия и присутствие токсичных для большинства эукариот восстановленных неорганических соединений, в первую очередь, сульфидов. Маты, развивающиеся в таких условиях, могут в определенной мере служить аналогами сообществ, существовавших на начальных этапах развития земной биосферы (архея и протерозоя), а также, возможно, сообществам внеземной жизни. В современных экосистемах они встречаются в источниках вулканического происхождения, а также во многих напорных карстовых источниках из глубоких водоносных горизонтов, в которых воды контактируют с глубоко залегающими осадочными породами, содержащими сульфаты и органические соединения (нефти, битумы, кероген и др.). В результате биогеохимической активности подземной микрофлоры, а также термохимических процессов в этих водоносных слоях накапливаются значительные концентрации сульфидов (Machel, 2001).

В отличие от термальных вод тектонического происхождения, источники карстового происхождения обычно имеют умеренную или низкую температуру. В образованных ими водотоках практически всегда развиваются цианобактериальные маты, а в тех случаях, когда такие воды изливаются в пещерах, в отсутствие света — специфические микробные сообщества, лишенные фототрофных компонентов и существующие исключительно за счет хемоавтотрофных биогеохимических процессов (Engel et al., 2004).

В Европейской части России микробные маты карстовых источников почти не исследованы, хотя имеются многочисленные естественные сульфидсодержащие источники, в частности, в Среднем Поволжье, на территории Соко-Шешминского поднятия (Дедков, 2001). Планктонные сообщества водных объектов, образованных этими источниками, крайне бедны и немногочисленны, мезо- и зоопланктон и зообентос в их анаэробной зоне почти полностью отсутствует, и основные про-

цессы накопления и трансформации вещества и энергии происходят в микробных матах (Протисты и бактерии ..., 2009).

Несмотря на имеющиеся метагеномные данные о хемоклинных сообществах высокосульфидных минерализованных водоемов Европейской части России (например, Savvichev et al., 2020), подобные данные о филогенетическом разнообразии микробных матов этого региона, насколько нам известно, отсутствовали. Поэтому целью нашей работы было изучение филогенетического разнообразия прикрепленных микробных сообществ в ветланде Солодовка (Самарская область) методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Район исследования. Водно-болотный комплекс (ветланд) Солодовка (53°51'36" с.ш., 51°41'06" в.д.) расположен в Исаклинском районе Самарской области, в правобережной пойме реки Сургут в ее среднем течении. В целом, он представляет собой заболоченный участок с преимущественно луговой растительностью с комплексом сероводородных водотоков и бассейнов, ограниченный с севера склоном возвышенности, а с юга — руслом р. Сургут (рис. 1). Водоемы окружены поясами гелофитной растительности, состоящей, в основном, из тростника *Phragmites australis* и камыша озерного *Schoenoplectus lacustris*, а также древесным редколесьем из ольхи. В настоящее время минерализованная сероводородная вода поступает в Солодовку главным образом из двух крупных источников (№ I и II на рис. 1). Из этих источников, а также двух-трех других небольших родников, вытекают ручьи, которые образуют два озеровидных бассейна, иногда обозначаемых, соответственно, как озера Солодовка и Ярмохино. Глубина водоемов и водотоков у источников составляет 0.25–0.3 м, по мере удаления от источников глубина бассейна I увеличивается и может достигать 1 м. Донные отложения водоемов представляют собой мощные (не менее полуметра глубиной) черные илы с сильно восстановительными условиями, покрытые в мелководной части цианобактериальными матами.

Отбор проб и методы анализа факторов среды. Пробы микробных матов были отобраны в сентябре 2020 г. из шести точек ветланда с анаэробными условиями и содержанием сульфидов более 10 мг/л (рис. 1, табл. 1). Проба 2-0 была соскоблена стерильным шпателем с камня в источнике II в 200 мкл воды из источника; полученная суспензия была перенесена в стерильную пробирку, содержащую 0.5 мл консервирующего раствора DNA/RNA Shield ("Zymo Research", США) и лизирующий матрикс. Остальные пробы массой 0.1–0.25 г отбирали обожженными в пламени

стальными высечками, взвешивали в стерильной чашке Петри и переносили в такие же пробирки. Одновременно с отбором проб портативными приборами были определены основные физико-химические показатели и отобраны пробы воды. Состав воды определяли, как описано ранее (Горбунов, 2019).

Выделение ДНК и высокопроизводительное секвенирование. Пробы с консервантом и лизирующим матриксом гомогенизировали на приборе TissueLyser LT (“Qiagen”, Германия) 10 мин, при 50 Гц. Из полученного лизата выделяли тотальную ДНК фенол-хлороформным методом, как описано ранее (Селиванова и соавт., 2018). Качество выделенной ДНК проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и спектрофотометра NanoDrop 8000 (“Thermo Fisher”, США).

Для амплификации варибельного участка V3–V4 гена 16S рРНК использовали праймеры S-D-Bact-0341-b-S-17 и S-D-Bact-0785-a-A-21 (Селиванова и соавт., 2018). ДНК-библиотеки были созданы в соответствии с двустадийным протоколом Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev.B). Концентрацию ДНК в полученных библиотеках измеряли на флуориметре Qubit 4.0 (“Invitrogen”, США) с набором dsDNA HS Assay Kit. Секвенирование библиотек проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit V3 2x300 bp (“Illumina”, США) в Центре коллективного пользования научным оборудованием “Персистенция микроорганизмов” Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН. Полученные последовательности депонировали в NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номерами SRR14655875–SRR14655880.

Биоинформатический анализ. Контроль качества полученных последовательностей Illumina был проведен с помощью программы FastQC (v. 0.11.7) (Wingett, Andrews, 2018). Объединение

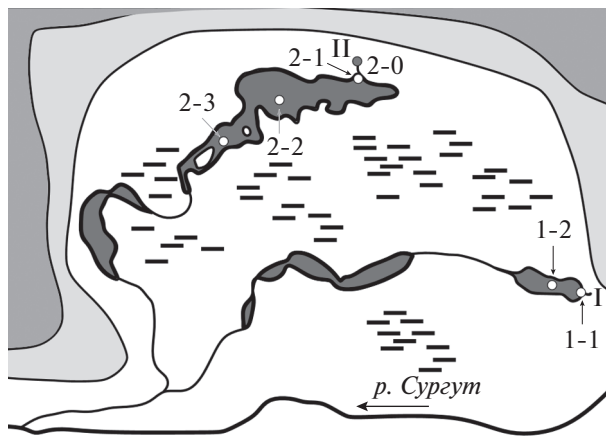


Рис. 1. Схема ветланда Солодовка и расположение мест отбора проб бактериальных матов. Римские цифры — источники-родники, арабские цифры — места отбора проб матов, горизонтальная штриховка — заболоченные участки с зарослями гелофитов.

парных последовательностей проводили с использованием программы PEAR (v. 0.9.10) (Zang et al., 2014) с параметрами: перекрытие ≥ 40 нукл. и $p \leq 0.0001$. Удаление адаптеров Illumina было выполнено в программе Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). Для фильтрации объединенных последовательностей использовали пакет Usearch v. 10.0.240 (Edgar, 2013) с параметрами -fastq_filter -minlen 420 -maxee 1.0. Дерепликация (определение уникальных последовательностей) была выполнена при помощи пакета Usearch. Полученные уникальные последовательности были кластеризованы на уровне 97% (алгоритм UPARSE пакета Usearch, параметр -cluster_OTUs). Химерные последовательности были удалены с использованием алгоритма UCHIME2 (Edgar, 2016).

Таксономическую принадлежность ОТЕ определяли с помощью элайнера SINA v1.2.11 (Pruesse et al., 2012) с использованием базы данных SILVA

Таблица 1. Характеристика отобранных проб и физико-химические условия

Проба	Расположение	Электропроводность	$T, ^\circ\text{C}$	pH	Eh	$\text{S}^{2-}, \text{мг л}^{-1}$	$\text{O}_2, \text{мг л}^{-1}$	Описание
2-0	Источник 2	2.07	6.5	6.74	-317	178.7	0	Жесткая пленка на камне в источнике
2-1	Ручей из источника 2	2.09	11.2	6.74	-315	165.0	0	Слизистый мат
2-2	Центр бассейна 2	2.08	16.3	7.07	-315	27.5	0.6	Слизистый мат
2-3	Дальняя от источника точка бассейна 2	2.05	16.6	7.27	-275	11.6	0.11	Слизистый мат
1-1	Ручей из источника 1	1.85	9.2	6.9	-290	44.6	0	Пористая травертиновая подушка
1-2	Водоток 1	1.90	11.5	6.9	-290	36.3	0	Слизистый мат

Таблица 2. Показатели разнообразия проб (по всем ОТЕ, включая синглеты и дублеты)

Проба	Количество прочтений	Количество ОТЕ (N)	Chao1	N/Chao1	Оценка N по логнорм. распределению	Индексы разнообразия		
						Шеннона	Пиелюу	Симпсона
2-0	25820	53	75.8	0.712	–	1.48	0.259	0.413
2-1	28661	311	328.5	0.956	318.6	5.82	0.703	0.942
2-2	19762	278	302.6	0.929	312.0	4.98	0.614	0.920
2-3	20988	277	320	0.875	323.5	4.80	0.591	0.886
1-1	23425	150	179.1	0.854	211.1	2.84	0.394	0.740
1-2	23885	177	206.4	0.877	229.7	3.30	0.442	0.807
Всего		370	370	1	358.7	5.12	0.600	0.923

SSU v. 138.1 (Quast et al., 2013). Для уточнения классификации и поиска природных последовательностей из различных местообитаний, близких к выделенным ОТЕ, кроме того, использовали алгоритм BLAST на платформе NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Филогенетические деревья были построены с использованием программы MEGA X (Kumar et al., 2018) с использованием референтных последовательностей 16S рПНК, полученных из базы данных NCBI. Матрицы расстояний рассчитывались в соответствии с двухпараметрической моделью Кимуры. Бутстреп-анализ полученных кладограмм был проведен на основе 1000 повторов.

Последовательности двадцати доминирующих филотипов депонированы в GenBank под номерами ОК166950–166969.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика отобранных проб

Большую часть дна покрывают слизистые маты, толщиной 3–6 мм, серовато-зеленого цвета на поверхности. Оттенки матов меняются от почти черного до зеленоватого и оливкового (пробы 2-3, 2-2, 1-2). Иногда мат имеет пурпурный нижний подслон и вкрапления пурпурных пятен на поверхности (проба 2-1). На камнях в устье источника 2 обнаруживаются жесткие пленочные обрастания от белого до оливково-зеленого цвета, толщиной менее 1 мм, с повышенным содержанием карбоната кальция (проба 2-0). По руслу ручья из источника 1, кроме слизистых матов, встречаются “жесткие” маты с высоким содержанием нерастворимого карбоната кальция (“травертиновая подушка”, проба 1-1).

В сентябре 2020 г. температура воды в источниках составляла 6.5–7.0°C, в проточных участках – 11–11.5°C, а в застойных зонах вода прогре-

валась до 16.6°C (табл. 1); pH воды был близок к нейтральному. Вода в ветланде сильноминерализованная (электропроводность 1.79–2.09 мСм/см), с преобладанием ионов сульфата и кальция и высоким содержанием сульфидов (11–179 мг/л). Жесткость воды на первом участке ветланда (пробы 1-1 и 1-2) изменялась в пределах 20–23 мэкв/л, а на втором (остальные пробы) – 23–26 мэкв/л. Растворенный кислород отсутствовал в воде источников и вытекающих из них ручьев, но в озеровидных расширениях обнаруживался в следовых концентрациях, не превышавших 0.6 мг/л. Несмотря на наличие следов кислорода, Eh на всех участках ветланда (от –275 до –315 мВ против хлорсеребряного электрода) соответствовал сильно восстановительным условиям (табл. 1).

Показатели разнообразия бактерий в микробных матах

После биоинформатической обработки метагеномных данных вся совокупность полученных последовательностей была классифицирована на отдельные операционные таксономические единицы, ОТЕ. Общее количество сформированных ОТЕ составило 370 (табл. 2).

Потенциальное “полное” количество ОТЕ в библиотеках оценивали двумя способами: по индексу Chao1 и по величине интеграла логнормального распределения, построенного по данным октавного анализа. Оба подхода дали близкие оценки. Только в пробе 2-0 не удалось получить логнормальную оценку, т. к. распределение ОТЕ по логарифму численностей не имело максимума.

Полученные оценки (табл. 2) показывают, что общее количество ОТЕ в библиотеке исследованных проб было близко к реально полученному, и увеличение количества прочтений, видимо, не приведет к обнаружению новых ОТЕ. В то же вре-

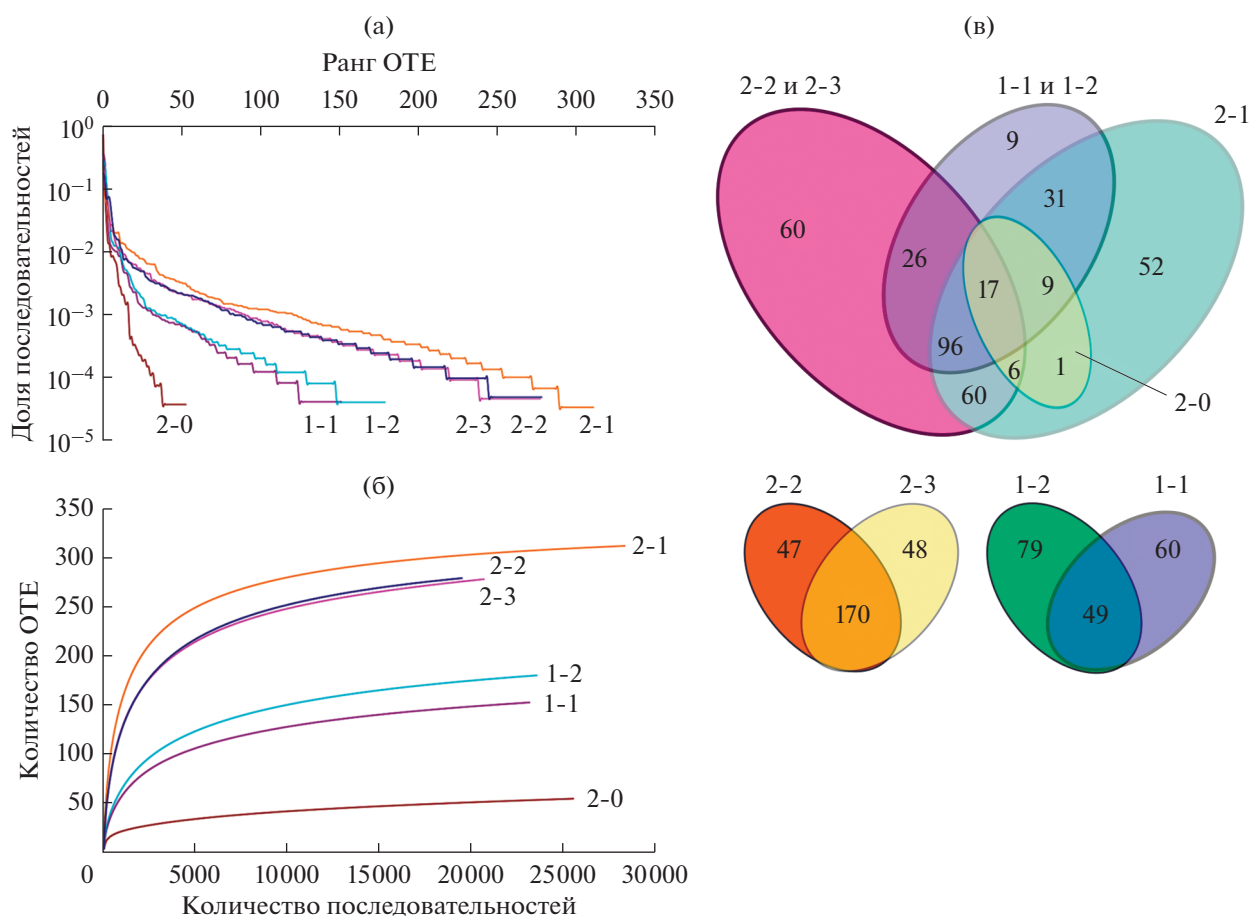


Рис. 2. Кривые доминирования-разнообразия (а) и альфа-разнообразия (б) в библиотеках гена 16S рРНК отдельных проб и в объединенной библиотеке. Распределение общих и уникальных ОТЕ (в) в библиотеках из разных местообитаний (диаграммы Венна).

мя, в каждой из индивидуальных проб может оказаться недоучтенным от 15 до 45 ОТЕ, или от 5 до 30% их общего количества. Поскольку все они минорны, они не могут оказать существенного влияния на анализ функционирования сообществ.

Наибольшее количество ОТЕ, максимально возможное видовое богатство и наименее выраженное доминирование (табл. 2, рис. 2а, 2б) зарегистрировано в образце мата из ручья, вытекающего из второго источника (проба 2-1). В матах из второго бассейна эти показатели таксономического богатства незначительно снижались. В пробах из первого водотока, с менее минерализованной водой (табл. 1), разнообразие сообществ было заметно ниже; соответственно, было снижено и количество ОТЕ. Это не связано с недоучетом при секвенировании, т.к. оценки таксономического богатства по индексу *Chao1* и прогнозируемому логнормальному распределению также дают пониженные результаты (табл. 2). Минимальное количество ОТЕ обнаружено в пленочном обрастании из 2 источника (проба 2-0), при этом

для него характерно минимальное видовое богатство и максимально выраженное доминирование (рис. 2а). В отличие от остальных проб, все ОТЕ, обнаруженные в этом обрастании, присутствуют хотя бы в одной из остальных проб (рис. 2в).

Таксономический состав бактериального сообщества

Полученные ОТЕ принадлежали к 19 филумам (*Armatimonadota*, *Bacteroidetes*, *Bdellovibrionota*, *Caldisericota*, *Campylobacterota*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Desulfobacterota*, *Elusimicrobiota*, *Firmicutes*, *Fusobacteriota*, *Ca. Kapabacteria*, LCP-89, *Modulibacteria*, *Planctomycetota*, *Proteobacteria*, *Spirochaetota*, *Verrucomicrobiota*) и суперфилуму *Patescibacteria* (Candidate Phyla Radiation, CPR). 25 ОТЕ остались неклассифицированными; суммарная доля их последовательностей в отдельных пробах составляла от 3 до 9,4%.

Наиболее представленным филумом в исследованных пробах является *Bacteroidetes* (81 ОТЕ); за ним следуют *Patescibacteria* (50 ОТЕ) и *Proteobacte-*

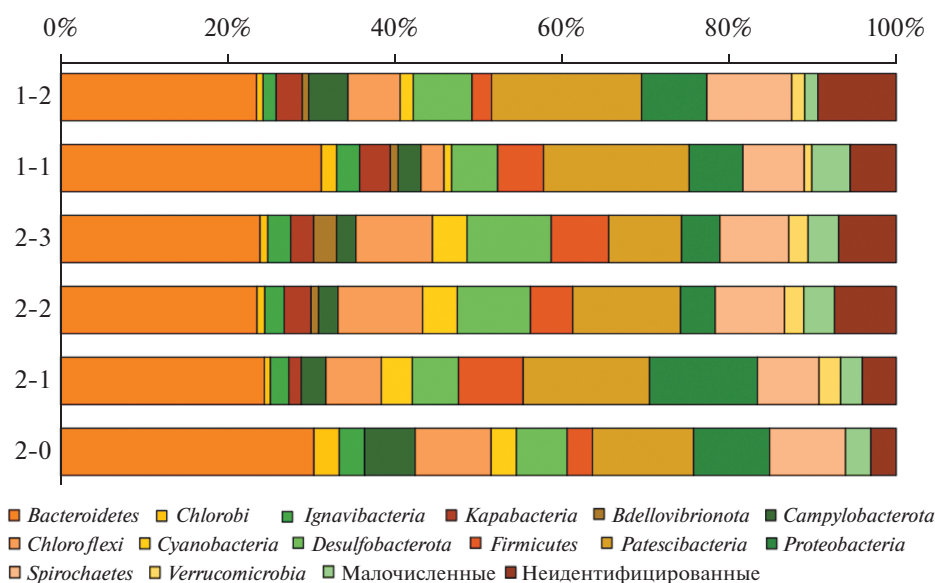


Рис. 3. Относительные количества ОТЕ, принадлежащих к тем или иным филумам, в прикрепленных сообществах ветланда Солодовка.

ria (37 ОТЕ). Более 10 ОТЕ относится к филумам *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Desulfobacterota*, *Campylobacterota* и *Cyanobacteria*. Можно отметить, что *Proteobacteria* в широком смысле, включая *Desulfobacterota*, *Campylobacterota* и *Bdellovibrionota*, являлись бы второй группой по количеству ОТЕ (80). Семь минорных филумов, *Armatimonadota*, *Caldiseriocola*, *Elusimicrobiota*, *Fusobacteriota*, LCP-89, *Modulibacteriota* и *Planctomycetota* были представлены 1–2 ОТЕ и даже в сумме составляли менее 1% обнаруженных последовательностей. Таксономический состав отдельных проб на уровне филумов в целом был мало изменчив, несмотря на значительную разницу количества ОТЕ (рис. 3).

Количественный состав прикрепленных сообществ

В пробе 2-0 из сульфидного источника преобладали бактерии филумов *Chlorobi* и *Bacteroidetes* (95.1% от общего количества последовательностей в библиотеке); бактерии филума *Spirochaetota* были минорной группой (1.2%). В остальных пробах доминировали представители 4–7 филумов, которые составляли 92–97% от общего количества последовательностей в библиотеках (рис. 4в). Основной вклад в бактериальное сообщество матов водоемов и водотоков Солодовки вносят, в порядке убывания значимости, представители следующих филумов: *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Campylobacterota*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Desulfobacterota*, *Chlorobi*, *Spirochaetota*, *Patescibacteria*, а также неклассифицируемые бактерии. Средний вклад остальных филумов не выше 1%, однако у трех, *Firmicutes*, *Ignavibacteraeota* и *Ca. Kapabacte-*

ria, он превышает эту величину в отдельных пробах. Соотношение различных филумов в пробах закономерно изменялось по мере увеличения концентрации сульфидов и снижения температуры воды (рис. 4б, 4в). Аналогичным образом вдоль этого градиента условий изменялась и предполагаемая трофическая специализация организмов сообществ (рис. 4г). Наиболее заметно изменяется доля окислительных и анаэробных фототрофов, а доли бактерий с броуидным типом метаболизма и литоавтотрофов различаются в меньшей степени.

По количественному составу исследованные пробы делятся на две отчетливые группы (рис. 4а). В первую группу входят сообщества трех из четырех матов, в которых преобладают *Cyanobacteria* (более 40% всех прочтений) и *Chloroflexales* (8–14%). Температура воды, омывающей эти сообщества, превышает 11.5°C, а концентрация сульфидов – менее 40 мг/л.

Вторая группа сообществ объединяет две пробы жестких обрастаний (микробиялитов) 2-0 и 1-1, а также мат 2-1. Она менее однородна и, по сути, не имеет общих положительных признаков, кроме повышенной доли *Chlorobiaceae*. Кроме них, заметную часть библиотек, выделенных из проб 1-1 и 2-1, составляют фототрофные протеобактерии. Поэтому общая доля последовательностей, принадлежащих анаэробным фототрофам в этих трех сообществах выше, чем в типичных цианобактериальных матах, в которых *Chlorobiaceae* и фототрофные представители *Proteobacteria* минорны (рис. 4в). Хотя входящий в эту группу цианобактериальный мат 2-1 по внешнему виду почти

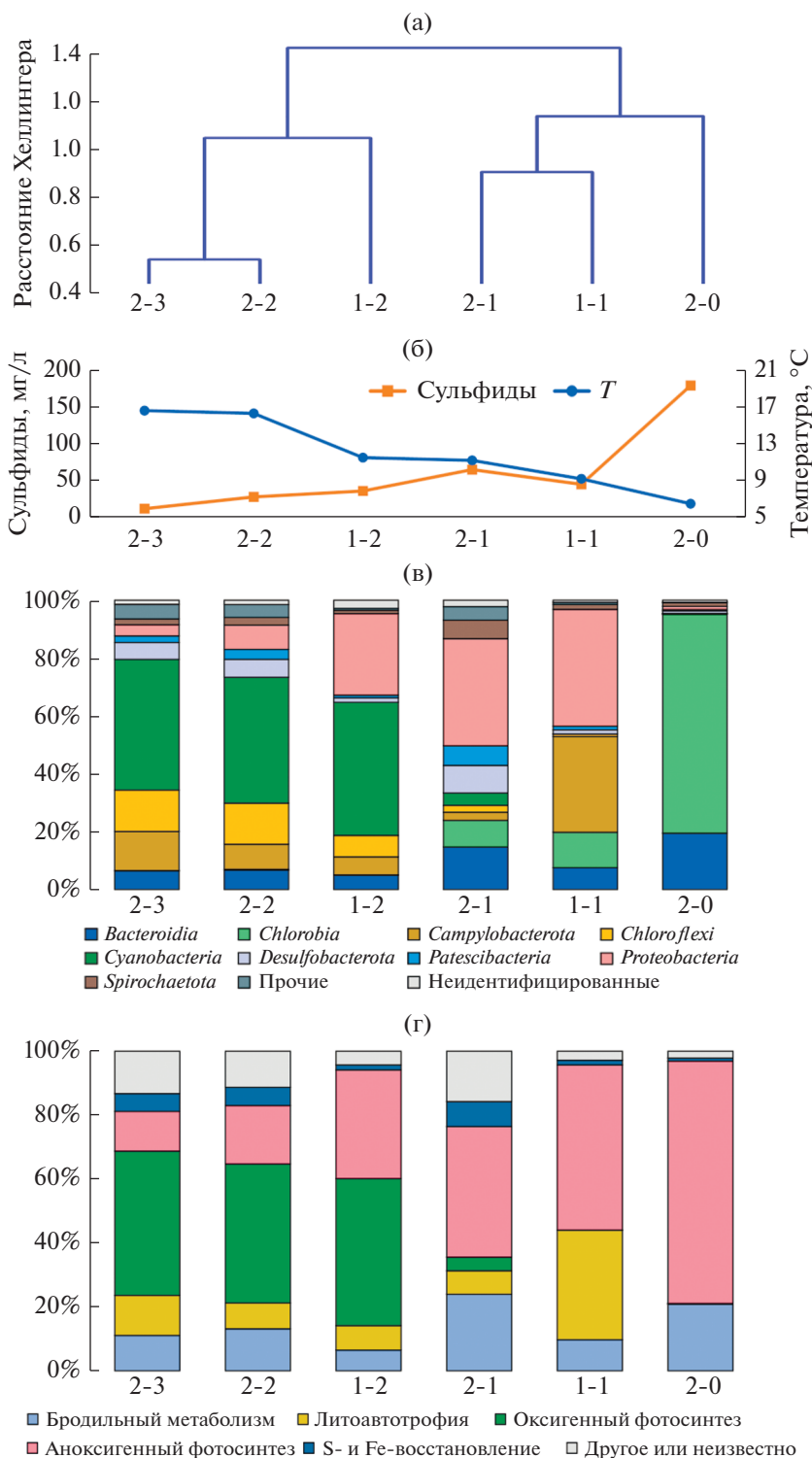


Рис. 4. Изменения структуры матов вдоль градиентов концентрации сульфидов в воде и температуры: дендрограмма сходства таксономического состава матов (а); концентрация сульфидов (мг/л) в воде и температура (T) воды в местах отбора проб (б); относительная численность последовательностей, принадлежащих к ОТЕ различных филумов (в); то же, к ОТЕ с различными предполагаемыми типами метаболизма (г).

Таблица 3. Таксономическая принадлежность доминирующих филотипов и относительное количество принадлежащих к ним последовательностей в отдельных пробах

ОТЕ	Филум	Класс	Отряд	Количество прочтений, % от общего в пробе					
				2-2	2-3	1-2	2-1	1-1	2-0
SLD-9	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	0.09	0	0.32	0.44	3.11	12.2
SLD-15			<i>incertae sedis</i>	0.04	0	1.32	1.09	0.91	3.61
SLD-7	<i>Campylobacterota</i>	<i>Campylobacteria</i>	<i>Campylobacterales</i>	0	0	0.18	0.41	30.6	0.17
SLD-12			<i>incertae sedis</i>	7.55	11.7	3.63	0.06	0	0
SLD-1	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobia</i>	<i>Chlorobiales</i>	0.28	0.04	0.06	8.42	12.2	75.6
SLD-10	<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexia</i>	<i>Chloroflexales</i>	7.62	2.32	7.09	1.08	0	0
SLD-14				1.80	6.55	0	0.14	0	0
SLD-16				2.01	3.89	0	0.16	0	0
SLD-6	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanophyceae</i>	<i>Oscillatoriales</i>	19.0	28.9	0	1.55	0	0
SLD-8				7.73	9.24	30.8	1.46	0	0.01
SLD-25				0.81	2.28	0	0.13	0	0
SLD-11			<i>Synechococcales</i>	14.7	1.87	15.2	0.70	0.07	0
SLD-20	<i>Desulfobacterota</i>	<i>Syntrophia</i>	<i>Syntrophales</i>	0.09	0.12	0.13	2.97	1.08	0.89
SLD-32		<i>Desulfobulbia</i>	<i>Desulfobulbales</i>	0.80	0.15	0.24	2.25	0.07	0
SLD-40		<i>Desulfuromonadia</i>	<i>Geobacterales</i>	0	0.04	0.10	2.20	0.11	0
SLD-4	<i>Proteobacteria</i>	β - <i>Proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	5.06	1.47	26.2	19.9	38.9	0.22
SLD-17		γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Chromatiales</i>	2.94	0.83	0.48	6.56	0	0
SLD-43				0.03	0	0	2.26	0	0
SLD-18	<i>Spirochaetota</i>	<i>Spirochaetia</i>	<i>Spirochaetales</i>	0.52	0.58	0.37	2.93	0.69	0.55
SLD-28				0.71	0.56	0.23	2.21	0.48	0.71

идентичен матам из первой группы, он представляет собой наиболее богатое видами и разнообразное сообщество как по индексам разнообразия (табл. 2), так и по составу таксонов высокого ранга и типам метаболизма.

Всего в пробах обнаружено 20 доминирующих филотипов (рис. 5, табл. 3, 4), доля прочтений которых хотя бы в одной библиотеке превышает 2% общей. Суммарно они формируют от 67 до 98% общего количества полученных последовательностей.

Cyanobacteria. Все обнаруженные ОТЕ принадлежат к группам, объединяющим нитчатые безгетероцистные формы. Четыре доминирующие ОТЕ (SLD-6, 8, 25 и 11) имеют высокое сходство с генами нитчатых безгетероцистных цианобактерий *Planktothrix raciborskii*, *Planktothrix paucivesiculata*, *Oxynema acuminatum* (*Oscillatoriales: Microcoleaceae*) и

Pseudanabaena cinerea/galeata (*Synechococcales: Pseudanabaenaceae*) соответственно (рис. 5). Распространение ОТЕ SLD-6 и SLD-25 ограничено матами бассейна источника 2 (2-1, 2-2 и 2-3); ОТЕ SLD-8 и SLD-11 встречаются в бассейнах обоих источников (табл. 3). Эти ОТЕ близки некультивируемым цианобактериям матов из мезотрофного сульфидного источника Зодлтон (Zodleton Spring, США), фототрофных биопленок ручьев пещерной системы Фразасси (Италия), карстового сульфидного источника на побережье оз. Эри (Great Sulfur Spring, США), а также цианобактериям матов, планктона и нейстона континентальных пресных водоемов с различной географией (Elshahed et al., 2003; Chaudhary et al., 2009; Klatt et al., 2020) (табл. 4).

Chloroflexi. Обнаруженные ОТЕ принадлежат представителям классов *Chloroflexia*, *Anaerolinea* и

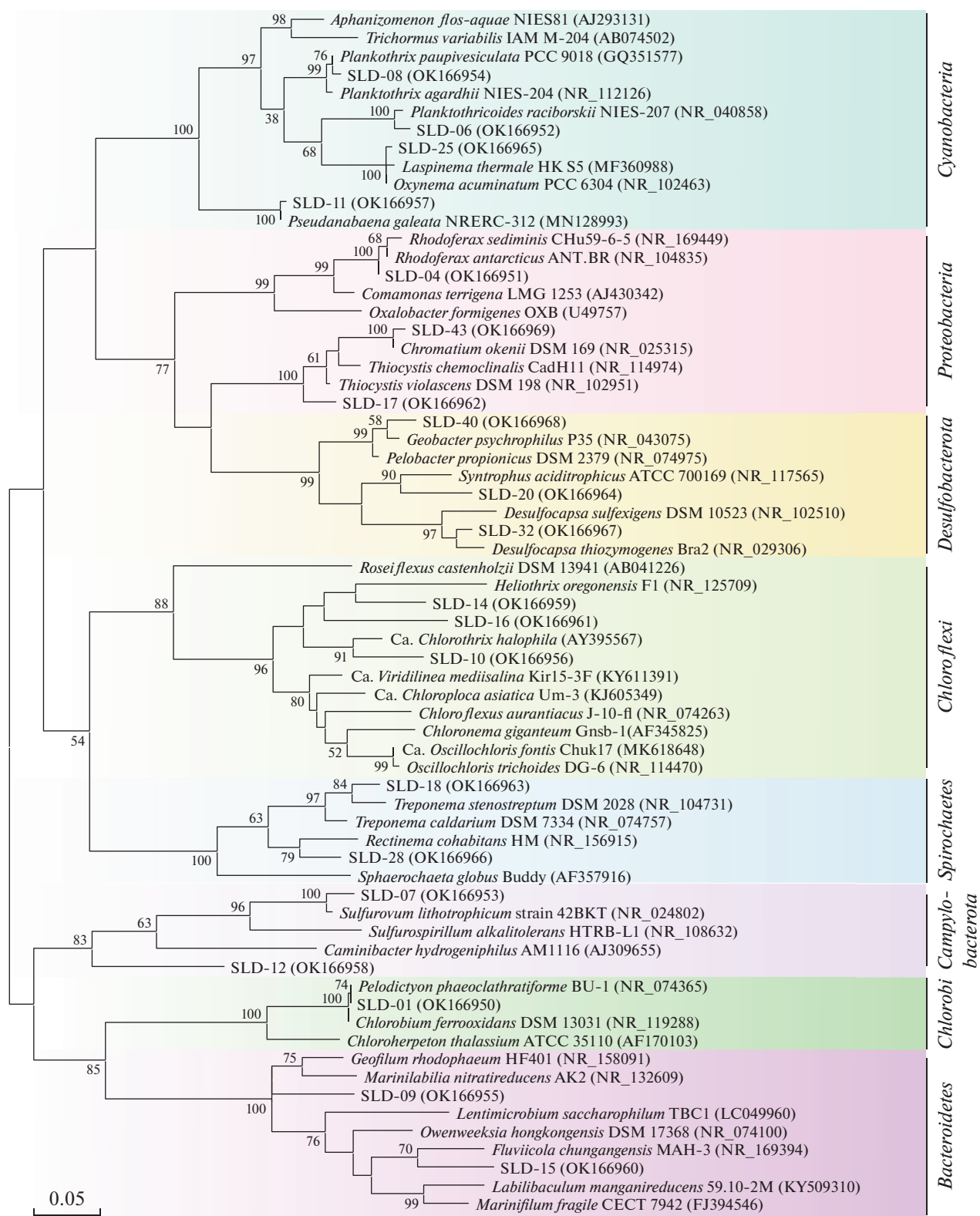


Рис. 5. Филогенетическое дерево фрагментов гена 16S рРНК доминирующих риботипов (SLD) в библиотеках из проб ветланда Солодовка, построенное методом максимального правдоподобия. Числа показывают достоверность ветвления по результатам 1000 повторностей бутстреп-анализа. Шкала соответствует 0.05 заменам на нуклеотидную позицию.

Таблица 4. Культивируемые штаммы и природные последовательности, наиболее близкие к доминирующим флотипам микробных матов оз. Солодовка по 16S рРНК

Флотип	Ближайший культивируемый штамм			Ближайшие природные последовательности		
	сходство, %	название	№ в GenBank	сходство, %	№ в GenBank	место выделения*
SLD-1	100	<i>Pelodictyon phaeoalathratiforme</i> BU-1	NR_104835	100	FJ502275, HE616511, HE616468, HE616413	LC, LAM (3)**
SLD-4	99.35	<i>Rhodofera antarcticus</i> DSM 24876	CP019240	100	HQ273555, KM410406, KT072378, KT072413, KX570687, KX570689, KX570691, KX570694, LR636041, MW497038	WTS, ZKS (2), LC (4), FCS, MAP, SMS
SLD-6	98.42	<i>Planktotohrisoides raciborskii</i> OR1-1	AB045964	100	AY327199, AY327202, AY327203	ZS (3)
SLD-7	97.73	<i>Sulfurovum lithotrophicum</i> 42BKT	NR_024802	99.77	FJ967851, FJ967852, LR640378	GSS (2), WTS
SLD-8	99.77	<i>Planktotohris raucivesiculata</i> PCC 8926	GQ351574	99.77	JF747922	FCS
SLD-9	91.54	<i>Puteibacter caeruleilacinae</i> JC036	MH746935	100	EF467472, EU101284, JF747952, KM410569	FCS (4)
SLD-10	93.21	<i>Ca. Chlorothrix halophila</i>	AY395567	99.09	AY327221	ZS
SLD-11	99.77	<i>Pseudanabaena cinerea</i> NIES-4063	LC314122	99.77	FJ204854	LD
SLD_12	86.74	<i>Thiofractor thiosaminus</i> 496Chim	NR_113568	100	AB240464, DQ133928, DQ295696, EF467516, HQ603963, JN983679, KM410495, KM410560, KM410714, KT072404	FRB, FCS (6), MC, ZPS, PS
SLD-14	89.39	<i>Ca. Viridilinea medisalina</i> Kir15-3F	KY611391	99.77	FJ902467	CC
SLD-15	90.95	<i>Fluviicola kyonggi</i> strain CA-1	KY117481	99.57	EF467522, JF747858, KM410392, KM410445, KM410594, KM410662, KM410711, KM410802, KM410885	FCS (9)
SLD-16	86.91	<i>Ca. Viridilinea halotolerans</i> Chok-6	MH077959	88.07	AB784995	CMM
SLD-17	95.70	<i>Thiocystis violascens</i> DSM 198	NR_102951	97.37	AY327166	ZS
SLD-18	95.48	<i>Treponema stenostreptum</i> DSM 2028	NR_104731	99.57	KM410557	FCS
SLD-20	92.34	<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	NR_102776	99.14	FJ437854, FJ967873, KM410369, KM410715, KM410800	FGL, GSS, FCS (3)
SLD-25	99.77	<i>Oxynema acuminatum</i> PCC 6304	NR_102463	99.77	AM229494, HM273437	MCM, HSM
SLD-28	96.56	<i>Treponema stenostreptum</i> 3S-CHL16-a	MG264272	99.35	KM410600, KM410653, KM410817, KM410902	FCS (4)
SLD-32	97.86	<i>Desulfocapsa thiozymogenes</i> Bra2	NR_029306	99.57	DQ415775, EU662436, JF747811	FCS (3)
SLD-40	97.00	<i>Geobacter psychrophilus</i> P35	NR_043075	99.79	EU266817, EU266825, EU266833, JQ086897	HCA (4)
SLD-43	99.14	<i>Chromatium okenii</i> DSM 169	NR_025315	99.57	FJ546996, FJ546999, FJ547008, FJ547010	LC (4)

* Обозначения мест выделений: CC – карстовый провал Каракол (Мексика), CMM – прибрежные микробные маты (Нидерланды), FCS – пещерная система Фразасси (Италия), FGL – Озеро Файтевиль Грин (США), FRB – биопленка в ризосфере тростника (Япония), GSS – Большой Серный Источник (побережье оз. Эри, Мичиган, США), HCA – загрязненный углеводородами водоносный горизонт (Германия), HSM – микробном кожи человека, LAM – озеро Алинен Мустаярви (Финляндия), LC – озеро Калано (Швейцария), LD – Дойранское озеро (Греция/Сев. Македония), MAP – загрязненный субарктический торфяник (Финляндия), MC – пещера Мовиле (Румыния), MCM – загрязненный нефтью морской цианобактериальный мат (Франция), PS – загрязненная почва (Италия), SMS – грунт соленого марша (Мерилэнд, США), WTS – система очистки сточных вод (Дания), ZKS – карстовый источник Звепленица (Словения), ZS – источник Золтон (Оклахома, США).

** В скобках указано количество последовательностей из указанного местобитания.

Ktedonobacteria, однако все доминирующие ОТЕ относятся только к первому классу, объединяющему подавляющее большинство фототрофных организмов этого филума. Доминирующий филотип SLD-10, вероятно, принадлежат олигогалинной кладе, родственной полигалинному *Ca. Chlorothrix halophila*; ее представители присутствуют также в матах из источника Зодлтон (США) (Elshahed et al., 2003), в матах карстовых провалов системы Закатон (Мексика) (Sahl et al., 2011), а также, вероятно, в других мезогалинных водных местообитаниях (рис. 5, табл. 4). Последовательности ОТЕ SLD-16 и SLD-14 в разных вариантах классификации могут относиться либо к этой же кладе, либо к ветви *Heliothrix*, и, судя по низкому сходству с описанными видами, представляют собой как минимум самостоятельные рода.

Chlorobi. Хотя этот филум представлен в исследованных пробах лишь двумя ОТЕ, он составляет значительную часть последовательностей в матах вблизи источников (пробы 2-0, 2-1 и 1-1). В библиотеке из пробы 2-0 последовательности *Chlorobi* составляли 75.6%. Последовательность доминирующего филотипа, SLD-1, совпадает с последовательностью гена 16S рНК типового штамма *Pelodictyon phaeoclathratiforme* BU-1 (рис. 5, табл. 4). Идентичные природные последовательности были обнаружены при исследовании эвксинного меромиктического оз. Кадано (Cadagno, Швейцария) и гумозного оз. Алинен Мустаярви (Alinen Mustajärvi, Финляндия). Однако обнаружение этой ОТЕ в качестве доминанта в пробах обрастающих и матов неожиданно, поскольку среди десятка ближайших по сходству ОТЕ в базе данных GenBank отсутствуют последовательности, выделенные из бентоса или из матов. Филотип SLD-93 принадлежит к широко распространенному виду *Chlorobium limicola*; он обнаружен во всех исследованных пробах слизистых цианобактериальных матов, но всюду являлся минорным.

Proteobacteria. В составе протеобактерий в полученных библиотеках преобладают бета- и гаммапротеобактерии. Доминирующий филотип, SLD-4, имеет 99.35% сходства с геном 16S рНК типового штамма *Rhodoferrax antarcticus* Madigan et al. 2001 (*Commamonadaceae: Betaproteobacteria*). Штамм с полностью идентичной последовательностью был обнаружен в хемоклине меромиктического оз. Cadagno, Швейцария.

Еще две доминирующие ОТЕ, SLD-17 и SLD-43, родственны бактериям родов *Thiocystis* и *Chromatium* (*Chromatiaceae: Gammaproteobacteria*). SLD-43, видимо, принадлежит к виду *Chr. okenii* (сходство 99.14%); ОТЕ SLD-17 является сестринской по отношению к кладе *Chromatium/Thiocystis*, и вероятно, относится к одному из этих родов или к новому роду (рис. 5, табл. 4).

Desulfobacterota. Три доминирующие ОТЕ, SLD-20, 32 и 40 принадлежат бактериям трех разных семейств (рис. 5, табл. 3, 4). SLD-20 относится к сем. *Syntrophaceae*. Ближайшие к нему виды, *Syntrophus aciditrophicus* и *Smithella propionica*, осуществляют синтрофную деградацию коротко- и длинноцепочечных жирных кислот и бензоата; вероятно, SLD-20 выполняет сходные функции. SLD-32 близок (97.86%) к *Desulfocapsa thiozymogenes* (*Desulfobulbaceae*), которая, наряду с сульфатредукцией, способна к диспропорционированию элементарной серы и тиосульфата. Филотип SLD-40 родственен *Geobacter psychrophilus* (*Geobacteraceae*) и *Pelobacter propionicus* (*Desulfuromonadaceae*). В недавней ревизии (Waite et al., 2020) эти виды предлагается перенести в род *Pseudopelobacter* (*Pseudopelobacteraceae*); в отличие от р. *Geobacter*, они способны использовать в качестве акцепторов электронов разнообразные органические и неорганические соединения.

Campylobacterota. Свободноживущие представители этого филума в подавляющем большинстве анаэробные и микроаэробные организмы, участвующие в окислительно-восстановительных превращениях соединений серы. Классификаторы RDP и Silva относят все обнаруженные филотипы к порядку *Campylobacterales* класса *Campylobacteria*. Доминирующий SLD-7 близок (97.7%) к *Sulfurovum lithotrophicum* (сем. *Sulfurovaceae*); SLD-12 имеет низкое сходство (<87%) с культивируемыми кампилобактериями (табл. 4), и, вероятно, принадлежит к базальной некультивируемой ветви класса *Campylobacteria* (рис. 5).

Spirochaetes. Две доминирующих ОТЕ, SLD-18 и SLD-28, принадлежат к свободноживущим представителям семейства *Treponemataceae* (порядок *Spirochaetales*), и входят в состав ветви, включающей *Treponema stenostreptum*, *T. caldarium* и *Rectinema cohabitans* (рис. 5). Среди минорных ОТЕ шесть близки к перечисленным видам; еще два родственны *Treponema zuelzerae*, а семь ОТЕ принадлежат к группе MVP-15, которая в текущей таксономической схеме Silva также включается в состав *Spirochaetes*.

Bacteroidetes. Несмотря на то, что к этой группе принадлежит более 20% от общего количества выделенных ОТЕ, только две из них входят в число доминантов (рис. 5). Среди культивируемых штаммов с известной таксономической принадлежностью, ближайшими к SLD-9 являются представители сем. *Marinilabiliaceae* (*Bacteroidales*), а к SLD-15 – сем. *Crocinitomicaceae* (*Flavobacteriales*); однако сходство с культивируемыми штаммами в обоих случаях было низким (90–91%; табл. 4). Близкие последовательности (100 и 99.57%) обнаружены при анализе биопленок пещерной системы Фразасси (Италия). Филотипы SLD-9 и SLD-15 являются вторым и третьим до-

минантами по количеству последовательностей в библиотеке из пробы 2-0 и в заметных количествах присутствуют в пробе 1-1; в остальных пробах они минорны (табл. 3), и, видимо, предпочитают твердые травертиновые обрастания слизистым матам с доминированием цианобактерий.

Candidate Phyla Radiation (Ca. *Patescibacteria*). ОТЕ, принадлежащие к *Patescibacteria*, включают 0.4–6.9% последовательностей и 8.7–18% общего количества ОТЕ в полученных библиотеках. Среди них преобладают (68–100% всех *Patescibacteria*) представители Ca. *Abconditabacteriales* (Candidate division SR1) филума Ca. *Gracilibacteria*. Кроме того, обнаружено по 1–5 ОТЕ, принадлежащих бактериям филумов *Falkowbacteria*, *Berkelbacteria*, *Dokjabacteria*, *Parcubacteria* и *Saccharimonadia*. Наибольшее развитие этой группы наблюдается в мате 2-1, в котором бактерии двух ОТЕ, относящиеся к Ca. *Gracilibacteria*, превышают 1%. Ближайшие к ним последовательности обнаружены в наземных сульфидных источниках США (Headd, Engel, 2014), в пещерной системе Фразасси (Hamilton et al., 2015), богатых железом озерах Экспериментальной озерной области (Онтарио, Канада) и грунтах источника Зодлтон (Elshahed et al., 2003). Очевидно, эта группа принимает участие в функционировании матов, которое, возможно, связано с предполагаемым симбиотическим образом жизни этих прокариот.

Биогеография выделенных ОТЕ

По результатам поиска в GenBank и других базах данных, для 326 из 366 ОТЕ обнаруживаются коллекционные штаммы или природные последовательности с нуклеотидным сходством >95%, 207 из них – со сходством >98.7%. Для 21 филотипа в GenBank обнаружены полностью идентичные последовательности. Оставшиеся 40 ОТЕ можно считать эндемичными для исследованного ветланда или для группы сульфидных источников ближайшей территории. 11 ОТЕ не идентифицированы до филума с помощью SINA; оставшиеся шесть ОТЕ принадлежат бактериям филума *Vacteroidetes*, пять ОТЕ – *Patescibacteria*; три – *Bdellovibrionota*; по две ОТЕ – *Campylobacterota*, *Chloroflexi*, *Desulfobacterota*, Ca. *Kapabacteria*, *Spirochaetes* и *Verrucomicrobia* и по одному к *Ignavibacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*.

Поиск в BLAST с запросами, определяющими тип местообитания, показал, что наибольшее число последовательностей, близких к обнаруженным ОТЕ на видовом уровне, выделено из микробных матов (табл. 5). Наибольшее число близких последовательностей на уровне вида и рода выделено из матов и планктона озер, несколько меньше – из сообществ подземных водоносных горизонтов

и донных осадков. Вероятно, результаты этих запросов пересекаются, однако, судя по результатам, не очень значительно (табл. 5). Большое количество последовательностей, близких обнаруженным ОТЕ, выделенное из бактериопланктона, в т.ч. зоны хемоклина, озер, указывает на возможный обмен видами между этими сообществами, однако направление колонизации, из планктона в маты или наоборот, остается неясным. Заметное сходство обнаруженных ОТЕ с последовательностями из подземных водоносных горизонтов, видимо, подтверждает существенную роль микробиоты подземных вод в формировании сообществ матов сульфидных источников (Headd, Engel, 2014), однако для сообществ, формирующихся в условиях полной солнечной освещенности, она, вероятно, несколько меньше, чем для сообществ пещерных биопленок.

При анализе отдельных местообитаний (табл. 5) наибольшее количество сходных последовательностей на уровне рода было приурочено к набору ампликонов из озер 227 и 442 с железосодержащим гиполимнионом Экспериментальной озерной области (Онтарио, Канада) (Schiff et al., 2017), а на уровне вида – к пещерной системе Фразасси, Италия (Engel et al., 2004; Zerkle et al., 2016). Последовательности, близкие к обнаруженным в исследованном ветланде, выявлены также в хемоклине и донных осадках меромиктических озер Каданьо (Cadagno, Швейцария) и Грин (Fayetteville Green Lake, США), в прикрепленных сообществах сульфидных источников Среднего запада США (Headd, Engel, 2014) и подводном сульфидном источнике на побережье оз. Эри, США (Chaudhary et al., 2009). Как и ожидалось, полученная в нашей работе библиотека ОТЕ имеет заметное сходство с таковой источника Зодлтон (Оклахома, США), особенно в части ОТЕ из числа *Patescibacteria*, и вероятно, сходство было бы еще выше, если бы мы исследовали не только маты, но и грунты.

В настоящей работе представлены результаты исследования филогенетического разнообразия бактерий в бассейне холодноводного карстового источника с высоким содержанием сульфидов. Высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК позволило выделить 370 ОТЕ в матах и обрастаниях анаэробной части ветланда. По нашим оценкам, полученные результаты отражают реальное разнообразие прикрепленных бактериальных сообществ, но полнота таксономического покрытия в отдельных пробах составляла от ~50 до >95%. Количество обнаруженных ОТЕ в отдельных участках ветланда варьировало в широких пределах, от 52 до 277. Веро-

Таблица 5. Результаты поиска последовательностей, ближайших к выделенным ОТЕ, в базе данных GenBank в целом и в пробах из различных местообитаний

Количество выделенных ОТЕ, имеющих максимальное сходство*						
	100%	98.7–100%	97–98.7%	95–97%	90–95%	<90%
GenBank в целом	21	207	60	38	31	9
Типы экосистем						
Мат или био пленки	6	83	73	40	105	59
Озеро	8	64	83	53	98	60
Водоносный слой	5	48	63	44	113	93
Донные осадки	1	27	53	37	122	126
Отдельные водные объекты и их локальные группы						
Озера Экспериментальной озерной области (Онтарио, Канада)	5	30	66	48	127	90
Пещерная система Фразасси (Италия)	5	60	32	31	107	131
Наземные серные источники (США)	0	25	27	24	105	185
Озеро Каданьо	2	14	14	26	78	231
Озеро Грин (Fayetteville Green Lake, Нью-Йорк, США)	0	9	13	10	63	269
Источник Зодитон (Оклахома, США)	1	8	8	22	92	235
Большой серный источник (оз. Эри) (Мичиган, США)	0	8	5	8	26	307

* Исключая верхние границы диапазонов.

ятно, таксономическое разнообразие зависит от типа мата, температуры и концентрации сульфидов. Наибольшее разнообразие обнаружено в типичных мягких цианобактериальных матах; состав бактерий в жестких пленочных и пористых обрастаниях значительно более беден. Обнаружено существенное различие в разнообразии бассейнов двух обследованных родников; его причины пока неясны.

Основу матов образуют цианобактерии; доля их последовательностей в матах 2-2, 2-3 и 1-2 составляет 43–46%. Им сопутствуют *Chloroflexales*, составляющие в этих матах 7–13% общего числа последовательностей. Несмотря на то, что мат 2-1 визуально очень сходен с вышеперечисленными, по составу он существенно от них отличается; высокая доля протеобактерий и *Chlorobiaceae* сближает его с пористым травертиновым матом 1-1 и жестким обрастанием 2-0 соответственно. В от-

личие от исследованных матов других местообитаний, в т.ч. сульфидсодержащих, в полученных нами библиотеках отсутствуют последовательности, принадлежащие бактериям филумов *Actinobacteria* и *Acidobacteria*. Эта особенность, вероятно, связана с высокой концентрацией сульфидов в воде исследованной части ветланда.

Хемотрофная часть сообществ матов близка к организмам различных подземных водоносных горизонтов и прикрепленным сообществам из пещерных водотоков; однако их фототрофная часть, по-видимому, формируется независимо от хемотрофной из окружающей поверхностной микробиоты. Интересным фактом является присутствие многих ОТЕ, ближайшие родственники которых обнаруживаются не в прикрепленных сообществах, а в зоне хемоклина стратифицированных, в т.ч. меромиктических, озер.

Представленные в настоящей работе первые данные об особенностях таксономического со-

става и разнообразия прикрепленных сообществ ветланда Солодовка (Самарская обл., Россия) расширяют наши представления об изменчивости структуры и функционировании бактериальных матов холодноводных высокосульфидных водных местообитаний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Секвенирование ДНК было выполнено с использованием оборудования ЦКП “Персистенция микроорганизмов” ИКВС УрО РАН. Авторы выражают благодарность к. м. н. А.О. Плотникову за рекомендации по фиксации и обработке проб и участие в биоинформатической обработке и неизвестному рецензенту за высказанные замечания, которые позволили значительно улучшить рукопись статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Государственных академий наук на 2013–2020 годы (проект № АААА-А17-117112040040-3).

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

- Горбунов М.Ю.* Гидрохимический состав и стратификация воды в пойменном озере Тахтарка // Вестник ВГУ. Серия: География. Геоэкология. 2019. № 1. С. 92–100.
- Дедков А.П.* Геолого-геоморфологические условия развития солоноватоводных карстовых озер Среднего Поволжья // Уникальные экосистемы солоноватоводных карстовых озер Среднего Поволжья / Под ред. Алимова А.Ф., Мингазовой Н.М. Казань: Изд-во Казанского ун-та. 2001. С. 9–17.
- Заварзин Г.А.* Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука, 2004. 348 с.
- Протисты и бактерии озер Самарской области / Под ред. Жарикова В.В. Тольятти: Кассандра, 2009.
- Селиванова Е.А., Пошвина Д.В., Хлопко Ю.А., Гоголева Н.Е., Плотников А.О.* Разнообразие прокариот в планктонных сообществах соленых Соль-Илецких озер (Оренбургская область) // Микробиология. 2018. V. 87. С. 432–447.
- Selivanova E.A., Poshvina D.V., Khlopko Y.A., Plotnikov A.O., Gogoleva N.E.* Diversity of prokaryotes in planktonic communities of saline Sol-Iletsk lakes (Orenburg oblast, Russia) // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 569–582.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. № 15. P. 2114–2120.
- Brock T.D.* Vertical zonation in hot spring algal mats // Phycologia. 1969. V. 8. P. 201–205.
- Chaudhary A., Haack S.K., Duris J.W., Marsh T.L.* Bacterial and archaeal phylogenetic diversity of a cold sulfur-rich spring on the shoreline of Lake Erie, Michigan // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 5025–5036.
- Edgar R.* UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // Nat. Methods. 2013. V. 10. P. 996–998.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Edgar R.C.* UCHIME2: improved chimera prediction for amplicon sequencing // BioRxiv. 2016. Art. 074252.
<https://doi.org/10.1101/074252>
- Elshahed M.S., Senko J.M., Najjar F.Z., Kenton S.M., Roe B.A., Dewers T.A., Spear J.R., Krumholz L.R.* Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 5609–5621.
- Engel A.S., Porter M.L., Stern L.A., Quinlan S., Bennett P.C.* Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “*Epsilonproteobacteria*” // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 51. P. 31–53.
- Farmer J.* Grazing and bioturbation in modern microbial mats // The Proterozoic Biosphere / Eds. Schopf J.W., Klein C. N.Y.: Cambridge Univ. Press, 1992. P. 295–297.
- Hallbeck L., Pedersen K.* Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield // Appl. Geochem. 2008. V. 23. P. 1796–1819.
- Hamilton T.L., Jones D.S., Schaperdoth I., Macalady J.L.* Metagenomic insights into S⁰ precipitation in a terrestrial subsurface lithoautotrophic ecosystem // Front. Microbiol. 2015. V. 5. Art. 756.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00756>
- Headd B., Engel A.S.* Biogeographic congruency among bacterial communities from terrestrial sulfidic springs // Front. Microbiol. 2014. V. 5. Art. 473.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00473>
- Hickman-Lewis K., Cavalazzi B., Foucher F., Westall F.* Most ancient evidence for life in the Barberton greenstone belt: Microbial mats and biofabrics of the ~3.47 Ga Middle Marker horizon // Precambrian Res. 2018. V. 312. P. 45–67.
- Javor B.J., Castenholz R.W.* Laminated microbial mats, Laguna Guerrero Negro, Mexico // Geomicrobiol. J. 1981. V. 2. P. 237–273.
- Klatt J.M., Gomez-Saez G.V., Meyer S., Ristova P.P., Yilmaz P., Granitsiotis M.S., Macalady J.L., Gaute Lavik G., Polerecky L., Bühring S.I.* Versatile cyanobacteria control the timing and extent of sulfide production in a Proterozoic analog microbial mat // ISME J. 2020. V. 14. P. 3024–3037.
- 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.
- Machel H.G.* Bacterial and thermochemical sulfate reduction in diagenetic settings – old and new insights // *Sediment. Geol.* 2001. V. 140. P. 143–175.
- Mendes Monteiro J., Vogwill R., Bischoff K., Gleeson D.B.* Comparative metagenomics of microbial mats from hypersaline lakes at Rottneest Island (WA, Australia), advancing our understanding of the effect of mat community and functional genes on microbialite accretion // *Limnol. Oceanogr.* 2020. V. 65(S1). P. S293–S309.
- Orleanskiy V.K., Yeroshchev-Shak V.A., Karpov G.A., Inkova T.A.* Bedded bacterial-algal formation (mats) in the Kamchatka thermal fields // *Int. Geol. Rev.* 1984. V. 26. P. 298–302.
- Pierson B.K., Castenholz R.W.* A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. // *Arch. Microbiol.* 1974. V. 100. P. 5–24. <https://doi.org/10.1007/BF00446302>
- Prieto-Barajas C.M., Valencia-Cantero E., Santoyo G.* Microbial mat ecosystems: structure types, functional diversity, and biotechnological application // *Electron. J. Biotechnol.* 2018. V. 31. P. 48–56.
- Pruesse E., Peplies J., Glöckner F.O.* SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. P. 1823–1829.
- 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(D1). P. D590–D596.
- Sahl J.W., Gary M.O., Harris J.K., Spear J.R.* A comparative molecular analysis of water-filled limestone sinkholes in north-eastern Mexico // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 226–240.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Beletsky A.V., Krasnova E.D., Voronov D.A., Kallistova A.Yu., Veslopolova E.F., Zakharova E.E., Kokryatskaya N.M., Losyuk G.N., Demidenko N.A., Belyaev N.A., Sigalevich P.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V.* Microbial processes and microbial communities in the water column of the polar meromictic Lake Bol'shie Khruslomeny at the White Sea coast // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 1945.
- Schiff S.L., Tsuji J.M., Wu L., Venkiteswaran J.J., Molot L.A., Elgood R.J., Paterson M.J., Neufeld J.D.* Millions of boreal shield lakes can be used to probe Archaean Ocean biogeochemistry // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 1–11.
- Semikhatov M.A., Gebelein C.D., Cloud P., Awramik S.M., Benmore W.C.* Stromatolite morphogenesis – progress and problems // *Can. J. Earth Sci.* 1979. V. 16. P. 992–1015.
- Waite D.W., Chuvochina M., Pelikan C., Parks D.H., Yilmaz P., Wagner M., Loy A., Naganuma T., Nakai R., Whitman W.B., Hahn M.W.* Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 5972–6016.
- Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J.* Prokaryotes: the unseen majority // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 6578–6583.
- Wingett S.W., Andrews S.* FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control // *F1000Research.* 2018. V. 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>
- Zerkle A.L., Jones D.S., Farquhar J., Macalady J.L.* Sulfur isotope values in the sulfidic Frasassi cave system, central Italy: a case study of a chemolithotrophic S-based ecosystem // *Geochim. Cosmochim. Acta.* 2016. V. 173. P. 373–386.
- Zhang J., Kobert K., Flouri F., Stamatakis A.* PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. P. 614–620. <https://doi.org/10.1093/bio-informatics/btt593>

Bacterial Diversity in Attached Communities of a Cold High-Sulfide Water Body in European Russia

M. Yu. Gorbunov¹*, Y. A. Khlopko², V. Ya. Kataev², and M. V. Umanskaya¹

¹*Institute of Ecology of Volga River Basin, Russian Academy of Sciences, Samara Federal Research Scientific Center RAS, Togliatti, 445003 Russia*

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

*e-mail: myugor1960@gmail.com

Received August 19, 2021; revised September 29, 2021; accepted September 30, 2021

Abstract—Bacterial diversity in attached communities of the anoxic part of the Solodovka wetland (Samara region, Russia), which feeds on cold karst springs with a high (>3 mM) sulfide content was studied using high-throughput sequencing of the variable regions V3–V4 of 16S rRNA gene. The sequences were grouped into 370 operational taxonomic units (OTUs); the OTU number per sample varied within a broad range, from 52 to 277. Taxonomic diversity in the samples depended on mat type, temperature, and sulfide concentration. The highest diversity was found in typical soft cyanobacterial mats; bacterial diversity in hard microbialites was much lower. Phototrophic bacteria formed the basis of all studied communities. In the typical mats, cyanobacteria prevailed, accompanied by phototrophic *Chloroflexales*, the latter being responsible for 7–13% of the total number of sequences. Hard microbialites and the mat developing at the highest sulfide concentration were characterized by low representation of these taxa and a high proportion of phototrophic *Proteo-*

bacteria and *Chlorobiaceae*. Organisms of the sulfur cycle, *Desulfobacterota* and *Campylobacterota*, predominated in the chemotrophic part of the communities. While the organisms with fermentative metabolism and facultative chemolithotrophs were represented by a large number of OTUs, they were minor in abundance, and the sequences of the phyla *Actinobacteria* and *Acidobacteria*, which are usually widespread in oxic aquatic ecosystems have not been found. In general, the chemotrophic part of the studied communities strongly resembled the attached communities from cave streams and communities of various underground aquifers. Their phototrophic component was formed relatively independently of the chemotrophic one with the participation of the surrounding surface microbiota. The sequences most similar to some of the most abundant OTUs in the Solodovka wetland originated from the chemocline of stratified lakes, including meromictic ones.

Keywords: sulfide springs, attached microbial communities, biodiversity, taxonomic composition, 16S rRNA metabarcoding

**БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ СЕМЕЙСТВА
HALOMONADACEAE, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ РАЙОНА СОЛЕРАЗРАБОТОК:
ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И АНАЛИЗ *benA*-ГЕНОВ**© 2022 г. А. А. Пьянкова^а, Е. Г. Плотникова^а, *^аИнститут экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: peg@iegm.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021 г.

После доработки 17.08.2021 г.

Принята к публикации 07.09.2021 г.

Проведен скрининг 124 штаммов семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Kushneria*), выделенных из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС), на способность использовать бензойную кислоту (БК) в качестве единственного источника углерода и энергии. Активный рост на БК демонстрировали 28 штаммов рода *Halomonas*, близкородственным видам *H. taeanensis*, *H. olivaria*, *H. ventosae*, *H. titanicae*, *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. radialis*, *H. sulfidaeris*, в присутствии 30–70 г/л NaCl в среде культивирования. Штаммы родов *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Kushneria* не росли на БК или осуществляли трансформацию БК (2 штамма рода *Chromohalobacter*). ПЦР-скрининг на наличие у исследуемых бактерий семейства *Halomonadaceae* гена *benA*, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы (1,2-ДО) – ключевого фермента деструкции БК, показал присутствие гена во всех штаммах-деструкторах БК рода *Halomonas*. Установлено, что нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов имели наибольшее сходство, не превышающее 95.50%, с генами α -субъединиц бензоат 1,2-ДО, 2-хлорбензоат 1,2-ДО и других диоксигеназ с кластером Риска [2Fe-2S], галофильных бактерий рода *Halomonas*. Новые данные о генетических системах, контролирующими разложение БК, бактерий рода *Halomonas* представляют интерес для понимания молекулярных механизмов деструкции ароматических соединений в условиях засоления, а выявленные активные штаммы-деструкторы БК могут быть использованы при разработке технологий восстановления и мониторинга загрязненных почв.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, бензойная кислота, *benA*, *Halomonadaceae*

DOI: 10.31857/S0026365622010104

Бактерии семейства *Halomonadaceae* (класс *Gammaproteobacteria*) являются грамотрицательными, слабо- или умеренно-галофильными, неспорообразующими, аэробными микроорганизмами. Представители семейства, включающего 14 родов, широко распространены в засоленных экосистемах, таких как соленые озера, засоленная почва, солончаки, морской лед, морепродукты, морские беспозвоночные, сточные воды, морская вода и гидротермальные источники (de la Haba et al., 2014). Повышенный интерес к изучению бактерий семейства *Halomonadaceae* вызван тем, что они способны синтезировать осмопротекторы (эктоин, глицин бетаин и гидроксиэктоин), биополимеры (экзополисахариды и полигидроксисилканат), биосурфактанты, а также осуществлять разложение ароматических соединений (García et al., 2005; de la Haba et al., 2014; Monzón et al., 2018). Такие бактерии перспективны для использования в биотех-

нологических целях, в частности, для очистки засоленных почв и водоемов от токсичных органических поллютантов. Имеется большое количество публикаций о деградации ароматических соединений (АС) представителями семейства *Halomonadaceae* индивидуально или в составе ассоциаций (Le Borgne et al., 2008; Fathepure, 2014). Одним из промежуточных продуктов окислительного катаболизма многих АС, в том числе являющихся загрязнителями окружающей среды (фенола, толуола, бифенила, фталатов и других), у бактерий является бензойная кислота (БК) (Moreno et al., 2011; Li et al., 2013). Накопление БК в окружающей среде также связано с метаболической активностью растений, антропогенной деятельностью, поскольку БК и ее производные служат сырьем для получения целого спектра химических соединений, применяются при консервировании пищевых продуктов, в медицине и парфюмерной промышленности

(García et al., 2005; Le Borgne, 2008; Li et al., 2013). Среди бактерий семейства *Halomonadaceae* способность к разложению БК описана для *H. halodurans* ATCC 29686^T (Rosenberg, 1983), *H. organivorans* CECT 5995^T (Moreno et al., 2011), *H. elongata* A15.6, *H. eurihalina* A17.6, A25.2 (García et al., 2005), *H. campisalis* ATCC 700597^T (Oie et al., 2007), *Halomonas* sp. KHS3 (Monzón et al., 2018), *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T (Csonka et al., 2005), *Chromohalobacter* sp. HS-2 (Kim et al., 2008). Однако информация об особенностях строения и функционирования генетических систем, а также путях метаболизма, обеспечивающих деструкцию ароматических соединений в условиях засоления, у этой группы микроорганизмов крайне ограничена (Fatherine, 2014).

Метаболический путь разложения бензойной кислоты, который наиболее часто встречается у прокариот, начинается с внедрения гидроксигрупп в химически стабильное ароматическое кольцо молекулы под действием бензоат 1,2-диоксигеназы (EC 1.14.12.10) и дигидродигидроксисбензоат дегидрогеназы (EC 1.3.1.25) с образованием дигидроксисбензоата (катехола) (<https://www.genome.jp/pathway/map00362+C00180>). Показано, что субстратная специфичность обуславливается α -субъединицей бензоат 1,2-ДО (Parales, Resnick, 2006), поэтому ген *benA*, кодирующий α -субъединицу этого фермента, часто используется в качестве генетического маркера, предполагающего возможность индукции в бактериальных клетках бензоат 1,2-ДО.

Ранее из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магнелиевых солей (ВМКМС), характеризующегося высоким уровнем засоления и присутствием различных органических поллютантов (в том числе, моно- и полиАС) (Бачурин, Одинцова, 2009), были выделены индивидуальные бактерии семейства *Halomonadaceae* и ассоциации, в составе которых присутствовали представители этого семейства (Ананьина и соавт., 2005; Корсакова и соавт., 2013; Olsson et al., 2017; Пьянкова и соавт., 2020). Ряд штаммов рода *Halomonas* был способен расти на нафталине, орто-фталевой, протокатеховой, гентизиновой и бензойной кислотах в качестве единственного источника углерода и энергии (Ястребова и соавт., 2019).

Цель настоящей работы — характеристика бактерий-деструкторов БК семейства *Halomonadaceae*, выделенных из различных экотопов района промышленных солееработок ВМКМС, и описание разнообразия ключевых генов деструкции БК (*benA*) у исследуемых галофильных штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы для исследований. В работе использованы бактерии семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Kushneria*, *Salinicola*) из рабочей коллекции лаборатории микробиологии техногенных экосистем ИЭГМ УрО РАН. Бактериальные штаммы были выделены из различных образцов, отобранных в районе солееработок ВМКМС (г. Соликамск, г. Березники, Пермский край): ризосферы растений, почвы, грунта, глинистых донных отложений рассоловодящей выработки рудника, отходов производства (шламохранилища, солеотвалы), рассоло-сборников (Ананьина и соавт., 2005; Корсакова и соавт., 2013; Olsson et al., 2017; Ястребова и соавт., 2019; Пьянкова и соавт., 2020). Также для исследования были взяты типовые штаммы: *Halomonas taeanensis* DSM 16463^T, *Chromohalobacter canadensis* DSM 6769^T, *Chromohalobacter beijerinckii* DSM7218^T, *Chromohalobacter japonicas* CECT7219^T, *Chromohalobacter salarius* CECT5903^T, *Salinicola socius* SMB35^T, *Salinicola salarius* DSM18044^T.

Способность бактерий разлагать бензойную кислоту оценивали путем культивирования в жидкой минеральной среде Раймонда (MCP) (Raymond, 1961) с различными концентрациями NaCl (30–150 г/л) и без добавления соли. Бензойную кислоту (в виде 10% раствора бензоата натрия) добавляли до конечной концентрации 1 г/л. Культивирование осуществляли на термостатируемом шейкере при температуре 28°C и скорости вращения 140 об./мин в течение 14 сут. Оценку роста проводили путем измерения оптической плотности (ОП) культуральной жидкости на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Утилизацию БК оценивали в культуральной жидкости, очищенной от бактериальных клеток центрифугированием (9660 g) в течение 3 мин на центрифуге miniSpin (“Eppendorf”, Германия). Наличие в надосадочной жидкости БК определяли методом ВЭЖХ-анализа на хроматографе LC-20AD Prominace (“Shimadzu”, Япония) с колонкой (C-18 150 × 4.6 мм; “Sigma-Aldrich”, США) и УФ-детектором SPD-20A (при 205 нм) в системе ацетонитрил–0.1% H₃PO₄ (60 : 40). Количество субстрата оценивали по величине площади и высоты пиков на хроматограмме относительно величины стандарта (0.01% водный раствор БК). Повторность опытов трехкратная.

Идентификация бактерий-деструкторов. ДНК из чистых культур бактерий выделяли общепринятым методом (Short protocols in molecular biology, 1995). Идентификацию бактерий проводили на основе определения и анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (длина фрагментов 915–1418 п.н.). Амплификацию гена

16S рРНК осуществляли с использованием универсальных бактериальных праймеров: 27F (5'-AGAGTTTGTATC(A/C)TGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3') (Lane, 1991) на приборе C1000 Touch™ Thermal Cycler ("Bio-Rad Laboratories", США). Электрофорез, секвенирование и анализ полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили, как описано ниже.

Исследование ключевых генов деструкции бензойной кислоты (*benA*-генов) осуществляли путем амплификации фрагмента гена (длиной 521 п.н.), кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы, при использовании праймеров *benA-F* (5'-GCCACGAGAGCCGATTC-3') и *benA-R* (5'-GGTGGCGCGTAGTTCAGTG-3') как описано (Baggi et al., 2008), с последующим секвенированием и анализом полученных нуклеотидных последовательностей.

Для обнаружения ПЦР-продуктов использовали электрофорез в горизонтальном 1% агарозном геле на 1× буфере TBE (Трис – 10.8 г/л, борная кислота – 5.5 г/л, 0.5 М ЭДТА – 4 мл, вода дистиллированная – 79.7 мл/л) при комнатной температуре, напряжении 5–15 В/см в течение 20–40 мин. Агарозные гели анализировали после окрашивания раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 10–15 мин и фотографирования в УФ-свете с помощью системы геледокументирования BioDocAnalyze ("Bio-Rad Laboratories", США). Для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder ("Евроген", Россия).

Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *benA* осуществляли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL ("Applied Biosystems", США) с использованием набора реактивов Big Dye Terminator Cycle sequencing Kit v3.1 ("Applied Biosystems", США), согласно рекомендациям производителя. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 16S рДНК и *benA* проводили с использованием программ Sequence Scanner v. 2.0., MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>), сервиса BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли по международным базам данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>) и GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для построения филогенетических деревьев использовали метод "neighbor-joining" программы MEGA 7.0. Статистическую достоверность ветвления ("bootstrap"-анализ) оценивали на основе 1000 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *benA* исследуемых штаммов депонированы в базу данных GenBank под номерами MW757272–

MW757286, MZ359852–MZ359857 и MW862486–MW862498 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг штаммов семейства *Halomonadaceae* на способность использовать БК в качестве субстрата. Сто двадцать четыре штамма семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Kushneria*), выделенных ранее из различных экотопов района солеразработок Верхнекамского месторождения солей, а также 7 типовых штаммов родов *Halomonas*, *Chromohalobacter* и *Salinicola* были проверены на способность к росту на БК в качестве единственного источника углерода и энергии. Было показано, что при выращивании в МСР в присутствии 30 г/л NaCl рост на БК демонстрировали 29 штаммов рода *Halomonas* (включая *H. taeanensis* DSM 16463^T) из 63 штаммов этого рода разной видовой принадлежности, которые были отобраны для анализа. Рост на бензоате был зафиксирован у бактерий, близкородственных типовым штаммам видов *H. taeanensis*, *H. olivaria*, *H. ventosae*, *H. titanicae*, *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. radialis*, *H. sulfidaeris*, но не у представителей видов *H. venusta*, *H. hydrothermalis*, *H. utahensis*, *H. alimentaria*, *H. meridiana*, *H. piezotolerans* и *H. songnenensis*. Двадцать два активных штамма-деструктора БК рода *Halomonas* были исследованы более подробно (табл. 1). Среди 52 исследуемых штаммов рода *Chromohalobacter* (близкородственных видам *C. beijerinckii*, *C. japonicus*, *C. salarius*, *C. canadensis*) и 4 типовых штаммов рода, три штамма вида *C. canadensis* (включая типовой штамм *C. canadensis* DSM 6769^T) осуществляли разложение (трансформацию) БК, о чем свидетельствовали убыль субстрата и изменение цвета среды в процессе культивирования (табл. 1). У 6 представителей рода *Salinicola*, близкородственных видам *S. halophyticus*, *S. socius*, *S. salarius* и типовых штаммов *S. socius* SMB35^T, *C. salarius* СЕСТ 5903^T, а также у 3 штаммов рода *Kushneria* (близкородственных штамму *K. phyllosphaerae* EAod3^T), не было выявлено способности разлагать БК.

Характеристика бактерий-деструкторов БК рода *Halomonas*. Бактерии рода *Halomonas* являются умеренно галофильными микроорганизмами, способными расти как в отсутствие соли, так и в присутствии высоких концентраций хлорида натрия до 325 г/л (de la Haba et al., 2014). Показано, что все исследуемые штаммы, изолированные из разных экотопов района солеразработок, росли на БСР при концентрации соли от 30 до 150 г/л. У ряда штаммов, *Halomonas* spp. PD13-5, PMK3, D2, 610-2, 61g и *H. taeanensis* DSM 16463^T, рост в отсутствие соли не был выявлен, а оптимальное содержание NaCl в среде составляло 70–150 г/л. Кроме

Таблица 1. Рост бактерий семейства *Halomonadaceae* в присутствии различных концентраций хлорида натрия

Штамм	Богатая среда Раймонда, NaCl (г/л)	Минеральная среда Раймонда, БК (1 г/л), NaCl (г/л)			
		без NaCl	30	50	70
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. taeanensis</i>					
<i>H. taeanensis</i> DSM 16463 ^T	30–250	–	+++	++	+
SMB56	0–150	+	++	++	+
NDT27	0–250	+	++	+++	++
D2	30–300	–	+++	+++	++
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. olivaria</i>					
NDT31	0–200	++	++	+	+
NDT21	0–150	+	+	–	–
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. ventosae</i>					
610-2	30–150	–	+++	+++	+
PMK3	30–150	–	++	++	+
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. titanicae</i>					
BNL26	0–150	++	+++	+++	++
BBL18	0–150	++	++	++	++
NDT13	0–150	+	+	–	–
BNL3-2	0–150	+	+	–	–
M125-1	0–150	–	+	+	+
PD13-5	30–150	–	+	+	+
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. alkaliantarctica</i>					
BBL22	0–150	+	+++	+++	++
8CN1-1	0–150	+	+	+	+
6CN3-12	0–150	+	+	–	–
5RN1	0–150	+	+	–	–
Штаммы, близкородственные другим видам рода <i>Halomonas</i>					
M135-4Nt (<i>H. sulfidaeris</i>)	0–150	–	+++	+++	+
NDT28 (<i>H. neptunia</i>)	0–200	++	++	+	+
M56-2 (<i>H. alkaliphila</i>)	0–150	–	+++	+++	+
61g (<i>H. radialis</i>)	30–150	–	+	+++	+
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>Chromohalobacter canadensis</i>					
<i>C. canadensis</i> B201	30–300	–	– т.о.с.*	– т.о.с.	–
<i>C. canadensis</i> 55	30–300	–	– т.о.с.*	– т.о.с.	–
<i>C. canadensis</i> DSM 6769 ^T	30–300	–	– т.о.с.*	–	–

Примечание. “–” – рост не обнаружен; “+” – ОП₆₀₀ от 0.1 до 0.3 ед.; “++” – ОП₆₀₀ от 0.4 до 0.7 ед.; “+++” – ОП₆₀₀ выше 0.7 ед.; “т.о.с.” – темное окрашивание среды культивирования.

* Данные об утилизации бензойной кислоты приведены в тексте статьи.

того, штаммы NDT27, D2, NDT28, NDT31, *H. taeanensis* DSM 16463^T способны к росту при более высоких концентрациях NaCl в среде (200–300 г/л). Штаммы были проверены на способность к росту

в МСР на БК в присутствии различных концентраций соли (табл. 1). Большинство культур показали наивысший прирост биомассы, выраженный в показателях оптической плотности культу-

ры, при содержании 30 г/л соли в среде. С другой стороны, ряд штаммов (NDT27, D2, BNL26, BBL18, BBL22, M56-2, M135-4Nt, 61g, 610-2) демонстрировали активный рост при более высоких концентрациях соли — 50 и 70 г/л NaCl. В присутствии соли — 100 г/л и выше — не был выявлен рост исследуемых бактерий на БК.

В рамках настоящего исследования у 14 деструкторов БК (штаммов BBL18, BNL26, BNL3-2, BFL1, PD13-5, NDT13, BBL22, NDT27, D2, 610-2, 61g, NDT21, NDT31, NDT28) проведено секвенирование и анализ почти полного гена 16S рРНК (1350–1418 п.н.). Штаммы SMB56, M56-2, M135-4Nt, SMB61, TC193 и TC195 были идентифицированы на основе анализа гена 16S рРНК впервые. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых бактерий (длиной 915–1418 п.н.) и типовых штаммов рода *Halomonas* (<http://www.ezbiocloud.net>) показало, что активные деструкторы бензоата филогенетически близки с видами: *H. alkaliantarctica*, *H. alkaliphila*, *H. neptunia*, *H. olivaria*, *H. sulfidaeris*, *H. taeanensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae* и *H. radices*. Шесть штаммов сходны на уровне 99.24–100% с морским штаммом *H. titanicae* ВН1^Т (Sanchez-Porro et al., 2010). Четыре штамма близкородственны (99.29–100% сходства по гену 16S рРНК) *H. taeanensis* DSM 16463^Т (Lee et al., 2005), пять штаммов имели 99.62–99.85% сходства по гену 16S рРНК с *H. alkaliantarctica* CRSS^Т, выделенным из соленого озера в Антарктике (Poli et al., 2007). Другие штаммы наибольшее сходство (на уровне 99.02–100%) имели с видами *H. olivaria* (99.93–100%, штаммы NDT21, NDT31), *H. ventosae* (99.06–99.42%, штаммы 610-2, РМК3), *H. neptunia* (99.57%, штамм NDT28), *H. sulfidaeris* (99.02%, штамм M135-4Nt), *H. alkaliphila* (99.79%, штамм M56-2). Следует отметить, что штамм 61g, изолированный из донных отложений рассолосборника на территории разработок ВМКМС, по гену 16S рРНК (размер анализируемой последовательности 1408 п.н.) имел низкий уровень сходства (98.41%) с ближайшим типовым штаммом *H. radices* EAR18^Т (Navarro-Torre et al., 2020) и может представлять новый таксон в семействе *Halomonadaceae*. На рис. 1 показано положение исследуемых штаммов с близкородственными типовыми штаммами рода *Halomonas* на филогенетическом дереве, построенном с использованием метода “neighbor-joining”.

Разнообразие генов *benA* бактерий рода *Halomonas*. В результате проведения амплификации гена *benA*, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-ДО, было установлено, что у всех 22 исследуемых штаммов-деструкторов рода *Halomonas*, в том числе у *H. taeanensis* DSM 16463^Т, присутствует ген *benA*. Для секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей *benA*-генов были

отобраны ампликоны, полученные с ДНК-матриц 12 штаммов разной видовой принадлежности (табл. 2). На основании сравнения амплифицированных фрагментов *benA*-генов с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank установлено, что наибольшее сходство, на уровне не выше 97.28%, сравнимые последовательности имели с генами α -субъединиц бензоат 1,2-ДО, 2-хлорбензоат 1,2-ДО и белка, содержащего кластер Риске, бактерий рода *Halomonas* (табл. 2). При анализе последовательностей *benA*-генов штаммов BBL18, M135-4Nt и *H. taeanensis* DSM 16463^Т было выявлено сходство с генами бензоат/толуат 1,2-ДО (на уровне 83.82–82.04%) и бензоат 1,2-ДО (80.87 и 82.25%, штаммы BBL18 и *H. taeanensis* DSM 16463^Т) штамма рода *Chromohalobacter* (*C. salexigens* 40a_TX). Более низкое сходство исследуемых *benA*-генов, не превышающее 80.54% (у штамма *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840^Т, класс *Cammaproteobacteria*), было выявлено с *benA* и гомологичными генами других представителей класса *Cammaproteobacteria*, а также штаммами классов *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Actinobacteria* (табл. 3).

На филогенетическом дереве (рис. 2) приведены транслированные аминокислотные последовательности (ТАП) *benA*-генов исследуемых деструкторов БК рода *Halomonas*, а также ближайших гомологичных генов представителей рода *Halomonas* других таксонов протеобактерий (классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Cammaproteobacteria*) и актинобактерий. ТАП *benA*-генов штаммов семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas* и *Chromohalobacter*) на дереве формируют отдельную филогенетическую группу, в которой четко прослеживается наличие нескольких кластеров (рис. 2). Так, наиболее многочисленный кластер включает ТАП восьми штаммов: NDT28, M56-2, M125-1, M135-4Nt, PD13-5, 8CN1-1, BBL18 и BBL22, которые филогенетически близки по гену 16S рРНК разным видам рода *Halomonas* (*H. alkaliantarctica*, *H. alkaliphila*, *H. neptunia*, *H. sulfidaeris*, *H. titanicae*, *H. utahensis*). BLAST-анализ геномов типовых штаммов вышеперечисленных видов показал, что гены *benA* в них отсутствуют. В то же время ТАП, близкородственные этой группе генов, были выявлены в геномах двух штаммов: *H. sulfidaeris* SST4 (QNTU01000040) и *Halomonas* sp. HL-93 (LJST01000014) (рис. 2). Сравнимые последовательности генов *benA* этого кластера проявляли наибольшее сходство с генами большой субъединицы бензоат/2-галобензоат 1,2-ДО и белка, содержащего кластер Риске, штаммов рода *Halomonas*, изолированных из морских экосистем (табл. 2, рис. 2). Аминокислотные последовательности генов *benA* штаммов BBL18 и BBL22 формируют отдельную ветвь с таковыми генов 2-гало(хлор)бензоат 1,2-ДО двух штаммов рода *Halomonas* (рис. 2).

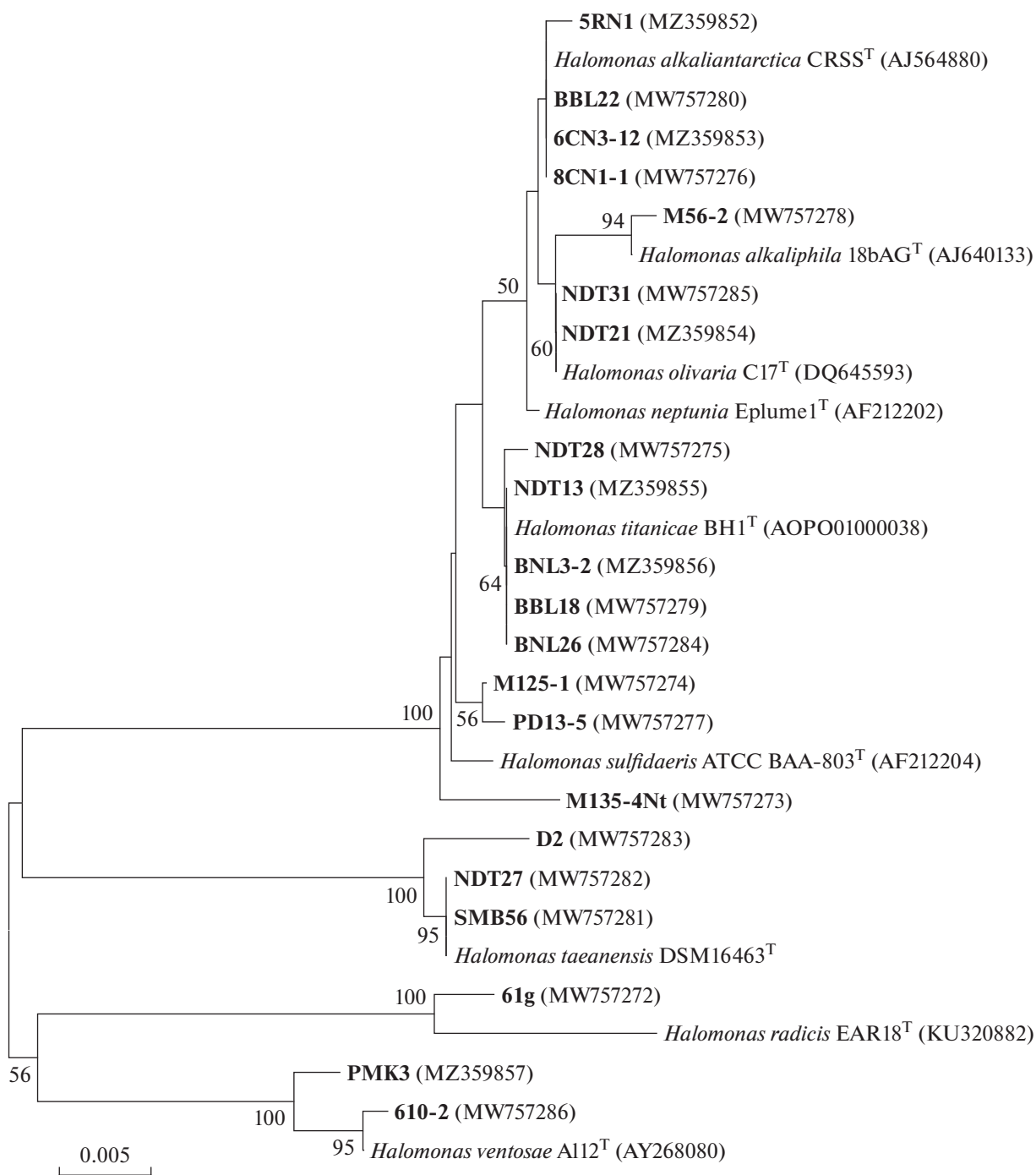


Рис. 1. Положение исследуемых штаммов рода *Halomonas* на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК с использованием метода “neighbor-joining”. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода “Jukes-Cantor”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. В скобках указаны номера в базе данных GenBank.

Штаммы SMB56, NDT27 и D2 (по гену 16S рРНК) являются филогенетически близкими с *H. taeanensis* DSM 16463^T, а штамм 610-2 — с *H. ventosae* A112^T. Сравнительный анализ последо-

вательностей гена *benA* этих штаммов и штамма *H. taeanensis* DSM 16463^T с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank показал наибольшее сходство с генами α-субъедини-

Таблица 2. Сравнение нуклеотидных последовательностей *benA*-генов штаммов рода *Halomonas* с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Штаммы	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
	Ген α -субъединицы 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>Halomonas</i> sp. КО116	CP011052	92.15 94.67 94.46 93.32 94.03 93.39 95.50 93.66	Водная поверхность Средиземного моря, дельта Нила, Египет	O'Dell et al., 2015
	Ген α -субъединицы 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>H. titanicae</i> GPM3	CP054580	91.88 94.46 94.46 93.50 94.03 93.39 95.09 94.08	Красные водоросли <i>Pyropiatenera</i> , Южная Корея	Н.д.
NDT28 M56-2 M125-1 M135-4Nt	Ген, кодирующий белок с кластером Рискс [2Fe-2S], <i>Halomonas</i> sp. PA16-9	CP040451	91.88 94.68 94.66 93.91 94.24 92.98 93.87 91.97	Донные отложения, Тихий океан	Н.д.
PD13-5 8CN1-1 BBL18 BBL22	<i>benA</i> , <i>H. sulfidaeris</i> SST4	QNTU01000040	92.15 94.01 94.46 93.70 94.03 93.80 95.30 92.60	Морские отложения, Антарктида	Abdel-Mageed et al., 2020
	<i>benA</i> , <i>Halomonas</i> sp. HL-93	LJST01000014	Н.д. 87.58 87.01 86.50 86.60 85.42 87.63 Н.д.	Микробный мат гиперсоленого озера, США	Nelson et al., 2015
	Ген α -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. ventosae</i> СЕСТ 5797 ^T	SNZJ01000041	86.70 88.99 89.63 89.08 89.60 88.02 88.64 Н.д.	Засоленная почва, Испания	Н.д.

Таблица 2. Окончание

Штаммы	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
	Ген α -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. ventosae</i> USBA 854	PVTM01000013	91.02 90.00 90.59 90.42 90.00 92.94 91.02 Н.д.	Соленый источник, Анды, Колумбия	Н.д.
	<i>benA</i> , <i>H. aestuarii</i> Hb3	CP018139	89.48 89.00 89.38 89.32 88.91 88.71	Солнечная солеварня, Южная Корея	Н.д.
	<i>benA</i> , <i>H. organivorans</i> СЕСТ 5995 ^T	FN997646	85.92 87.68 86.74 86.86 87.37 84.70	Засоленная почва, Южная Испания	Moreno et al., 2011
DSM16463 ^T	Ген, кодирующий белок, содержащий кластер Риске 2Fe-2S, <i>Halomonas</i> sp. BM-2019	CP071922	86.56 88.38 87.90 87.82 87.03 86.34	Озерная вода, Танзания	Н.д.
NDT27					
D2					
DR1	<i>benA</i> , <i>H. sulfidaeris</i> SST4	QNTU01000040	82.85 84.06 83.44 83.54 83.92 Н.д.	Морские отложения, Антарктида	Abdel-Mageed et al., 2020
SMB56					
610-2	Ген α -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. ventosae</i> СЕСТ 5797 ^T	SNZJ01000041	Н.д. 89.00 88.96 88.89 88.49 90.44	Засоленная почва, Испания	Н.д.
	Ген α -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. ventosae</i> USBA 854	PVTM01000013	Н.д. 90.80 89.66 89.66 90.59 89.66	Соленый источник, Анды, Колумбия	Н.д.
	Ген α -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. taeanensis</i> BH539 ^T	FNCI01000003	100 97.28 94.86 94.83 97.28 83.98	Солнечная солеварня, Корея	Н.д.

Примечание. "Н.д." – нет данных.

Таблица 3. Сравнение нуклеотидных последовательностей *benA*-генов штаммов рода *Halomonas* (сем. *Halomonadaceae*, класс *Gammaproteobacteria*) с гомологичными ближайшими последовательностями бактерий других таксонов (BLAST-анализ)*

Штамм	Гомологичные гены в GenBank	Класс	Номера GenBank**	Сходство, %
M135-4Nt	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a TX	γ - <i>Proteobacteria</i>	QGTY01000001/ PWW42699	82.18
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840 ^T	γ - <i>Proteobacteria</i>	FO203363/ CCG93781	80.54
	Ген, кодирующий белок с кластером Рискс [2Fe-2S], <i>Pseudomonas</i> sp. DTU12.1	γ - <i>Proteobacteria</i>	CP045254/ QHG23773	80.25
	Ген, кодирующий белок с кластером Рискс [2Fe-2S], <i>Oceanimonas</i> sp. GK1	γ - <i>Proteobacteria</i>	CP003171/ AEY00109	79.21
	<i>benA</i> , <i>Pseudogulbenkiania</i> sp. NH8B	β - <i>Proteobacteria</i>	AP012224/ BAK76567	77.50
	<i>benA</i> , <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2 ^T	β - <i>Proteobacteria</i>	CP000529/ ABM37421	77.41
BBL18	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a_TX	γ - <i>Proteobacteria</i>	QGTY01000001/ PWW42699	83.82
	<i>benA</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a TX	γ - <i>Proteobacteria</i>	QGTY01000032/ PWW32861	80.87
	Ген, кодирующий белок с кластером Рискс [2Fe-2S], <i>Pseudomonas</i> sp. DTU12.1	γ - <i>Proteobacteria</i>	CP045254/ QHG23773	79.47
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840 ^T	γ - <i>Proteobacteria</i>	FO203363/ CCG93781	78.31
	Ген бензол 1,2-ДО, <i>Zobellella denitrificans</i> F13-1	γ - <i>Proteobacteria</i>	CP012621/ ATG72450	78.12
	Ген бензол 1,2-ДО, <i>Kocuria palustris</i> MU14/1	<i>Actinobacteria</i>	CP012507/ ALB03862	77.92
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> KT112-7	<i>Actinobacteria</i>	CP072193/ Н.д.	77.51
	<i>benA</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> sp. NIBRBAC000502771	<i>Actinobacteria</i>	CP041187/ QDG62019	77.44
	Ген, кодирующий белок с кластером Рискс [2Fe-2S], <i>Oceanimonas</i> sp. GK1	γ - <i>Proteobacteria</i>	CP003171/ AEY00109	77.18
	Ген 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>Serratia rubidaea</i> NCTC10848	γ - <i>Proteobacteria</i>	LS483492/ SQJ16490	76.76
	Ген, кодирующий белок с кластером Рискс [2Fe-2S], <i>Comamonas piscis</i> BIGb0172	β - <i>Proteobacteria</i>	CP058554/ QMV73311	76.53
	<i>benA</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 22B	α - <i>Proteobacteria</i>	CP050092/ QIO68893	76.12
	<i>benA</i> , <i>Citricoccus</i> sp. SGAir0253	<i>Actinobacteria</i>	CP039424/ QCU78183	75.91
610-2	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Massilia</i> sp. WG5	β - <i>Proteobacteria</i>	CP012640/ ALK97586	78.92
	<i>benA</i> , <i>Pseudomonas sihuiensis</i> KCTC 32246 ^T	γ - <i>Proteobacteria</i>	LT629797/ SDU90471	75.95
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DMU1	<i>Actinobacteria</i>	CP050952/ QIX52496	75.80
	Ген 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>Sinorhizobium americanum</i> CCGM7	α - <i>Proteobacteria</i>	CP013054/ APG87352	75.00

Таблица 3. Окончание

Штамм	Гомологичные гены в GenBank	Класс	Номера GenBank**	Сходство, %
DSM 16463T	<i>benA</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a TX	γ -Proteobacteria	QGTY01000032/ PWW32861	82.25
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a TX	γ -Proteobacteria	QGTY01000001/ PWW42699	82.04
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59	γ -Proteobacteria	CP003093/ AER57629	77.13
	<i>benA</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> PF08	γ -Proteobacteria	CP032618/ AYG08044	76.99
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840 ^T	γ -Proteobacteria	FO203363/ CCG93781	76.70
	Ген бензол 1,2-ДО, <i>Zobellella denitrificans</i> F13-1	γ -Proteobacteria	CP012621/ ATG72450	76.23
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Aeromonas simiae</i> A6	γ -Proteobacteria	CP040449/ QF154779	76.16
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Oceanimonas</i> sp. GK1	γ -Proteobacteria	CP003171/ AEY00109	76.01
	<i>benA</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> Vaf10	α -Proteobacteria	CP016287/ ANP89222	75.88
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> KACC 11889	β -Proteobacteria	CP022006/ ASD81778	75.72
	<i>benA</i> , <i>Sphingobium wenxiniae</i> JZ-1 ^T	α -Proteobacteria	KJ620836/ AHZ46835	75.62
	<i>benA</i> , <i>Achromobacter</i> sp. AONIH1	β -Proteobacteria	CP026124/ AUT46373	75.35
	Ген 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>Raoultella terrigena</i> NCTC13098	γ -Proteobacteria	LR131271/ VDR27448	75.15

Примечание. “Н.д.” – нет данных. * В таблице приведены нуклеотидные последовательности, имеющие сходство с анализируемыми нуклеотидными последовательностями не меньше 75%. ** Нуклеотидные/аминокислотные последовательности.

цы бензоат 1,2-ДО штамма *H. aestuarii* Hb3, изолированного из солнечной солеварни (Южная Корея), и штамма-деструктора фенола *H. organivorans* СЕСТ 5995^T, выделенного из засоленной почвы в Южной Испании, а также с геном, кодирующим белок с кластером Риске, штамма *Halomonas* sp. VM-2019, изолированного из озерной воды (Танзания) (табл. 2). ТАП генов *benA* штаммов SMB56, NDT27, D2 (близкородственных виду *H. taeanensis*) и штамма 610-2 (близкородственного виду *H. ventosae*) на филогенетическом дереве формируют два отдельных кластера (рис. 2). Интересен факт, что при анализе геномов штаммов рода *Halomonas*, представленных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), у типового штамма *H. ventosae* СЕСТ 5797^T (SNZJ01000041) и штамма *H. ventosae* USBA 854 (PVTM01000013) были выявлены гены α -субъединицы бензоат/толуат 1,2-ДО. Идентичность нуклеотидных последовательностей *benA* штамма 610-2 и выявленных в геномах штаммов *H. ventosae* гомологичных после-

довательностей составляла 89.66–90.44% (табл. 2). Транслированные аминокислотные последовательности этих генов представлены на филогенетическом дереве и входят в один кластер с *benA*-геном штамма 610-2 (рис. 2). Также показано, что ТАП *benA* штаммов SMB56, NDT27, D2 и типового штамма *H. taeanensis* DSM 16463^T (FNCI01000003) формируют отдельную ветвь на дереве. Гомология нуклеотидных последовательностей генов *benA* этих штаммов между собой составляла 96.13–98.73%. Интересен факт, что на дереве, построенном на основе сравнения генов 16S рРНК, эти штаммы также формируют один кластер (рис. 1). Таким образом, на настоящем этапе исследований выявлено филогенетическое отличие генов *benA* штаммов, близкородственных видам *H. taeanensis* и *H. ventosae*, как между собой, так и с представителями других видов рода *Halomonas*.

Характеристика бактерий-деструкторов БК рода *Chromohalobacter*. Предварительный скрининг показал, что среди 52 штаммов, изолированных

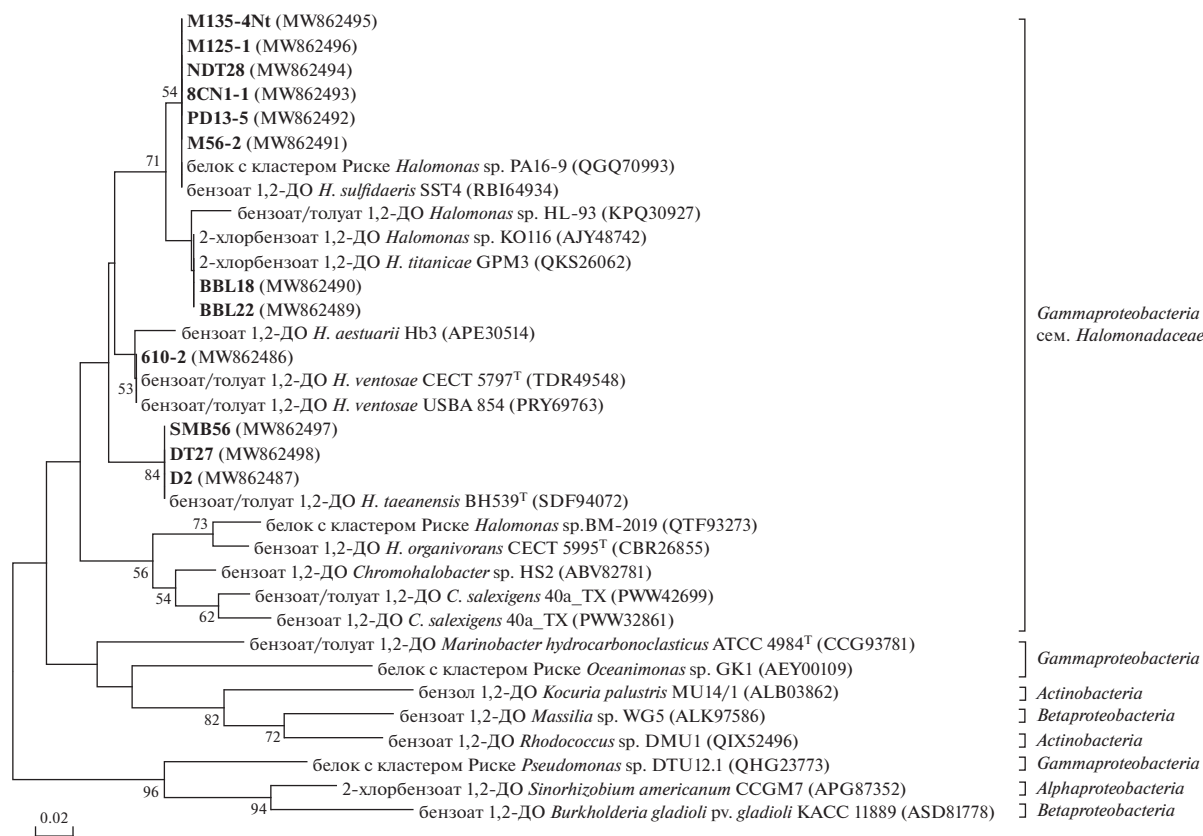


Рис. 2. Положение *benA*-генов исследуемых штаммов рода *Halomonas* на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей *benA*-генов с использованием метода “neighbor-joining”. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода “p-distance”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Масштаб соответствует 2 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот. В скобках указаны номера в базе данных GenBank.

из разных экотопов района солеразработок (Корсакова и соавт., 2013; Olsson et al., 2017; Пьянкова и соавт., 2020), среди которых большинство (35 штаммов) близкородственны по гену 16S рРНК виду *C. canadensis* (сходство на уровне 99.40–99.93% с *C. canadensis* ATCC 43984^T), 16 штаммов – виду *C. japonicus* (99.54–99.78% с *C. japonicus* 43^T) и 1 штамм – виду *C. beijerinckii* (99.85% с *C. beijerinckii* ATCC 19372^T), выявлены только 2 штамма, близкородственных виду *C. canadensis*, способные осуществлять разложение (трансформацию) БК (табл. 1). На процесс разложения БК указывала убыль субстрата и появление темного окрашивания среды, которое нарастало в процессе культивирования штаммов в МСР с БК в присутствии 30 и 50 г/л NaCl (табл. 2). Так при инкубировании в присутствии 30 г/л NaCl штаммы в течение 5 сут демонстрировали убыль субстрата: штамм 55 – 10%, штамм В201 – 11% от первоначального количества (1 г/л) в среде. На основании имеющихся данных о метаболических путях разложения БК у бактерий (<https://www.genome.jp/pathway/map00362+C00180>), можно предположить, что БК окисляется до гид-

роксированных ароматических метаболитов (Li et al., 2013), которые далее не разлагаются ферментными системами исследуемых штаммов и накапливаются при культивировании. Для идентификации продуктов разложения БК требуются дополнительные исследования. Результаты наших исследований показали, что типовой штамм *C. canadensis* DSM 6769^T проявлял аналогичную реакцию при культивировании на БК в присутствии 30 г/л соли (табл. 1), при этом убыль субстрата наблюдалась на уровне 33% в течение 5 сут. Типовые штаммы *C. beijerinckii* DSM 7218^T, *C. japonicus* CECT7219^T, *C. salarius* CECT 5903^T не осуществляли деструкцию (трансформацию) БК.

В результате амплификации с использованием праймеров к гену *benA* (Baggi et al., 2008) и ДНК-матриц исследуемых штаммов рода *Chromohalobacter* не были выявлены искомые нуклеотидные последовательности (*benA*-гены). На основании проведенных экспериментов можно предположить, что в трансформации БК у исследуемых штаммов рода *Chromohalobacter* задействованы ферментные системы, отличные от “классиче-

ского” пути разложения БК бактериями (Li et al., 2013). Анализ генома *C. canadensis* DSM 6769^T показал отсутствие *benA*-генов, что подтверждает это предположение. В результате поиска *benA*-генов в базах данных GenBank только в двух штаммах рода *Chromohalobacter* (*C. salexigens* 40a TX и *Chromohalobacter* sp. HS-2) обнаружены последовательности генов α -субъединицы бензоат 1,2-ДО (EU155151, *Chromohalobacter* sp. HS-2), α -субъединиц бензоат и бензоат/толуат 1,2-ДО (QGTU01000032 и QGTU01000001, штамм *C. salexigens* 40a TX) (рис. 2, табл. 3).

Таким образом, результаты исследования разнообразия бактерий-деструкторов БК семейства *Halomonadaceae* в микробных сообществах района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей (Пермский край) показали, что среди всего массива выделенных и охарактеризованных представителей семейства (родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Kushneria*) активные деструкторы БК выявлены в группе бактерий рода *Halomonas*. Штаммы-деструкторы были филогенетические близки видам: *H. alkaliarctica*, *H. neptunia*, *H. olivaria*, *H. taeanaensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae*, *H. radices* и *H. utahensis*, для представителей которых ранее не была описана способность разлагать БК. Установлено, что выявленные штаммы рода *Halomonas* способны использовать БК в качестве единственного источника углерода и энергии при росте в минеральной среде в присутствии 30–70 г/л хлорида натрия. Известно, что промышленная территория района солеразработок характеризуется наличием большого количества органических загрязнителей, в том числе различных моно- и полиароматических соединений, и высоким содержанием солей (Бачурин, Одинцова, 2009; Корсакова и соавт., 2013). Наши исследования показали, что галофильные бактерии рода *Halomonas* способны разлагать БК и, соответственно, участвовать в процессах деградации ароматических поллютантов в составе уникальных микробных сообществ, сформировавшихся в этом промышленном регионе. Впервые у представителей рода *Halomonas* (выделенных из района ВМКМС) показано разнообразие генов (*benA*), участвующих на начальном этапе окисления БК. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей *benA*-генов показал, что наибольшее сходство они имеют с гомологичными последовательностями представителей рода *Halomonas* и рода *Chromohalobacter* (табл. 2, 3, рис. 2). На филогенетическом дереве транслированные аминокислотные последовательности *benA*-генов бактерий семейства *Halomonadaceae* формируют самостоятельный кластер, уровень гомологии нуклеотидных последовательностей *benA* представителей этой группы составляет 95.50–80.87%. Аминокислотные последовательности *benA*-генов представителей других таксонов

протеобактерий и актинобактерий располагаются на дереве отдельно от группы “*Halomonadaceae*” (рис. 2). Выделение *benA*-генов семейства *Halomonadaceae* в отдельную группу вызывает интерес для возможности их использования в качестве филогенетического маркера, который может быть востребован для изучения разнообразия и функционирования деструкторов БК, в частности, бактерий родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*. Кроме того, охарактеризованные в рамках настоящей работы галофильные бактерии-деструкторы БК имеют практический интерес для использования их при создании новых биотехнологий восстановления и мониторинга засоленных почв, загрязненных токсичными органическими соединениями.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьина Л.Н., Алтынцева О.В., Плотникова Е.Г. Изучение сообщества микроорганизмов, выделенного из района солеразработок // Вестн. Пермского ун-та. Серия: биология. 2005. Вып. 6. С. 109–114.
- Anan'ina L.N., Altyntzeva O.V., Plotnikova E.G. The study of microbial community isolated from the region of salt mining // Bull. Perm Univ. Biology. 2005. Iss. 6. P. 109–114.
- Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Отходы горно-обогатительного производства как источники эмиссии органических поллютантов // Горный информационно-аналитический бюллетень. 2009. № 7. С. 374–380.
- Bachurin B.A., Odintsova T.A. Wastes from mining and processing industry as sources of emission of organic pollutants // Mining informational and analytical bulletin. 2009. № 7. P. 374–380.
- Корсакова Е.С., Ананьина Л.Н., Назаров А.В., Бачурин Б.А., Плотникова Е.Г. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 247–250.
- Korsakova E.S., Anan'ina L.N., Nazarov A.V., Bachurin B.A., Plotnikova E.G. Diversity of bacteria of the family *Halomonadaceae* at the mining area of the Verkhnekamsk salt deposit // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 249–252.

- Пьянкова А.А., Усанина Д.И., Алеев В.С., Блинов С.М., Плотникова Е.Г. Характеристика бактерий, выделенных из рудника Верхнекамского месторождения солей (Пермский край) // Вестн. Пермского ун-та. Серия: биология. 2020. № 4. С. 312–320.
- Pyankova A.A., Usanina D.I., Aleev V.S., Blinov S.M., Plotnikova E.G. Characteristics of bacteria isolated from the miner of the Verkhnekamsky salt deposit (Perm krai) // Bull. Perm Univ. Biology. 2020. № 4. P. 312–320.
- Ястребова О.В., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г. Бактерии-деструкторы фталатов, выделенные из района промышленной добычи и переработки калийно-магниевых солей (г. Березники, Пермский край) // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. С. 378–385.
- Yastrebova O.V., Pyankova A.A., Plotnikova E.G. Phthalate-degrading bacteria isolated from an industrial mining area and the processing of potassium and magnesium salts // Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow). 2019. V. 55. P. 397–404.
- Abdel-Mageed W.M., Lehri B., Jarmusch S.A., Miranda K., Al-Wahaibi L.H., Stewart H.A., Jamieson A.J., Jaspars M., Karlyshev A.V. Whole genome sequencing of four bacterial strains from South Shetland Trench revealing biosynthetic and environmental adaptation gene clusters // Mar. Genomics. 2020. V. 54. P. 100782.
- Baggi G., Bernasconi S., Zangrossi M., Cavalca L., Vincenza A. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents // Int. Biodeter. Biodegr. 2008. V. 62. P. 57–64.
- Csonka L.N., O'Connor K., Larimer F., Richardson P., Lapidus A., Ewing A.D., Goodner B.W., Oren A. What we can deduce about metabolism in the moderate halophile *Chromohalobacter salexigens* from its genomic sequence // Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya / Eds. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. Springer: Dordrecht, 2005. P. 267–285.
- de la Haba R.R., Arahal D.R., Sánchez-Porro C., Ventosa A. The Family *Halomonadaceae* // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Heidelberg: Springer, 2014. P. 325–360.
- Fathepure B.Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 173.
- García M.T., Ventosa A., Mellado E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 54. P. 97–109.
- Kim D., Kim S.W., Choi K.Y., Lee J.S., Kim E. Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and *p*-hydroxybenzoate degradation by the halophilic *Chromohalobacter* sp. strain HS-2 // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 280. P. 235–241.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
- Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 15. P. 74–92.
- Lee J.C., Jeon C.O., Lim J.M., Lee S.M., Lee J.M., Song S.M., Park D.J., Li W.J., Kim C.J. *Halomonas taeanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 2027–2032.
- Li M., Yi P., Liu Q., Pan Y., Qian G. Biodegradation of benzoate by protoplast fusant via intergeneric protoplast fusion between *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis* // Int. Biodeter. Biodegr. 2013. V. 85. P. 577–582.
- Monzón G.C., Nisenbaum M., Seitz M.K.H., Murialdo S.E. New findings on aromatic compounds' degradation and their metabolic pathways, the biosurfactant production and motility of the halophilic bacterium *Halomonas* sp. KHS3 // Curr. Microbiol. 2018. V. 75. P. 1108–1118.
- Moreno M., Sánchez-Porro C., Piubeli F., Frias L., García M.T., Mellado E. Cloning, characterization and analysis of *cat* and *ben* genes from the phenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans* // PLoS One. 2011. V. 6. P. e21049.
- Navarro-Torre S., Carro L., Rodríguez-Llorente I.D., Pajuelo E., Caviedes M.A., Igual J.M., Klenk H.P., Montero-Calasan M.D.C. *Halomonas radialis* sp. nov., isolated from *Arthrocnemum macrostachyum* growing in the Odiel marshes (Spain) and emended descriptions of *Halomonas xinjiangensis* and *Halomonas zincidurans* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 220–227.
- Nelson W.C., Maezato Y., Wu Yu-W., Romine M.F., Lindemann S.R. Identification and resolution of microdiversity through metagenomic sequencing of parallel consortia // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 82. P. 255–267.
- O'Dell K.B., Woo H.L., Utturkar S., Klingeman D., Brown S.D., Hazen T.C. Genome sequence of *Halomonas* sp. strain KO116, an ionic liquid-tolerant marine bacterium isolated from a lignin-enriched seawater microcosm // Genome Announc. 2015. V. 3. P. e00402-15.
- Oie C.S., Albaugh C.E., Peyton B.M. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism // Water Res. 2007. V. 41. P. 1235–1242.
- Olsson B.E., Korsakova E.S., Anan'ina L.N., Pyankova A.A., Mavrodi O.V., Plotnikova E.G., Mavrodi D.V. Draft genome sequences of strains *Salinicola socius* SMB35^T, *Salinicola* sp. MH3R3-1 and *Chromohalobacter* sp. SMB17 from the Verkhnekamsk potash mining region of Russia // Stand. Genomic Sc. 2017. V. 12. P. 39.
- Parales R.E., Resnick S.M. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases // *Pseudomonas* / Eds. Ramos J.L., Levesque R.C. Boston: Springer, 2006. P. 287–340.
- Poli A., Esposito E., Orlando P., Lama L., Giordano A., de Appolonia F., Nicolaus B., Gambacorta A. *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline Lake Cape Russell in Antarctica, an alkaliphilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium // Syst. Appl. Microbiol. 2007. V. 30. P. 31–38.
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinhydrocarbons // Develop. Ind. Microbiol. 1961. V. 2. P. 23–32.
- Rosenberg A. *Pseudomonas halodurans* sp. nov., a halotolerant bacterium // Arch. Microbiol. 1983. V. 136. P. 117–123.
- Sanchez-Porro C., Kaur B., Mann H., Ventosa A. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2768–2774.

Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. / Eds. Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. N.Y.: John Wiley & Sons, 1995. 450 p.

Benzoate-Degrading Bacteria of the Family *Halomonadaceae* Isolated from a Salt Mining Area: Species Diversity and Analysis of the *benA* Genes

A. A. Pyankova¹ and E. G. Plotnikova¹, *

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

*e-mail: peg@iegm.ru

Received July 27, 2021; revised August 17, 2021; accepted September 7, 2021

Abstract—Screening of ability to utilize benzoate as the sole carbon and energy source was carried out for 124 strains of the family *Halomonadaceae* (genera *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, and *Kushneria*) isolated from mining sites of the Upper Kama deposit of potassium and magnesium salts. Active growth on benzoate (in the presence of 30–70 g/L NaCl) was shown for 28 *Halomonas* strains closely related to the species *H. taeanensis*, *H. olivaria*, *H. ventosae*, *H. titanicae*, *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. radialis*, and *H. sulfidaeris*. Strains of the genera *Chromohalobacter*, *Salinicola*, and *Kushneria* either did not grow on benzoate or carried out its transformation (2 *Chromohalobacter* strains). PCR screening for the *benA* gene encoding the α -subunit of benzoate 1,2-dioxygenase (1,2-DO), the key enzyme for benzoate degradation, within the family *Halomonadaceae* revealed its presence in all benzoate-degrading *Halomonas* strains. The sequences of the amplified fragments had the highest similarity (not exceeding 95.50%) with the genes encoding the α -subunits of benzoate 1,2-DO, 2-chlorobenzoate 1,2-DO, and other dioxygenases of *Halomonas* strains containing Rieske-type [2Fe-2S] clusters. New data on the genetic systems regulating benzoate degradation in *Halomonas* isolates are of interest for better understanding of molecular mechanisms of aromatics degradation under salinization conditions. The isolated active benzoate degraders may be used to develop the technologies for bioremediation and monitoring of polluted soils.

Keywords: bacterial degraders, benzoate, *benA*, *Halomonadaceae*

СКРИНИНГ ОБРАЗОВАНИЯ БИОСУРФАКТАНТОВ ШТАММАМИ
YARROWIA LIPOLYTICA И ОЦЕНКА ИХ АНТИБИОПЛЕНОЧНОЙ
И АНТИАДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТИВ БИОПЛЕНОК
SALMONELLA ENTERICA SER. ENTERITIDIS© 2022 г. Ф. Шатила^а, Е. Уйар^б, Х. Т. Ялсин^а, *^аУниверситет Эге, факультет естественных наук, отделение биологии,
кафедра общей и промышленной микробиологии, Измир, Турция^бУниверситет Харран, факультет искусств и наук, отделение биологии, Санлиурфа, Турция

*e-mail: tanselozturk@hotmail.com

Поступила в редакцию 20.01.2021 г.

После доработки 19.02.2021 г.

Принята к публикации 19.02.2021 г.

Проведен скрининг способности образовывать биосурфактанты у дрожжевого штамма (TY24), выделенного из образца пищи, и штамма, идентифицированного ранее как *Yarrowia lipolytica* TEM OS12. Результаты, полученные для обоих штаммов на агаре СТАВ-МВ, с помощью методов уплощения капли, вытеснения масла и с использованием Parafilm M, были положительными. Кроме того, как изолят TY24, так и *Y. lipolytica* TEM OS12 продуцировали липазы, обладали β-гемолитической активностью и снижали поверхностное натяжение с 57.5 до 33.5 и 35.5 мН м⁻¹ соответственно. Анализ последовательностей ITS1-5.8S рРНК-ITS2 и D1/D2 домена 26S рРНК позволил идентифицировать новый изолят как *Y. lipolytica* TY24. Совместная инкубация *Salmonella enterica* ser. Enteritidis с повышающимися объемами поверхностно-активных биосурфактантов из культур *Y. lipolytica* TEM OS12 и *Y. lipolytica* TY24 снижала образование биопленок на 89.42 и 88.09% соответственно. Бесклеточный супернатант исследованных дрожжевых культур эффективно тормозил развитие биопленок сальмонеллы.

Ключевые слова: *Yarrowia lipolytica*, скрининг, биосурфактант, биопленки сальмонелл, антибиопленочная активность

DOI: 10.31857/S0026365622010128

Грамположительная патогенная бактерия *Salmonella enterica* способна образовывать устойчивые прикрепленные сообщества (биопленки). Биопленки представляют собой агрегаты микробных клеток, окруженные экзополисахаридным матриксом, действующим в качестве структурного компонента и защитного барьера. Они проявляют повышенную устойчивость к стрессовым факторам, в том числе, к антимикробным агентам. Биопленки являются серьезной проблемой в здравоохранении и причиной значительных экономических потерь в медицине и промышленности (Peng, 2016).

Устойчивость таких прикрепленных сообществ на поверхности растений способствует переносу патогенов с сельскохозяйственных растений к людям (Barak, Liang, 2008; Teplitzki et al., 2009; Steenackers et al., 2012; Amrutha et al., 2017). Биопленки, формируемые некоторыми видами сальмонелл на поверхности эпителиальных клеток и камней в желчном пузыре человека, являются резервуаром бактерий, ответственных за хрониче-

ские и острые инфекции (Steenackers et al., 2012; Gunn et al., 2014). Биопленки, образуемые сальмонеллами на поверхности материалов, используемых на фермах, бойнях, в пищевой промышленности и в домашнем хозяйстве, также представляют собой важную проблему для пищевой промышленности. Они могут вызывать вспышки пищевых инфекций и экономические потери вследствие контаминации продукции и порчи оборудования (Giaouris et al., 2012; De Oliveira et al., 2014; Borges et al., 2018). Проблемы с биопленками сальмонелл усугубляются их повышенной устойчивостью к антибиотикам, вследствие чего разработка новых подходов к борьбе с биопленками является актуальной.

Биосурфактанты – это поверхностно-активные метаболиты, синтезируемые бактериями, дрожжами и грибами. Обладая амфифильной структурой, сурфактанты являются отличными эмульсифицирующими, диспергирующими и вспенивающими агентами. Их преимущества перед химически синтезируемыми сурфактантами включают

малую токсичность, восприимчивость к биодegradации, разнообразие применений и эффективность в экстремальных условиях (Pascua-Plascencia et al., 2011). Благодаря этим привлекательным чертам, биосурфактанты широко применяются во многих областях, включая фармакологическую, биомедицинскую и пищевую промышленность. Кроме того, они обладают антибактериальными, противогрибковыми и противовирусными свойствами. Широкий спектр антибактериальной активности биосурфактантов связан с их способностью нарушать целостность клеточных мембран и клеточных стенок, а также ингибировать рост микроорганизмов (Plaza, Acha, 2020). Они также могут оказаться биодетергентами, полезными для целого ряда медицинских применений (Harshada, 2014). Кроме того, сообщалось об антиадгезивных и антибиопленочных свойствах сурфактантов (Naughton et al., 2019). Они могут влиять на характеристики поверхностей и уменьшать их адгезивные свойства. Поэтому они считаются подходящими для покрытия поверхностей пищевого и биомедицинского назначения, включая стекло, силиконовую резину, хирургические имплантаты и катетеры, а также голосовые протезы (Sadekuzzman et al., 2015).

Целью данной работы было выделить и идентифицировать штамм дрожжей, синтезирующий биосурфактанты. Полученный изолят, а также ранее выделенный штамм, исследовали на предмет способности синтезировать биосурфактанты; были изучены антиадгезивные и антибиопленочные свойства супернатантов, содержащих биосурфактанты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы и выделение биосурфактант-продуцирующего штамма. Образцы почвы, загрязненной сырой нефтью, были отобраны в промышленной зоне вблизи Измира, Турция. Навеску почвы (5 г) добавляли в колбу с 50 мл среды MSM следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.2; K_2HPO_4 – 1.8; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; NaCl – 0.1; NH_4Cl – 4. В качестве источника углерода использовали соевое масло (1%, об.). Колбы инкубировали в течение 7 сут на качалке (150 об./мин) при 27°C.

В данной работе способность к синтезу биосурфактантов была изучена для двух штаммов: нового изолята TY24 и штамма *Y. lipolytica* TEM OS12, выделенного и идентифицированного нами ранее (Yalçın et al., 2018). На следующей стадии супернатанты этих культур использовали в экспериментах по подавлению биопленкообразования.

Штамм сальмонеллы, выделенный нами ранее в птицеводческом хозяйстве, был идентифицирован как *Salmonella enterica* ser. Enteritidis TM6.

Этот изолят использовали в экспериментах по ингибированию биопленкообразования, поскольку ранее была показана его способность образовывать мощные биопленки (Shatila et al., 2020). Штамм был депонирован в Университете Эге, в лабораториях кафедры общей и промышленной микробиологии. Перед экспериментом культуру подращивали в течение ночи в среде Tryptic Soy Broth (TSB) при 37°C.

Приготовление бесклеточных супернатантов (БКС). Штаммы засеивали в 250-мл колбы Эрленмейера с 50 мл среды MSM и соевым маслом (1%, об.). Колбы инкубировали, как описано выше. Затем клетки отделяли центрифугированием в течение 25 мин при 3600 g. Далее супернатанты стерилизовали фильтрацией через 0.22-мкм мембраны ("Sartorius Minisart", Германия). Бесклеточные супернатанты исследовали на предмет наличия биосурфактантов.

Гемолитическая активность. Гемолитическую активность определяли на кровяном агаре с 5% (об.) свежей овечьей крови. БКС (100 мкл) вносили в лунки в агаре, сделанные стерильным пробочным сверлом. Чашки инкубировали 48 ч при 30°C. Прозрачные зоны вокруг лунок указывали на наличие гемолитической активности (Youssef et al., 2004).

Липолитическая активность. Продукцию липаз определяли на солодово-дрожжевом пептонном агаре (среда MYGPA) с 1% (об.) трибутирина. БКС (100 мкл) вносили в лунки в агаре, чашки инкубировали при 28°C в течение 48–72 ч. Зоны гало вокруг лунок, возникшие в результате гидролиза трибутирина, указывали на наличие липолитической активности.

Метод со СТАВ агаром. Метод с цетримониум бромидом-метиленовым синим (СТАВ-МВ) использовали для определения наличия внеклеточных анионных сурфактантов. В MSM агар добавляли 0.2 г/л СТАВ и 0.005 г/л метиленового синего (Siegmond, Wagner, 1991). БКС (100 мкл) вносили в лунки в агаре. Чашки инкубировали 48–72 ч при 30°C, а затем выдерживали 48 ч при 4°C для развития окрашивания. Образование темно-синего гало указывало на присутствие биосурфактантов гликолипидного типа.

Вытеснение масла. Тест проводили, как было описано ранее (Yalçın et al., 2018). Дистиллированную воду (40 мл) вносили в чашки Петри. Использованное моторное масло (3 мл) равномерно наносили поверх слоя воды. В центр масляного слоя вносили БКС исследуемых дрожжевых штаммов (0.5 мл) и измеряли диаметр образующейся прозрачной зоны. В качестве положительного и отрицательного стандартов использовали 1% СДС (в./об.) и стерильную среду. Приведены средние результаты трех экспериментов в виде среднее ± ± среднеквадратичное отклонение.

Тест с парафилом М. БКС (25 мкл) наносили на гидрофобную поверхность парафила М и через 60 с определяли размер и форму капель. Положительным считался результат, при котором капля была не сферической, а ее диаметр превышал 4 мм. В качестве положительного и отрицательного стандартов использовали 1% СДС (в./об.) и стерильную среду.

Метод уплощения капли. Тест проводили как описано ранее (Youssef et al., 2004), с небольшими модификациями. Использованное машинное масло (2 мкл) вносили в ячейки стерильного планшета. Планшет оставляли на 24 ч при комнатной температуре, после чего вносили БКС (20 мкл) в каждую ячейку. Если капля растекалась по покрытой маслом поверхности, результат считали положительным.

Поверхностное натяжение. Поверхностное натяжение (мН м^{-1}) определяли для БКС штаммов *Y. lipolytica* OS12 и TY24. Измерения проводили на тензиометре Krüss K6 (“KRÜSS GmbH”, Германия) по методу дю Нуи (отрыва кольца). Показаны средние результаты трех измерений при комнатной температуре. В качестве положительного и отрицательного стандартов использовали 1% СДС (в./об.) и стерильную среду (Gudiña et al., 2010).

Молекулярная идентификация штамма TY24. ДНК выделяли, как описано ранее (Liu et al., 2000). Для амплификации ITS1-5.8S рРНК-ITS2 и D1/D2 доменов 26S рРНК генов использовали праймеры ITS1-ITS4 и NL1-NL4 соответственно. Последовательности праймеров: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS4 (5'-TCC TCC CC GCT TAT TGA TATG C-3'), NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') и NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'). Амплификацию проводили на устройстве Gradient Palm-Cycler model CGI-96 (“Corbett Life Science”) в течение 40 циклов при следующих условиях: денатурация – 1 мин при 95°C; отжиг – 1 мин при 58°C; элонгация – 2 мин при 72°C; и финальная элонгация – 10 мин при 72°C. ПЦР-продукты секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL (“Applied Biosystems”, США). Эволюционную историю полученных последовательностей определяли с использованием метода Neighbor Joining (Saitou, Nei, 1987). Филогенетические деревья строили с использованием программы Mega X (Kumar et al., 2018). Эволюционные расстояния вычисляли по методу Тамура–Ней (Tamura, Nei, 1993). Анализировали 11 и 12 нуклеотидов для ITS1-5.8S рРНК-ITS2 и D1/D2 домена 26S рРНК генов соответственно. Финальный набор данных для ITS1-5.8S рРНК-ITS2 и D1/D2 домена 26S рРНК генов включал 655 и 3138 позиций соответственно. Значения bootstrap-поддержки для 1000 деревьев указаны в узлах ветвле-

ния (Felsenstein, 1985). Последовательности всех типовых штаммов, использованных для построения филогенетического дерева, были получены из базы данных NCBI GenBank.

Образование биопленок *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. Для штамма *Salmonella* Enteritidis, использованного в работе, было ранее показано активное образование биопленок. В ячейки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл среды LB без NaCl, инокулировали их штаммом сальмонеллы и инкубировали 24 ч в статических условиях при 37°C. Затем вносили кристаллический фиолетовый (CV) и определяли образование биопленок, как описано ранее (Shatila et al., 2020).

Антиадгезивная и антибиопленочная активность БКС. БКС из культур штаммов *Y. lipolytica* TY24 и TEM OS12 использовали для изучения ингибирования биопленок. Для исследования антиадгезивного эффекта БКС (200 мкл) вносили в каждую ячейку 96-луночного планшета. После 18-ч инкубации при 4°C, ячейки ополаскивали стерильным PBS. Ячейки инокулировали, и образование биопленок проходило в условиях, описанных выше. Через 24 ч вносили кристаллический фиолетовый для определения биопленкообразования, как описано выше.

Антибиопленочный эффект оценивали также по модифицированному методу, предложенному Khiralla et al. (2015). Различные объемы БКС (10, 20, 40, 60 и 80 мкл) инкубировали с 50 мкл суточной культурой сальмонеллы в ячейках, содержащих 100 мкл LB без NaCl. Объем в контрольных ячейках доводили до того же значения, что в эксперименте, добавляя стерильную среду вместо БКС. Контроль стерильности содержал неинокулированную среду. Через 24 ч вносили кристаллический фиолетовый для определения биопленкообразования, как описано выше. Значения оптической плотности в эксперименте сравнивали со значениями в контроле.

Процент ингибирования вычисляли согласно уравнению:

$$\text{Ингибирование (\%)} = \frac{OD(c) - OD(t)}{OD(c)} \times 100,$$

где $OD(c)$ и $OD(t)$ – значения OD_{590} в контроле и в опыте соответственно.

Статистический анализ. Данные анализировали, используя программный пакет GraphPad. Результаты представлены как среднее \pm среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продукция биосурфактантов дрожжевыми штаммами. Для определения способности изучаемых штаммов синтезировать биосурфактанты использовали несколько качественных и количественных ме-

Таблица 1. Образование биосурфактантов исследуемыми штаммами

Штамм/образец	HA	LA	СТАВ	DC	PM	ODD(см)/ODA(см ²)	ST (мН м ⁻¹)
TY24	β-Гемолиз	+	+	+	+	6.0 ± 0.5/28.27	33.5 ± 1
TEM OS12	β-Гемолиз	+	+	+	+	5.0 ± 0.4/19.64	35.5 ± 1
SDS			+	+	+	7.0 ± 0.5/38.48	38 ± 1
MSM			–	–	–	0.8 ± 0.2/0.50	57.5 ± 1

Примечание. HA – гемолитическая активность; LA – липолитическая активность; СТАВ – рост на СТАВ-МВ агаре; DC – уплощение капли; PM – тест с Parafilm; ODD – вытеснение масла, см; ODA – площадь вытеснения масла, см²; ST – поверхностное натяжение, мН м⁻¹; SDS – положительный контроль, 1% додецилсульфат натрия; MSM – отрицательный контроль, среда MSM.

тодов. Оба штамма обладали β-гемолитической и липолитической активностью. На СТАВ-МВ агаре вокруг их колоний образовывались темно-синие зоны. Капли БКС, нанесенные на поверхность масла или парафила М, имели больший диаметр, чем в контроле. БКС из культур штамма TY24 и *Y. lipolytica* TEM OS12 вытесняли масло на 6 и 5 см соответственно. Поверхностное натяжение снижалось с 57.5 до 33.5 и 35.5 мН м⁻¹ соответственно. Таким образом, БКС изученных штаммов понижали поверхностное натяжение на 41.7 и 38.3%, что выше значения для положительного контроля (33.91%). Эти результаты указывают на продукцию сурфактантов (табл. 1, рис. 1).

Молекулярный анализ штаммов-продуцентов биосурфактантов. В результате ПЦР амплификации ITS1-5.8S-ITS2 и 26S рРНК регионов штамма TY24 были получены ампликоны длиной 350 и 565 пн. После сравнения с последовательностями, доступными в базе данных GenBank с помощью BLASTN, они были депонированы в базу данных NCBI. Была показана принадлежность исследуемого изолята к виду *Yarrowia lipolytica* с гомологией свыше 99.50% (табл. 2). Филогенетический анализ ITS1-5.8S рРНК-ITS2 (рис. 2а) и

домена D1/D2 26S рРНК (рис. 2б) показал также близкое родство двух исследуемых штаммов и других штаммов, доступных в базе данных NCBI.

Антибиопленочная и антиадгезивная активность штаммов *Y. lipolytica*. Было изучено ингибирование формирования биопленок *Salmonella Enteritidis* в присутствии супернатантов культур двух штаммов *Y. lipolytica*. Хотя антиадгезивный эффект не был отмечен, при инкубации бактерий с различными объемами БКС образование биопленок тормозилось. Антибиопленочный эффект проявлялся сильнее при большем объеме внесенного супернатанта. При увеличении объема супернатанта *Y. lipolytica* TEM OS12 с 10 до 80 мкл, ингибирование биопленкообразования возрастало с 86 до 89.42% (рис. 3а). В случае *Y. lipolytica* TY24, аналогичное увеличение объема БКС (с 10 до 80 мкл) приводило к увеличению антибиопленочной активности с 13.34 до 88.09% (рис. 3б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Низкая эффективность существующих методов борьбы с биопленками, а также возрастающая устойчивость биопленкообразующих бактерий к

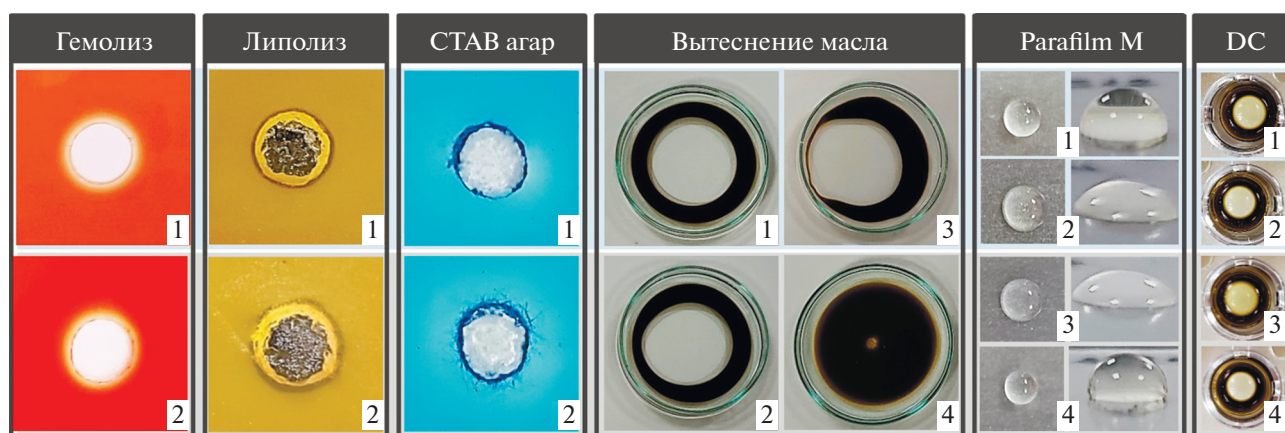


Рис. 1. Продукция биосурфактантов исследованными штаммами: *Y. lipolytica* OS12 (1); штамм TY24 (2); SDS (3); MSM (4); DC – уплощение капли.

Таблица 2. Молекулярная идентификация исследованных дрожжевых штаммов

Изолят	ITS1-5.8S-ITS2 rRNA регион			D1/D2 домен 26S рРНК регион			Вид
	размер ПЦР продукта, пн	гомология, %	№ в GenBank	размер ПЦР продукта, пн	гомология, %	№ в GenBank	
TY24	350	99.64	KC148193.1	565	99.60	KC148201.1	<i>Y. lipolytica</i>
TEM OS12	285	100	KY275473.1	457	100	KY275493.1	<i>Y. lipolytica</i>

антибиотикам вынуждают исследователей искать новые, более эффективные подходы. С другой стороны, различные группы биосурфактантов известны своими антибиопленочными свойствами, в частности, липопептиды, псевдофактин и гликолипиды. Интерес к биосурфактантам дрожжевого происхождения поддерживается отнесением ряда видов родов *Candida*, *Yarrowia* и *Pseudozyma* к группе GRAS (Generally Regarded As Safe, в общем полагаемые безопасными) (Amaral et al., 2010).

Способность дрожжей *Yarrowia lipolytica* (ранее *Candida lipolytica*) синтезировать ряд ценных метаболитов, включая липазы и биосурфактанты, хорошо известна (Janek et al., 2020; Radha et al., 2020). Целью данной работы была оценка продукции биосурфактантов новым изолятом (идентифицированным нами как *Y. lipolytica* TY24) и ранее описанным штаммом (*Y. lipolytica* TEM OS12) (Yalçın et al., 2018).

Для скрининга поверхностно-активных агентов было разработано несколько качественных и количественных методов. Тем не менее, ограничения каждого метода делают необходимым применение нескольких подходов для точного и успешного скрининга (Walter et al., 2010; Sidkey et al., 2016). Поэтому в данной работе был использован ряд качественных и количественных тестов для определения способности изучаемых штаммов производить биосурфактанты. Наши результаты аналогичны представленным ранее (Pendse, Aruna, 2018; Yalçın et al., 2018, Eldin et al., 2019).

В первую очередь была изучена гемолитическая активность штаммов. Это предварительный качественный тест, основанный на визуальном наблюдении гемолиза, возможно, указывающего на повреждение мембран в присутствии поверхностно-активных молекул (Youssef et al., 2004; Satpute et al., 2010; Eldin et al., 2019). В работе Sidkey et al. (2016) в качестве потенциальных продуцентов биосурфактантов отбирали только штаммы, вызывающие полный гемолиз на кровяном агаре (β -гемолитические штаммы). Поскольку штаммы, исследованные в данной работе, были способны вызывать тотальный гемолиз, они были классифицированы как потенциальные продуценты биосурфактантов.

Затем был исследован рост штаммов на СТАВ-МВ агаре. Положительный результат этого теста

подтвердил наличие внеклеточных анионных биосурфактантов. Образование синей зоны было вызвано образованием нерастворимых соединений с СТАВ (катион) и метиленовым синим (Walter et al., 2010; Sidkey et al., 2016; Pendse, Aruna, 2018; Eldin et al., 2019).

Капли БКС из культур обоих изученных штаммов уплощались и распространялись по поверхности гидрофобного масла или парафила М. Оба эти теста являются качественными и зависят от способности сурфактанта дестабилизировать капли жидкости, которую связывают со способностью биосурфактантов понижать межфазовое натяжение между каплей и гидрофобной поверхностью (Youssef et al., 2004; Pendse, Aruna, 2018).

Для оценки продукции биосурфактантов был также использован метод вытеснения масла. Площадь, с которой вытесняется масло, зависит от количества биосурфактантов и их эффективности (Walter et al., 2010; Eldin et al., 2019). В данной работе было показано, что супернатанты из культур штаммов *Y. lipolytica* TY24 и TEM OS12 вытесняли масло на 6 и 5 см соответственно. На следующей стадии после этих предварительных тестов определяли поверхностную активность БКС. Поверхностное натяжение – это мера межфазовой или поверхностной активности жидкостей. Культура считается перспективной, если при добавлении БКС поверхностное натяжение жидкости снижается до 40 или ниже либо более чем на 20 мН м^{-1} (Walter et al., 2010). В данной работе супернатанты изученных культур понижали поверхностное натяжение с 57.5 до 33.5 и 35.5 мН м^{-1} соответственно. В соответствии с требованиями, описанными выше, исследованные штаммы можно считать перспективными либо хорошими продуцентами биосурфактантов.

После того, как было показано наличие биосурфактантов в БКС исследованных штаммов *Y. lipolytica*, провели исследование ингибирования биопленкообразования штаммом *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. Применение бесклеточных супернатантов привлекательно тем, что позволяет снизить стоимость производства (Pontes et al., 2016). Однако применение биосурфактантов дрожжевого происхождения в исследованиях биопленок ограничено. Rufino et al. (2011) вносили в ячейки планшета различные концентрации биосурфак-

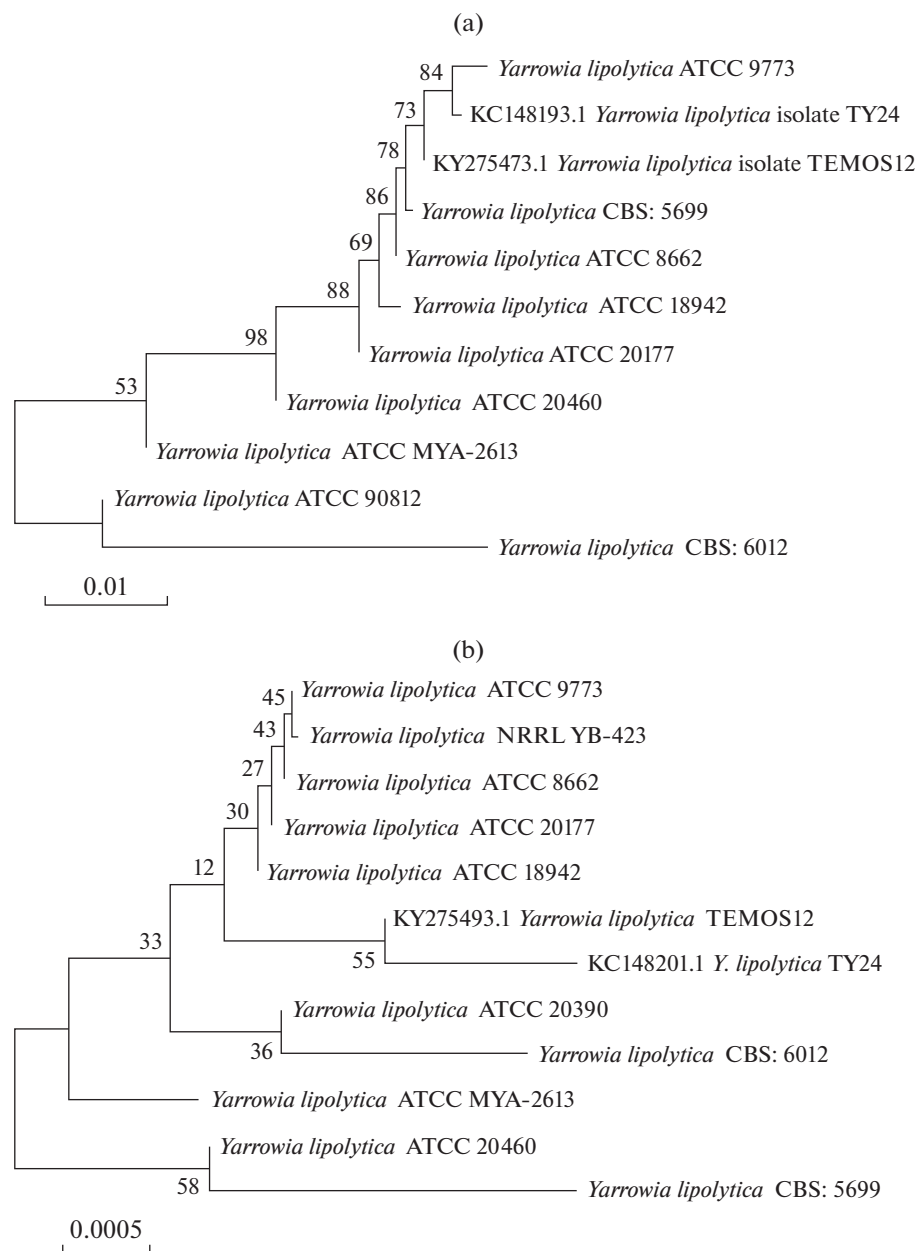


Рис. 2. Филогенетические деревья исследованных штаммов *Yarrowia lipolytica*, основанные на последовательностях ITS1-5.8S-ITS2 регионов (а) и домена D1/D2 26S рДНК (б).

танта Rufisan, полученного из *Candida lipolytica* UCP 0988. Подавление биопленок, сформированных различными штаммами *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, зависело от концентрации неочищенного биосурфактанта. В некоторых случаях уровень ингибирования достигал 99%. Luna et al. (2011) сообщали о способности неочищенного биосурфактанта из культуры *Candida sphaerica* подавлять на 80–92% образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus sanguis* 12. De Rienzo et al. (2015) сообщали

о способности софоролипидов, выделенных из *Candida bombicola* ATCC 22214 (5%, об.), разрушать зрелые биопленки, образованные *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 и *B. subtilis* ВВК006. Очищенные софоролипиды, выделенные из *Starmerella bombicola* MTCC1910, также ингибировали формирование биопленок *Candida albicans*, снижали их жизнеспособность и влияли на их архитектуру и на морфологию включенных в биопленку клеток (Haque et al., 2015). Haque et al. (2017) также подтвердили роль софоролипидов как агентов доставки сочетания софоролипид-амфотерицин В против

био пленок *Candida*. В данной работе также сообщается о подавлении био пленок, образуемых *Salmonella* Enteritidis, на 86–89.42 и 13.34–88.09% при совместной инкубации с возрастающими объемами содержащих биосурфактанты супернатантов из культур *Y. lipolytica* TEM OS12 и *Y. lipolytica* TY24. Ранее также сообщалось, что повышенный объем БКС вызывал более выраженное подавление бактериальных био пленок (Khiralla et al., 2015; Koohestani et al., 2018).

Одновременный синтез биосурфактантов и липазы позволяет микроорганизмам утилизировать водонерастворимые субстраты и улучшает ассимиляцию нефти (Hu et al., 2018; Singh et al., 2018). Кроме того, Pendse и Aruna (2018) сообщали, что продуценты липазы могут быть также продуцентами биосурфактантов, поэтому мы также исследовали наличие липазной активности на трибутириновом агаре. Этот тест был предложен как удобный метод обнаружения микроорганизмов – продуцентов биосурфактантов (Balan et al., 2017). В данной работе мы также сообщаем о способности изученных штаммов *Y. lipolytica* синтезировать липазу, что, возможно, также влияло на способность подавлять био пленки *Salmonella* Enteritidis. Роль липаз как антибио пленочных агентов отмечалась ранее (Kiran et al., 2014; Aykin et al., 2019).

В данной работе в ячейках, покрытых содержащим биосурфактант БКС, не наблюдалась антиадгезивная активность. Это может объясняться низкой концентрацией биосурфактанта в супернатанте. Альтернативное объяснение – неспособность активного ингредиента в супернатанте влиять на свойства поверхности таким образом, чтобы ингибировать образование био пленок (Abu Sayem et al., 2011).

Помимо этого, в настоящей работе была изучена способность двух штаммов *Yarrowia lipolytica* продуцировать биосурфактанты, а также их антибио пленочная и антиадгезивная активность против био пленок, образуемых штаммом *Salmonella* Enteritidis. Насколько нам известно, это первое сообщение об антибио пленочной и антиадгезивной активности супернатантов из культур штаммов *Yarrowia* против био пленок, сформированных *Salmonella* spp. Антибио пленочный эффект, наблюдавшийся нами, вероятно, связан с наличием биосурфактантов, поэтому дальнейшие исследования будут сконцентрированы на применении неочищенных и/или очищенных биосурфактантов. Кроме того, не исключен анализ различных компонентов бесклеточного супернатанта с целью выявления других антибио пленочных агентов.

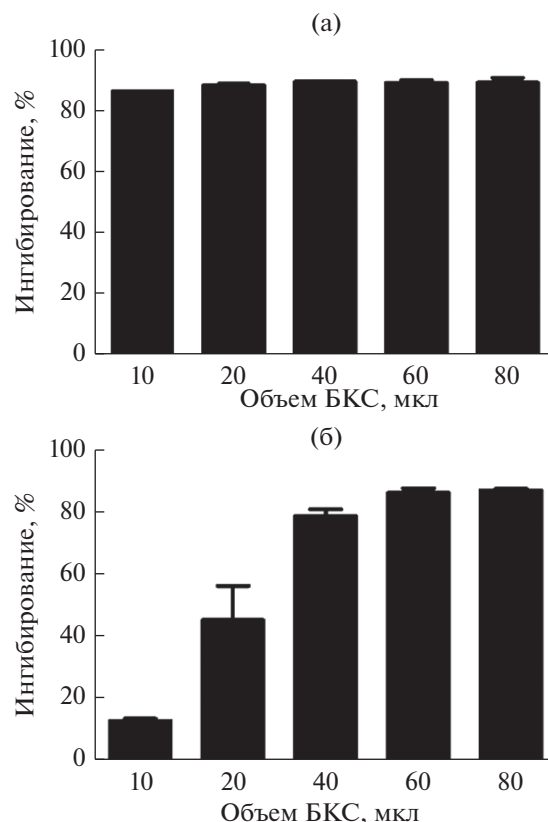


Рис. 3. Процент ингибирования био пленок *Salmonella* Enteritidis в присутствии различных объемов бесклеточных супернатантов культур *Y. lipolytica* TEM OS12 (а) и *Y. lipolytica* TY24 (б).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны профессору İhsan Yaşa за предоставление штамма *Salmonella* Enteritidis strain.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abu Sayem S.M., Manzo E., Ciavatta L., Ramice A., Cordone A., Zandardino A., De Felice M., Varcamonti M. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis* // Microb. Cell. Fact. 2011. V. 10. Art. 74.
- Amaral P.F.F., Coelho M.A.Z., Marrucho I.M.J., Coutinho J.A.P. Biosurfactants from yeasts: Characteristics, production and application // Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology / Ed. Sen R. New York: Springer, 2010. P. 236–249.

- Amrutha B., Sundar K., Halady P.S. Study on *E. coli* and *Salmonella* biofilms from fresh fruits and vegetables // *J. Food. Sci. Technol.* 2017. V. 54. P. 1091–1097.
- Aykin E., Omuzbuken B., Kacar A. Microfouling bacteria and the use of enzymes in eco-friendly antifouling technology // *J. Coat. Technol. Res.* 2019. V. 16. P. 847–856.
- Balan S.S., Kumar C.G., Jayalakshmi S. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: Purification, characterization and its biological evaluation // *Microbiol. Res.* 2017. V. 194. P. 1–9.
- Barak J.D., Liang A.S. Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in *Salmonella enterica* contamination of tomato plants // *PLoS One.* 2008. V. 3. Art. 1657.
- Borges K.A., Furian T.Q., Souza S.N., Menezes R., Tondo E.C., Salle C.T.P., Morales H.L.S., Nascimento V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions // *Pesqui. Vet. Bras.* 2018. V. 38. P. 71–76.
- De Rienzo M.A.D., Banat I.M., Dolman B., Winterburn J., Martin P.J. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agents // *N. Biotechnol.* 2015. V. 32. P. 720–726.
- De Oliveira D.C., Fernandes J.A., Kaneno R., Silva M.G., Araujo J.J.P., Silva N.C., Rall V.L. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material // *Foodborne Pathog. Dis.* 2014. V. 11. P. 478–483.
- Eldin A.M., Kamel Z., Hossam N. Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods // *Microchem. J.* 2019. V. 146. P. 309–314.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. V. 39. P. 783–791.
- Giaouris E., Chorianopoulos N., Skandamis P., Nychas G.J. Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments // *Salmonella – a Dangerous Foodborne Pathogen* / Ed. Barakat S.M.M. Croati: InTech, 2012. P. 157–180.
- Gudiña E.J., Rocha V., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. A20 // *Lett. Appl. Microbiol.* 2010. V. 50. P. 419–424.
- Gunn J.S., Marshall J.M., Baker S., Dongol S., Charles R.C., Ryan E.T. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence // *Trends Microbiol.* 2014. V. 22. P. 648–655.
- Haque F., Alfatah M.D., Ganesan K., Bhattacharyya M.S. Inhibitory effect of sophorolipid on *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth // *Sci. Rep.* 2015. V. 6. v23575.
- Haque F., Sajid M., Singh S.C., Batacharyya S. Anti-biofilm activity of a sophorolipid- amphotericin B niosomal formulation against *Candida albicans* // *Biofouling.* 2017. V. 33. P. 768–779.
- Harshada K. Biosurfactant: A potent antimicrobial agent // *J. Microbiol. Exp.* 2014. V. 1. P. 173–177.
- Hu X., Cheng T., Liu J. A novel *Serratia* sp. ZS6 isolate derived from petroleum sludge secretes biosurfactant and lipase in medium with olive oil as sole carbon source // *AMB Express.* 2018. V. 8. 165.
- Janek T., Mirończuk A., Rymowicz W., Dobrowolski A. High-yield expression of extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica* and its interactions with lipopeptide biosurfactants: a biophysical approach // *Arch. Biochem. Biophys.* 2020. V. 689. Art. 108475.
- Khiralla G.M., Mohamed E.A.H., Farag A.G., Elhariry H. Antibiofilm effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus planatum* cell-free supernatants against some bacterial pathogens // *J. Biotech. Res.* 2015. V. 6. P. 86–95.
- Kiran G.S., Lipton A.N., Kennedy J., Dobson A.D.W., Selvin J. A halotolerant thermostable lipase from the marine bacterium *Oceanobacillus* sp. PUMB02 with an ability to disrupt bacterial biofilms // *Bioengineered.* 2014. V. 5. P. 305–318.
- Koohestani M., Moradi M., Tajik J., Badali A. Effects of cell free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus* // *Vet. Res. Forum.* 2018. V. 9. P. 301–306.
- 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.
- Liu D., Coloe S., Braid R., Pedersen J. Rapid mini preparation of fungal DNA for PCR // *J. Clin. Microbiol.* 2000. V. 38. P. 471.
- Luna J.M., Rufino R.D., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R.M., Teixeira J.A.C., De Campos-Takaki G.M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP0995 // *Curr. Microbiol.* 2011. V. 62. P. 1527–1534.
- Naughton P.J., Marchant R., Naughton V., Banat I.M. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries // *J. Appl. Microbiol.* 2019. V. 127. P. 12–28.
- Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. P. 633–654.
- Pendse A., Aruna K. Use of various screening methods for isolation of potential biosurfactant producing microorganism from oil-contaminated soil samples // *J. Pharm. Res.* 2018. V. 12. P. 599–605.
- Peng D. Biofilm formation of *Salmonella* // *Microbial Biofilms – Importance and Applications* / Eds. Dhanasekaran D., Thajuddin N. UK: Intech Open, 2016. P 21.
- Plaza G., Achal V. Biosurfactants: eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. Art. 2152.
- Pontes C., Alves M., Sanos C., Ribeiro M.H., Gonçalves L., Bettencourt A.F., Ribeiro I.A.C. Can sophorolipids prevent biofilm formation on silicone catheter tubes? // *Int. J. Pharm.* 2016. V. 513. P. 697–708.
- Radha P., Prabhu K., Jayakumar A., Abilash Karthik S., Ramani K. Biochemical and kinetic evaluation of lipase and biosurfactant assisted *ex novo* synthesis of microbial oil for biodiesel production by *Yarrowia lipolytica* utilizing chicken tallow // *Process Biochem.* 2020. V. 95. P. 17–29.
- Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R.M., Teixeira J.A.C., Campos-Takaki G.M. Antimicrobial and antiadhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 // *Colloids Sur.* 2011. V. 84. P. 1–5.

- Sadekuzzaman M., Yang S., Mizan M.F.R., Ha S.D.* Current and recent advanced strategies for combating biofilms // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2015. V. 14. P. 492–509.
- Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
- Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., Chopade B.A.* Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010. V. 30. P. 127–144.
- Shatila F., Yaşa I., Yalçın H.T.* Inhibition of *Salmonella enteritidis* biofilms by *Salmonella* invasion protein-targeting aptamer // *Biotechnol. Lett.* 2020. V. 42. P. 1963–1974.
- Sidkey N.M., Mohamed H.F., Elkhoully H.* Evaluation of different screening methods for biosurfactant producers isolated from contaminated Egyptian samples grown on industrial olive oil processing waste // *Br. Microbiol. Res. J.* 2016. V. 17. P. 1–19.
- Siegmund I., Wagner F.* New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar // *Biotechnol. Tech.* 1991. V. 5. P. 265–268.
- Singh P., Patil Y., Rale V.* Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies // *J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 126. P. 2–13.
- Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J.* *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication // *Food. Res. Int.* 2012. V. 45. P. 502–531.
- Tamura K., Nei M.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Mol. Biol. Evol.* 1993. V. 10. P. 512–526.
- Teplitski M., Barak J.D., Schneider K.R.* Human enteric pathogens in produce: un-answered ecological questions with direct implications for food safety // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009. V. 20. P. 166–171.
- Walter V., Syldatk C., Hausman R.* Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 672. P. 1–13.
- Yalçın H.T., Ergin-Tepebaşı G., Uyar E.* Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives // *J. Basic. Microbiol.* 2018. V. 58. P. 782–792.
- Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms // *J. Microbiol. Methods.* 2004. V. 56. P. 339–347.

Screening of Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica* Strains and Evaluation of Their Antibiofilm and Anti-Adhesive Activities against *Salmonella enterica* ser. Enteritidis Biofilms

F. Shatila¹, E. Uyar², and H. T. Yalçın¹, *

¹Ege University, Faculty of Science, Biology Department, Basic and Industrial Microbiology Section, Izmir, Turkey

²Harran University, Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Molecular Biology Section, Sanliurfa, Turkey

*e-mail: tanselozturk@hotmail.com

Received January 20, 2021; revised February 19, 2021; accepted February 19, 2021

Abstract—A yeast strain (TY24) isolated from a soil sample, and a previously characterized *Y. lipolytica* TEM OS12 strain were screened for their ability to produce biosurfactants. Positive results were revealed for both strains on CTAB-MB agar plates, by the drop collapse method, parafilm M Test, and oil displacement method. The yeast isolate TY24 and *Y. lipolytica* TEM OS12 also produced lipases, demonstrated β -hemolytic activity, and decreased the surface tension from 57.5 to 33.5 and 35.5 (mN m⁻¹), respectively. The newly isolated strain was identified as *Y. lipolytica* TY24 using ITS1-5.8S rRNA-ITS2 and D1/D2 domain of 26S rRNA regions. Co-incubation of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis with increasing volumes of biosurfactant-containing supernatants from the cultures of *Y. lipolytica* TEM OS12 and *Y. lipolytica* TY24 prevented biofilm formation by 89.42 and 88.09%, respectively. The biosurfactant-containing CFS produced by the tested yeast strains inhibited *S. Enteritidis* biofilms efficiently.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, screening, biosurfactant, *Salmonella* biofilms, antibiofilm activity

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ ВАЗОПРЕССИНА И ОКСИТОЦИНА МИКРООРГАНИЗМАМИ

© 2022 г. Ю. В. Наточин^{а, б, *}, О. Г. Орлова^б, О. В. Рыбальченко^б, Е. И. Шахматова^а

^аИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

^бСПбГУ, Медицинский факультет, Санкт-Петербург, 199106 Россия

*e-mail: natochin1@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2021 г.

После доработки 30.07.2021 г.

Принята к публикации 30.07.2021 г.

Установлена способность лактобактерий *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 секретировать нейрогомоны аргинин вазопрессин и окситоцин при выращивании на плотной и в жидкой питательных средах. Найдена зависимость увеличения концентрации секретируемых гормонов от времени роста суспензионной культуры *L. plantarum* 8РА-3. Способность секретировать окситоцин слабо выражена у *Escherichia coli* М17, *Staphylococcus aureus* К4 и не обнаружена у *Micrococcus luteus* С6. Добавление этих гормонов и антагонистов их рецепторов в жидкую питательную среду не влияло на скорость роста клеток *L. plantarum* 8РА-3.

Ключевые слова: лактобактерии, нейрогомоны, вазопрессин, окситоцин

DOI: 10.31857/S0026365621060100

Согласно одной из теорий микроорганизмы появились на Земле около 4 млрд лет назад (Розанов, 2009). В процессе эволюции происходило их взаимодействие с прокариотами, простейшими и многоклеточными организмами (Oleskin, Shenderov, 2020). Микроорганизмы секретируют в окружающую среду физиологически активные вещества, в частности, окситоцин (ОТ), которые могут влиять как на функции многоклеточных организмов (Шпаков, 2009), так и на клетки самих бактерий (Бухарин и соавт., 2018). Известно, что в кровь млекопитающих секретируются такие нонапептиды, как аргинин вазопрессин (АВП) и ОТ, а микробиота оказывает влияние на различные физиологические функции человека (Peters, 2019). Для объяснения механизма увеличения концентрации ОТ в макроорганизме под влиянием бактерий была высказана гипотеза о том, что они выделяют метаболиты, способствующие секреции ОТ в мозг (Varian et al., 2017). Однако можно было предположить, что пробиотические бактерии сами способны в кишке секретировать нейрогомоны, которые всасываются в кровь человека.

Задача настоящей работы заключалась в выяснении возможности секреции бактериальными клетками АВП и ОТ и исследовании их влияния на рост бактерий.

Бактериальные культуры *Staphylococcus aureus* К4 и *Micrococcus luteus* С6 получены из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, культура *Escherichia*

coli М17 выделена из препарата Колибактерин (“Микроген”, Россия), *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 – из препарата Флорин® форте (“АВАН ООО”, Россия).

Культуры *E. coli* М17, *S. aureus* К4 и *M. luteus* С6 выращивали в жидкой (бульон Мюллера-Хинтона; “HiMedia”, Индия) и на плотной питательных средах (ППС) (агар Мюллера-Хинтона; “HiMedia”, Индия). Клетки *L. plantarum* 8РА-3 выращивали в жидкой (бульон Рогоза; “HiMedia”, Индия) и на плотной питательной среде (агар Рогоза; “HiMedia”, Индия). Выращивание бактерий проводили в стандартных условиях при температуре 37°C.

Рост бактерий анализировали, исследуя оптическую плотность суспензионных культур на спектрофотометре UNICO 2800 (Россия) при λ 560 нм, и при высеве проб методом Коха для определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл среды. Для иммуноферментного анализа гормонов пробы брали в исходном периоде, через 6 и 24 ч, центрифугировали 5 мин при 6 тыс. об./мин, отбирали супернатант и хранили при температуре –70°C. Концентрацию АВП и ОТ измеряли, используя наборы для иммуноферментного анализа “Enzo Life Sciences Inc.” (США). Считывание оптической плотности осуществляли в 96-луночных планшетах по методике тест-системы на автоматическом ридере ELx808 (“Bio-Tek Instruments”, США). Сравнение между группами проводили с использованием *t*-критерия.

Таблица 1. Секретия вазопрессина и окситоцина бактериальными клетками на плотной питательной среде

Виды бактерий	Время, ч	АВП пмоль/мл	ОТ пмоль/мл
<i>S. aureus</i> K4	6	0.0	0.040 ± 0.008
<i>M. luteus</i> C6		0.0	0.0
<i>L. plantarum</i> 8PA-3		0.092 ± 0.006	0.0
<i>E. coli</i> M17		0.0	0.0
<i>S. aureus</i> K4	24	0.0	0.0
<i>M. luteus</i> C6		0.0	0.032 ± 0.004
<i>L. plantarum</i> 8PA-3		0.214 ± 0.015	0.0
<i>E. coli</i> M17		0.0	0.056 ± 0.010

Примечание. Данные о концентрации гормонов представлены за вычетом показателей АВП и ОТ в питательной среде в исходном периоде.

рия Стьюдента для попарно связанных вариантов. Данные представлены в виде $M \pm m$, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

В физиологических экспериментах использовали АВП и ОТ (“Sigma-Aldrich”, США), антагонист V_{1a} -рецепторов (Pmp-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂) и антагонист рецепторов ОТ (Pmp-Tyr(Me)-Ile-Thr-Asn-Cys-Pro-Orn-OH) (“Bachem”, Швейцария). Растворы АВП, ОТ в концентрации 10^{-9} М или антагонистов их рецепторов 2×10^{-7} М добавляли в объеме 20 мкл в 2 мл бактериальной суспензии культур в интервалы времени 0, 3, 6 ч.

При выращивании *L. plantarum* 8PA-3 выявлена способность секретировать АВП и ОТ, концентрация которых в жидкой питательной среде возрастала пропорционально длительности выращивания (рис. 1). Секретия ОТ обнаружена и у *S. aureus* K4; концентрация этого гормона в среде в течение 6 ч с начала эксперимента возрастала до 0.035 ± 0.005 пмоль/мл. Дальнейший рост стафилококков в жидкой питательной среде не приводил к увеличению концентрации ОТ. В суспензионных культурах *M. luteus* C6 и *E. coli* M17 секретия ОТ не была выявлена.

Развитие на ППС биопленок у большинства исследуемых видов бактерий не сопровождалось секретией АВП, она была выявлена на всех этапах выращивания у лактобактерий, при этом образование этими клетками ОТ не отмечалось (табл. 1). В клетках *S. aureus* K4 секретия ОТ определялась к 6 ч выращивания культуры, но не была обнаружена при последующей инкубации. Напротив, на начальных этапах выращивания клеток *M. luteus* C6 на ППС секретия ОТ не определялась, однако наличие ОТ в небольшой кон-

центрации регистрировали к 24 ч развития культуры (табл. 1). Аналогичная картина отмечена и в отношении клеток *E. coli* M17.

Для изучения влияния АВП и ОТ на рост лактобактерий проводили эксперименты с добавлением этих гормонов или антагонистов в среду выращивания *L. plantarum* 8PA-3. Если секретируемые бактериями нейрогормоны способны регулировать их физиологические функции, то добавление ОТ или АВП в среду выращивания могло бы влиять на скорость роста культуры, а введение в эту же среду антагонистов рецепторов блокировать эффект секретируемых гормонов. В исследованиях с добавлением к бактериальным культурам антагонистов рецепторов этих нонапептидов не было обнаружено их влияния на скорость роста культур (табл. 2).

Известно, что у млекопитающих синтез АВП и ОТ происходит в нейросекреторных клетках гипоталамуса, они поступают в нейрогипофиз, откуда секретируются в кровь (Bankir et al., 2017). Эти гормоны влияют на разные подтипы V-рецепторов, меняя функцию клеток почечных канальцев (Natochin, Golosova, 2020). Ранее показано, что добавление лактобактерий *L. reuteri* в рацион мышей приводит к возрастанию концентрации ОТ в плазме крови, что объясняли стимуляцией ядер гипоталамуса метаболитами, продуцируемыми этими бактериями (Varian et al., 2017).

В нашей работе выявлена способность лактобактерий секретировать нейрогормоны, а концентрация ОТ в бактериальной культуре (рис. 1) и в сыровотке крови мышей оказалась сопоставимой (Poutahidis et al., 2013). АВП и ОТ, продуцируемые бактериями в полость кишки, могут влиять на функции организма-хозяина, что может быть обусловлено всасыванием ОТ или АВП из кишки в

Таблица 2. Влияние агонистов и антагонистов рецепторов окситоцина и вазопрессина на рост *L. plantarum* 8PA-3

Эксперимент ОООО	Продолжительность выращивания, ч		
	0	6	24
	КОЕ/мл		
Контроль	4.81×10^3	6.76×10^7	7.22×10^{10}
ОТ, 10^{-9} М	4.81×10^3	7.82×10^7	6.32×10^{10}
Антагонист ОТ, 2×10^{-7} М	4.80×10^3	4.32×10^7	7.73×10^{10}
АВП, 10^{-9} М	4.81×10^3	6.10×10^7	5.40×10^{10}
Антагонист АВП, 2×10^{-7} М	4.81×10^3	7.01×10^7	3.42×10^{10}

физиологически активной нерасщепленной форме гормона. Согласно стандартной схеме, белки и полипептиды в содержимом желудочно-кишечного тракта гидролизуются до аминокислот и дипептидов. Нами показано, что часть пептидов, в том числе нонапептиды, например, АВП, могут всасываться в кишке нерасщепленными и поступать в кровь человека и животных (Наточин и соавт., 2003). На основании этих данных можно предположить, что нейрогормоны, образуемые в кишке бактериями, могут всасываться в кровь. Это является еще одним аргументом в пользу широкого применения в пищу содержащих лактобактерии кисломолочных продуктов. По мнению Caldwell et al. (2017), лактобактерии, наряду с положительным действием на процесс пищеварения, по-видимому, способствуют секреции молока и влияют на другие физиологические функции благодаря поступлению в кровь женщин ОТ.

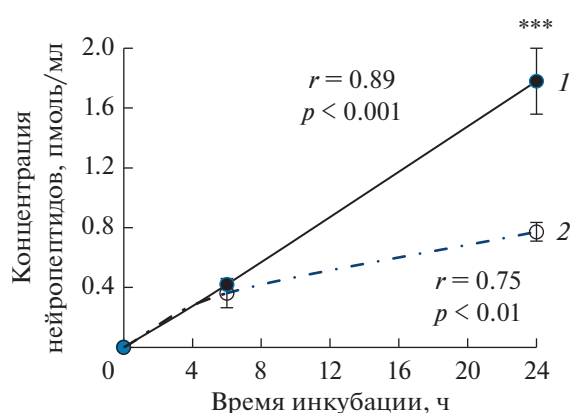


Рис. 1. Динамика секреции нонапептидов клетками *L. plantarum* 8PA-3 в суспензионной культуре. Абсцисса — время (ч), ордината — концентрация нонапептидов (пмоль/мл). Условные обозначения: 1 — АВП; 2 — ОТ. *** $p < 0.001$ — достоверность отличий секреции за 24 ч между АВП и ОТ; $n = 6$ для каждого опыта; r — коэффициент корреляции Пирсона.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00776-19-02.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бухарин О.В., Стадников А.А., Перукова Н.Б. Роль окситоцина и микробиоты в регуляции взаимодействий про- и эукариот при инфекции. Екатеринбург: УрО РАН, ФГБУН ОФИЦ ИКВС, 2018. 247 с.
- Наточин Ю.В., Пруцкова Н.П., Шахматова Е.И., Груздков А.А., Громова Л.В. Исследование возможности всасывания интактных нонапептидов в изолированной тонкой кишке крыс *in vivo* // Докл. АН. 2003. Т. 388. № 4. С. 558–561.
- Natochin Yu.V., Prutsikova N.P., Shakhmatova E.I., Gruzdkov A.A., Gromova L.V. Absorption of intact nonapeptides in an isolated loop of the rat small intestine: an *in vivo* study // Dokl. Biol. Sci. 2003. V. 388. P. 18–20.
- Розанов А.Ю. Псевдоморфозы по микробам в метеоритах // Проблемы происхождения жизни / Под ред. Розанова А.Ю., Лопатина А.В., Снытниковой В.Н. М.: ПИН РАН, 2009. С. 158–165.
- Шпаков А.О. Пептидные аутоиндукторы бактерий // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 291–303.
- Shpakov A.O. Peptide autoinducers of bacteria // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 291–303.
- Bankir L., Bichet D.G., Morgenthaler N.G. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation // J. Int. Med. 2017. V. 282. P. 284–297.

Caldwell H.K., Aulino E.A., Freeman A.R., Miller T.V., Witchey Sh.K. Oxytocin and behavior: Lessons from knock-out mice // *Dev. Neurobiol.* 2017. V. 77. P. 190–201.

Natochin Yu.V., Golosova D.V. Vasopressin receptor subtypes and renal sodium transport // *Vitamins and Hormones.* 2020. V. 113. P. 239–258.

Oleskin A.V., Shenderov B.A. Microbial Communication and Microbiota-Host Interactions / Biomedical, Biotechnological, and Biopolitical Implications. Hauppauge (New York): Nova Science Publ. 2020. 256 p.

Peters N. Identifying the role of vasopressin and oxytocin in the microbiota-gut-brain-behavior axis. Dissertation,

Georgia State University, 2019.

https://scholarworks.gsu.edu/neurosci_diss/45

Poutahidis Th., Kearney S.M., Levkovich T., Qi P., Varian B.J., Lakritz J.R., Ibrahim Y.M., Chatzigiagkos A., Alm E.J., Erdman S.E. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. 1–17. Art. e78898.

Varian B.J., Poutahidis Th., DiBenedictis B.T., Levkovich T., Ibrahim Y., Didyk E., Shikhman L., Cheung H.K., Hardas A., Ricciardi C.E., Kolandaivelu K., Veenema A.H., Alm E.J., Erdman S.E. Microbial lysate upregulates host oxytocin // *Brain Behav. Immun.* 2017. V. 61. P. 36–49.

Vasopressin and Oxytocin Secretion by Microorganisms

Yu. V. Natochin^{1, 2, *}, O. G. Orlova², O. V. Rybalchenko², and E. I. Shakhmatova¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 194223 Russia*

²*Medical Faculty, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199106 Russia*

*e-mail: natochin1@mail.ru

Received June 30, 2021; revised July 30, 2021; accepted July 30, 2021

Abstract—The ability of *Lactobacillus plantarum* strain 8RA-3 to secrete neurohormones arginine vasopressin and oxytocin when grown on solid and liquid nutrient media was established. An increase in the concentration of secreted hormones was found to depend on duration of the cultivation time of an *L. plantarum* 8PA-3 suspension culture. The ability to secrete oxytocin was poorly expressed in *Escherichia coli* M17 and *Staphylococcus aureus* K4 and was not found in *Micrococcus luteus* C6. The addition of these hormones and their receptor antagonists to the liquid nutrient medium did not affect the growth rate of *L. plantarum* 8PA-3 cells.

Keywords: lactic acid bacteria, neurohormones, vasopressin, oxytocin