

ISSN 0026-3656

Том 92, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



МИКРОБИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 92, номер 6, 2023

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Methylomonas montana* sp. nov., первый непигментированный метанотроф
рода *Methylomonas*, выделенный из донных отложений горной реки
Р. З. Сулейманов, Е. Н. Тихонова, И. Ю. Ошкин, О. В. Данилова, С. Н. Дедыш 535
- Транскриптомный анализ покоящихся цистоподобных клеток *Escherichia coli*
Ю. А. Николаев, Н. Г. Лойко, О. А. Галуза, А. В. Марданов, А. В. Белецкий,
Д. Г. Дерябин, Е. В. Демкина, Г. И. Эль-Регистан 545
- Аноксигенные фототрофные бактерии меромиктического озера Большие Хрусломены
(о. Олений, Кандалакшский залив, Мурманская область, Россия)
О. Н. Лунина, Д. С. Груздев, С. В. Пацаева, А. А. Жильцова, Н. Е. Сузина,
Е. Д. Краснова, Д. А. Воронов, Н. М. Кокрятская,
Е. Ф. Веслополова, А. С. Саввичев 564
- Филогенетическое разнообразие прокариотных сообществ поверхностных слоев
донных отложений Кандалакшского залива Белого моря
Д. В. Бадмадашиев, А. Р. Строева, А. А. Клюкина,
Е. Н. Полудеткина, Е. А. Бонч-Осмоловская 581
- Состав микробных сообществ как индикатор состояния водоемов, расположенных
на морском побережье (на примере залива Канда,
Кандалакшский залив Белого моря)
А. С. Саввичев, Н. А. Демиденко, В. В. Кадников, В. В. Беленкова,
И. И. Русанов, В. М. Горленко 595
- Особенности влияния экстрактов лишайников и лихенофильных грибов
на рост *in vitro* клинически значимых микроорганизмов
Т. А. Панкратов, Р. Е. Щербатов, А. А. Дельцов 609
- Осмолиты и липиды конидий ксерогалофильного микромицета *Aspergillus penicillioides*
О. А. Данилова, Е. А. Януцевич, А. Б. Антропова, В. М. Терёшина 617
- Распространенность способности подавления роста родственных штаммов у ризобий
Ал. Х. Баймиев, А. А. Владимирова, Р. Т. Матниязов, А. М. Лавина,
К. Ю. Филяева, Е. С. Акимова, Ан. Х. Баймиев 625

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Действие бактериоцина субтилозина П19 на споры *Bacillus anthracis*
В. Д. Похиленко, В. Н. Герасимов, С. К. Жиглецова, Т. А. Калмантаев,
И. А. Чукина, Р. И. Миронова, А. Р. Гайтрафимова 631

Contents

Vol. 92, No. 6, 2023

Experimental Articles

- Methylomonas montana* sp. nov., the First Unpigmented Methanotroph of the Genus *Methylomonas*, Isolated from Mountain River Sediments
R. Z. Suleimanov, E. N. Tikhonova, I. Y. Oshkin, O. V. Danilova, S. N. Dedysch 535
- Transcriptome Analysis of *Escherichia coli* Dormant Cystlike Cells
Yu. A. Nikolaev, N. G. Loiko, O. A. Galuza, A. V. Mardanov, A. V. Beletskii,
D. G. Deryabin, E. V. Demkina, and G. I. El'-Registan 545
- Anoxygenic Phototrophic Bacteria of the Meromictic Lake Bol'shie Khruslomeny (Oleniy Island, Kandalaksha Gulf, Murmansk Oblast, Russia)
O. N. Lunina, D. S. Grouzdev, S. V. Patsaeva, A. A. Zhil'tsova, N. E. Suzina,
E. D. Krasnova, D. A. Voronov, N. M. Kokryatskaya,
E. F. Veslopolova, and A. S. Savvichev 564
- Phylogenetic Diversity of Prokaryotic Communities of the Upper Sediment Layers of the Kandalaksha Gulf, White Sea
D. V. Badmadashiev, A. R. Stroeva, A. A. Klyukina,
E. N. Poludetkina, and E. A. Bonch-Osmolovskaya 581
- Microbial Community Composition as an Indicator of the State of Basins Located at the Sea Coast (Exemplified by the Kanda Bay, Kandalaksha Gulf, White Sea)
A. S. Savvichev, N. A. Demidenko, V. V. Kadnikov, V. V. Belenkova,
I. I. Rusanov, and V. M. Gorlenko 595
- Effect of the Extracts from Lichens and Lichenophilic Fungi on *in vitro* Growth of Clinically Significant Microorganisms
T. A. Pankratov, R. E. Shcherbatov, and A. A. Del'tsov 609
- Osmolytes and Lipids of the Conidia of the Xerohalophilic Micromycete *Aspergillus penicillioides*
O. A. Danilova, E. A. Ianutsevich, A. B. Antropova, and V. M. Tereshina 617
- Isolation, Characterization, Bioactivity, and Antioxidant Properties of Lipopolysaccharides of Occurrence of the Ability to Suppress the Growth of Related Strains in Rhizobia
Al. Kh. Baymiev, A. A. Vladimirova, R. T. Matniyazov, A. M. Lavina, K. Yu. Filyaeva,
E. S. Akimova, and An. Kh. Baymiev 625
-

Short Communications

- Effect of the Bacteriocin Subtylostin P19 on *Bacillus anthracis* Spores
V. D. Pokhilenko, V. N. Gerasimov, S. K. Zhigletsova, T. A. Kalmantaev, I. A. Chukina,
R. I. Mironova, and A. R. Gajtrafimova 631
-
-

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

***METHYLOMONAS MONTANA* SP. NOV., ПЕРВЫЙ
НЕПИГМЕНТИРОВАННЫЙ МЕТАНОТРОФ РОДА *METHYLOMONAS*,
ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ГОРНОЙ РЕКИ**

© 2023 г. Р. З. Сулейманов^а, Е. Н. Тихонова^а, И. Ю. Ошкин^а, О. В. Данилова^а, С. Н. Дедыш^а, *

^а Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ

“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: dedysh@mail.ru

Поступила в редакцию 19.07.2023 г.

После доработки 25.07.2023 г.

Принята к публикации 27.07.2023 г.

Аэробные метанотрофные бактерии рода *Methylomonas* населяют широкий спектр местообитаний, включающий пресноводные водоемы, осадки рек, болота, рисовые чеки, покрывающие почвы свалок и переувлажненные почвы. Подавляющее большинство ныне описанных видов этого рода представлены нейтрофильными, подвижными, растущими на метане палочковидными бактериями, пигментация которых варьирует от желтой до розовой и красной. В настоящей работе описан новый, непигментированный изолят этих бактерий, штамм MW1^T, который был выделен из донных отложений горной реки Хоста (Краснодарский край, Россия). Штамм MW1^T рос на метане и метаноле в диапазоне температур от 8 до 37°C (с оптимумом 25–30°C) и диапазоне pH 5.5–7.5 (с оптимумом 6.3–7.0). Последовательность гена 16S рРНК штамма MW1^T обнаруживала 95.48–98.47% сходства с таковыми у ранее описанных видов *Methylomonas*. Ближайшим таксономически охарактеризованным филогенетическим родственником штамма MW1^T являлся *M. fluvii* EbB^T, выделенный из осадков реки Эльба. Полная последовательность генома, определенная для штамма MW1^T, имела размер 4.6 млн нт., содержала 3 оперона рРНК и около 4200 белок-кодирующих генов, включая кластер генов *pmoCAB* мембранной метанмонооксигеназы. Растворимая метанмонооксигеназа в геноме не закодирована. Содержание пар Г + Ц в ДНК составило 52.4%. Сходство нуклеотидной последовательности генома штамма MW1^T с последовательностями геномов ранее описанных представителей рода *Methylomonas* составило от 79.4 до 82.1%. Мы предлагаем классифицировать этот штамм как представителя нового вида рода *Methylomonas*, *M. montana* sp. nov. Штамм MW1^T (=VKM 3737^T = UQM 41536^T) является типовым штаммом нового вида.

Ключевые слова: метанотрофные бактерии, род *Methylomonas*, *Methylomonas montana*, рост на метане, пресноводные осадки, анализ генома

DOI: 10.31857/S0026365623600426, **EDN:** ВРСТВQ

Род *Methylomonas* принадлежит к семейству *Methylococcaceae* класса *Gamma*proteobacteria и объединяет аэробных метанотрофных бактерий, единственными источниками углерода и энергии которых являются метан и метанол (Bowman, 2016). Ключевым ферментом этих бактерий является мембранная метанмонооксигеназа (мММО), осуществляющая окисление метана в метанол, которая локализуется во внутрицитоплазматических мембранах (ВЦМ) I типа, характерных для метанотрофных представителей *Gamma*proteobacteria. Растворимая метанмонооксигеназа (рММО) также присутствует у некоторых штаммов рода *Methylomonas*, однако примеры таких организмов немногочисленны (Auman, Lidstrom, 2002; Bussmann et al., 2021). Ассимиляция углерода у *Methylomonas* spp. осуществляется по рибулозомонофосфатному пути

(Bowman et al., 1993). В качестве источников азота эти метанотрофы используют нитрат, нитрит, аммоний и мочевины; некоторые представители рода способны фиксировать атмосферный азот (Auman et al., 2001; Ogiso et al., 2012; Danilova et al., 2013).

Метанотрофные бактерии рода *Methylomonas* населяют широкий спектр местообитаний, включающий пресноводные водоемы (Auman, Lidstrom, 2002), осадки рек (Bussmann et al., 2021), болотные экосистемы (Kip et al., 2011; Данилова, Дедыш, 2014), рисовые чеки (Dianou et al., 2012), воды шахт (Bowman et al., 1990; Kalyuzhnaya et al., 1999), покрывающие почвы свалок (Chen et al., 2007) и очистные сооружения (Hoefman et al., 2014; Chang et al., 2021).

В настоящее время род *Methylomonas* включает 10 видов с валидно опубликованными именами: *M. methanica* (Whittenbury, Krieg, 1984), *M. aurantiaca*, *M. fodinarum* (Bowman et al., 1990), *M. scandinavica* (Kalyuzhnaya et al., 1999), *M. koyamae* (Ogiso et al., 2012), *M. lenta* (Hoefman et al., 2014), *M. paludis* (Danilova et al., 2014), *M. albis*, *M. fluvii* (Bussmann et al., 2021) и *M. rapida* (Tikhonova et al., 2023). Еще два вида этого рода, “*M. denitrificans*” (Kits et al., 2015) и “*M. rhizoryzae*” (Zhu et al., 2020), также были предложены, но пока не вошли в число валидированных. Подавляющее большинство ныне охарактеризованных изолятов этого рода являются подвижными палочковидными бактериями, оптимально растущими в нейтральном диапазоне значений pH и температур от 25 до 35°C. Исключения составляют умеренно ацидофильный *M. paludis* (Danilova et al., 2014), а также психротолерантные *M. scandinavica* (Kalyuzhnaya et al., 1999), *M. albis* и *M. fluvii* (Bussmann et al., 2021).

Специфической особенностью всех охарактеризованных к настоящему времени *Methylomonas* spp. является наличие пигментации клеток, которая варьирует от желтой до розовой и красной. У представителей видов *M. paludis*, *M. lenta* и *M. albis* пигментация выражена слабо, но, тем не менее, она имеется (Danilova et al., 2014; Hoefman et al., 2014; Bussmann et al., 2021). Анализ состава каротиноидных пигментов у *M. rapida* показал, что они представлены ликопином и его производными (Tikhonova et al., 2023).

Настоящая работа была посвящена изучению морфологических, физиологических, ростовых и геномных характеристик нового непигментированного изолята рода *Methylomonas*, штамм MW1^T, выделенного из донных отложений горной реки Хоста, Краснодарский край. На основании результатов проведенных исследований мы предлагаем отнести штамм MW1^T к новому виду рода *Methylomonas*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения и условия культивирования. Штамм MW1^T был выделен в 2021 г. из проб донных отложений реки Хоста, Краснодарский край, Россия (43°53'33.48" N, 39°87'82.47" E), отобранных в небольшой заводи.

Для получения накопительных культур аликвоту донных отложений (20 мл) вносили во флаконы объемом 500 мл, добавляя 100 мл разбавленной минеральной среды NMS (dNMS) следующего состава (г л⁻¹): KNO₃ – 0.4; MgSO₄ · 7H₂O – 0.4; CaCl₂ · 2H₂O – 0.08; 1% (об./об.) 0.2 М фосфатного буфера (pH 6.5) и 0.1% (об./об.) раствора микроэлементов для метанотрофов (Гальченко, 2001) следующего состава (г/л): ЭДТА – 5; FeSO₄ · 7H₂O – 2; ZnSO₄ · 7H₂O – 0.1; MnCl₂ · 4H₂O – 0.03; CoCl₂ ·

H₂O – 0.2; CuCl₂ · 5H₂O – 0.1; NiCl₂ · 6H₂O – 0.02; Na₂MoO₄ – 0.03. Содержание метана в газовой фазе доводили до 30 об. %. Культивирование проводили на шейкере-инкубаторе Biosan ES-20/60 при 150 об./мин при 25°C. Мониторинг роста метанотрофов в накопительных культурах осуществляли визуально и с использованием фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Axioplan 2 (“Zeiss”, Йена, Германия), с увеличением ×1000. Через 10 сут инкубации обогащенную метанотрофными бактериями накопительную культуру подвергали предельным разведениям: 0.5 мл суспензии клеток смешанной культуры последовательно разводили во флаконах общим объемом 60 мл, с добавлением 5 мл среды dNMS. Флаконы герметично закрывали, вводили метан шприцем с бактериальным фильтром 0.22 мкм до 30% CH₄ в газовой фазе и инкубировали на качалке (150 об./мин) при комнатной температуре в течение 2 сут. Культуру, выросшую во флаконе с наибольшим разведением, анализировали с помощью фазово-контрастной микроскопии и подвергали последующему рассеву. Процедуру повторяли до получения культуры, состоящей из морфологически одинаковых клеток, после чего клеточные суспензии высевали на аналогичную агаризованную среду dNMS. Чашки Петри инкубировали при комнатной температуре в эксикаторах, содержащих около 30% (об./об.) метана в газовой фазе. Колонии, появляющиеся на чашках, отбирали и повторно рассевали на агаризованную среду. Чистоту полученных изолятов проверяли с помощью фазово-контрастной микроскопии и рассевом на разбавленный в 10 раз агар Луриа–Бертани (1.0% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1.0% NaCl).

Электронная микроскопия. Для электронной микроскопии клетки экспоненциально растущей культуры осаждали центрифугированием и фиксировали 2.5% (вес/об.) раствором глутаральдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) в течение 1 ч при 4°C, а затем фиксировали в OsO₄ (1% раствор; вес/об.) с добавлением рутениевого красного (конечная концентрация в растворе 0.5% (вес/об.) в том же буфере в течение 4 ч при 20°C. После фиксации образцы последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата в 30% этаноле в течение 4 ч, затем в 70% этаноле в течение 12 ч при 4°C. Материал обезвоживали в 96%-ном этиловом спирте (2 обработки по 15 мин), затем в абсолютном ацетоне (3 обработки по 10 мин). Образцы заливали в эпоксидную смолу Epon 812 (Epoxy Embedding Medium Epon® 812, “Sigma-Aldrich”, США). Ультратонкие срезы делали на микротоме LKB-III (“LKB”, Швеция), контрастировали 3% водным раствором уранилацетата (при 37°C, 20 мин), затем цитратом свинца при 37°C в течение 20 мин (Reynolds, 1963). Электрон-

но-микроскопические исследования проводили на базе ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН. Ультратонкие срезы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM 100CXII (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотодокументирование материалов осуществляли с помощью цифровой системы вывода оптических изображений Morada G2 (“Olympus”, Япония).

Экстракция ДНК. Культуру штамма MW1^T выращивали в жидкой среде dNMS в течение 24 ч при 25°C на шейкер-инкубаторе при 150 об./мин. Суспензию клеток центрифугировали при 12000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант сливали, а осадок использовали для экстракции геномной ДНК по стандартному протоколу с использованием СТАВ – фенол/хлороформ (Wilson, 2001).

Идентификация изолята. Идентификацию штамма MW1^T проводили путем анализа последовательности гена 16S рРНК, ПЦР-амплификацию которого осуществляли с использованием универсальных для бактерий праймеров 9F/1492R (Weisburg et al., 1991). Для очистки ПЦР-амплифицированных фрагментов использовали набор Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. Секвенирование гена 16S рРНК проводили на базе ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН. Редактирование полученных последовательностей осуществляли в программе BioEdit. Построение филогенетических дендрограмм производили с использованием программного пакета MEGAX (Kumar et al., 2018) методом максимального правдоподобия. Статистическую достоверность дендрограмм рассчитывали с помощью “bootstrap”-анализа путем построения 1000 альтернативных деревьев.

Физиологические характеристики. Физиологические тесты проводили в жидкой среде dNMS с метаном в газовой фазе. Рост штамма MW1^T контролировали путем измерения OD₆₀₀ в течение 2 сут в различных условиях, включая температуру 4–40°C, pH 5.0–8.0 и концентрации NaCl 0–3.0% (вес/об.). Варьирование pH достигали смешиванием 0.1 М растворов H₃PO₄, KH₂PO₄ и K₂HPO₄. Диапазон потенциальных ростовых субстратов исследовали путем внесения в среду следующих источников углерода в концентрации 0.05% (вес/об.): метанол, этанол, формиат, глюкоза, фруктоза, галактоза, ацетат, пируват, малат, сукцинат, цитрат, глутамин, пропионат, казаминовые кислоты, дрожжевой экстракт. Способность штамма MW1^T к росту на метаноле тестировали на жидкой среде dNMS, содержащей 0.05–3% (об./об.) метанола. Источники азота тестировали путем замены KNO₃ в dNMS на следующие соединения в концентрации 0.01% (вес указанных со-

единений/об.): (NH₄)₂SO₄, NaNO₂, мочевины, аланин, серин, глицин, глутамин, формамид, дрожжевой экстракт, казаминовые кислоты, пептон. Проверку способности к фиксации атмосферного азота проводили на жидкой среде dNMS без источника азота во флаконах с пониженным содержанием O₂ в газовой фазе (2 об. %).

Геномное секвенирование и аннотирование. Секвенирование ДНК проводили с использованием технологий Illumina и Oxford Nanopore. Библиотеку для секвенирования на приборе MiSeq (“Illumina”, США) готовили с помощью набора NEB-Next ultra II DNA Library kit (“New England Biolabs”, США). Для секвенирования на приборе MinIon (“Oxford Nanopore”, Великобритания) геномную библиотеку готовили с помощью набора 1D Ligation Sequencing Kit SQK-LSK108 (“Oxford Nanopore Technologies”, Великобритания) и секвенировали с использованием ячейки FLO-MIN106 v R9.4.1. Гибридная сборка коротких и длинных прочтений была выполнена с использованием программы Unicycler (Wick et al., 2017).

Аннотацию генома проводили с помощью программы PROKKA (Seemann et al., 2014) и веб-ресурса GhostKOALA (Kanehisa et al., 2016). Построение геномного дерева производили в программе GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2020) посредством множественного выравнивания геномов бактерий семейств *Methylococcaceae* и *Methylocystaceae* по 120 маркерным белкам. Величины сходства последовательностей геномов штамма MW1^T и близкородственных к нему видов проводили с использованием ANI calculator (Rodriguez-R, Konstantinidis, 2014) и Genome-to-Genome-Distance-Calculator (Meier-Kolthoff et al., 2013).

Определенные в работе нуклеотидные последовательности. Полученные в работе последовательности гена 16S рРНК и генома штамма MW1^T депонированы в GenBank под номерами OR237191 и CP129884 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология, ультраструктура клеток и идентификация нового изолята. Штамм MW1^T формировал на агаризованной среде dNMS слизистые разрастания белого цвета (рис. 1а) или же белые круглые выпуклые колонии слизистой консистенции 2–3 мм в диаметре. В жидкой среде изолят рос в виде гомогенной суспензии белого цвета. При росте культур на жидкой среде в статических условиях образования поверхностной пленки не происходило.

Клетки штамма MW1^T были представлены подвижными короткими палочками размером 0.9 ± 0.04 × 1.5 ± 0.2 мкм (рис. 1б). Образование цепочек клеток не наблюдалось. При переходе в стационарную фазу роста клетки обнаруживали

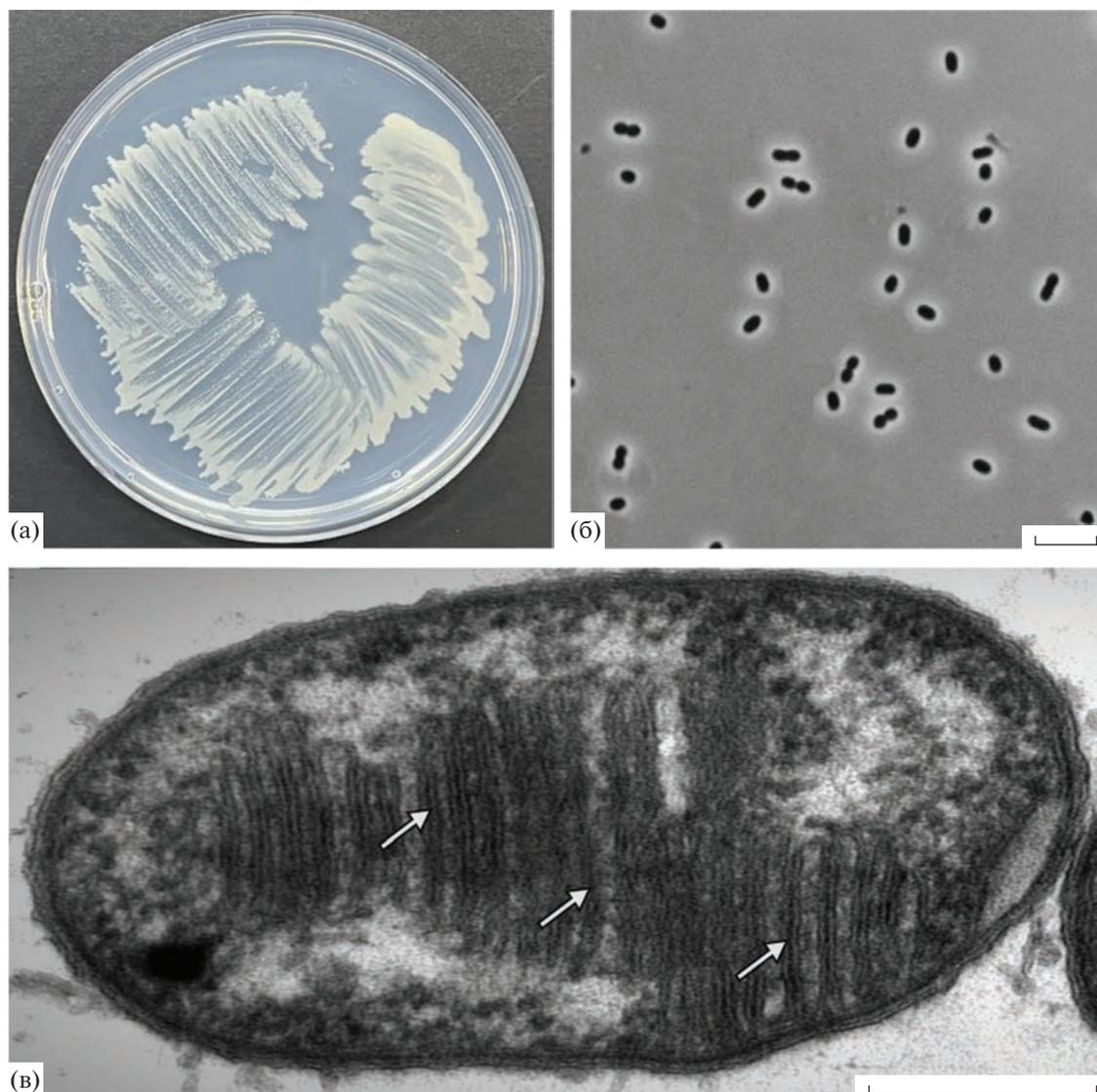


Рис. 1. (а) – Рост штамма MW1^T на агаризованной минеральной среде после недели инкубации в эксикаторах с 30% (об./об.) метана в газовой фазе. (б) – Фазово-контрастные микрофотографии клеток штамма MW1^T; масштабная метка – 5 мкм. (в) – Электронная микрофотография ультратонкого среза клетки штамма MW1^T; масштабная метка – 0,2 мкм. Стопки внутрицитоплазматических мембран указаны белыми стрелками.

тенденцию к образованию крупных (до нескольких мм) агрегатов.

Анализ ультратонких срезов показал типичное строение клеточной стенки грамотрицательных клеток и наличие внутрицитоплазматических мембран (ВЦМ) в виде стопок везикулярных дисков, расположенных перпендикулярно клеточной стенке (рис. 1в). Такое расположение ВЦМ характерно для метанотрофов I типа.

Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма MW1^T показало его принадлежность к роду *Methylomonas* семейства *Methylococcaceae* класса *Gamma*proteobacteria (рис. 2). Ближайшим таксономически охарактеризованным филогенетическим родственником штамма

MW1^T является *M. fluvii* EbV^T, выделенный из осадков реки Эльба (98,47% сходства последовательностей генов 16S рРНК). Сходство последовательности гена 16S рРНК штамма MW1^T с таковыми у других представителей рода *Methylomonas* составило 95,48–98,47%, что позволило сделать предположение о его принадлежности к новому виду этого рода.

Физиологические характеристики. Метан и метанол были единственными субстратами, используемыми штаммом MW1^T. Метанол поддерживал рост в диапазоне концентраций до 3% (об./об.). В качестве источников азота новый изолят использовал нитраты, сульфат аммония, формамид, глутамин, серин, аланин, пептон, казаминовые кис-

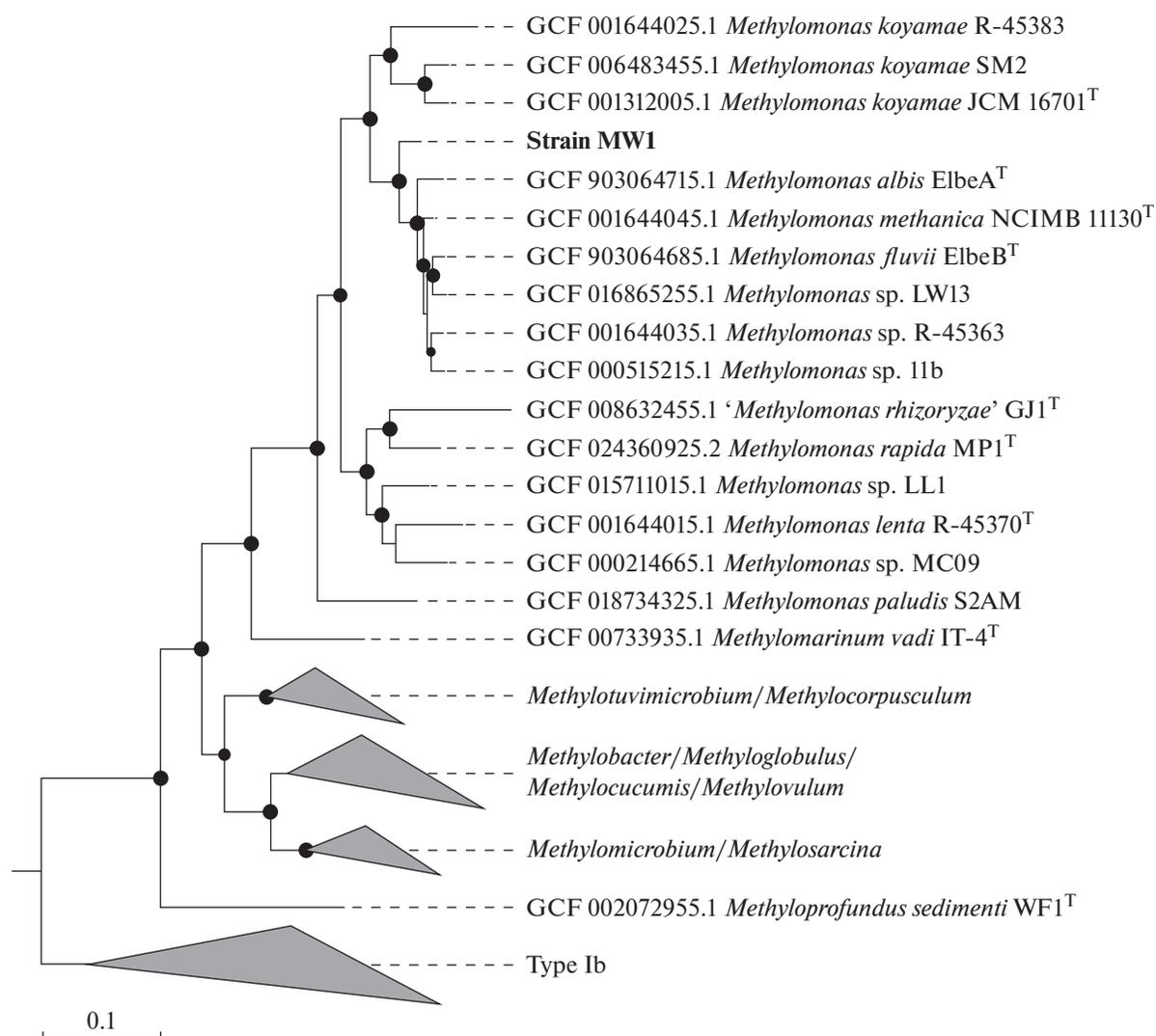


Рис. 3. Филогенетическая дендрогрaмма, построенная на основе сравнительного анализа геномов представителей семейства *Methylococcaceae*. Бутстрэпы рассчитаны методом максимального подобия путем построения 100 альтернативных дендрогрaмм. Показаны значения бутстрэп-анализа >60. В качестве внешней группы использованы геномы метанотрофов семейства *Methylocystaceae*. Маркер – 0.1 замена на одну аминокислотную позицию.

пар Г + Ц в ДНК составило 52.4%. ДНК : ДНК гибридизация *in silico* генома штамма MW1^T с таковыми у филогенетически близких видов рода *Methylomonas* с помощью Genome-to-Genome-Distance-Calculator выявила менее 25% сходства. Наиболее близким организмом являлся *M. fluvii* EbB^T с уровнем сходства $24.7 \pm 2.4\%$. Оценка уровня подобия геномных последовательностей с помощью калькулятора ANI показала 79.4–82.1% сходства штамма MW1^T с представителями других видов рода *Methylomonas*. Полученные величины свидетельствуют о принадлежности MW1^T к новому виду рода *Methylomonas* (рис. 3).

Клетки штамма MW1^T содержали только мембранную форму ключевого фермента окисления метана – метанмонооксигеназы, которая кодиро-

вана единичной копией генного кластера *pmoCAB*. Растворимая ММО в геноме не представлена. Последовательность PmoA штамма MW1^T обнаруживала 95.5–98.8% идентичности с последовательностями PmoA видов *Methylomonas*, ближайшим из которых являлся *M. albis* EbA^T. В геноме штамма MW1^T был идентифицирован полный кластер генов, необходимых для функционирования Ca²⁺-зависимой метанолдегидрогеназы (МДГ) – MxaFI. МДГ катализирует окисление метанола, образующегося в результате монооксигенирования метана. Штамм MW1^T обладал также альтернативной односубъединичной метанолдегидрогеназой (XoxF), которая содержит редкоземельные элементы в активном центре (Hibi et al., 2011). Наряду с некоторыми видами рода *Methylomonas*, новый

Таблица 1. Основные характеристики, отличающие штамм MW1^T от других видов рода *Methylomonas*: 1 – штамм MW1^T; 2 – *M. rapida* MP1^T (Tikhonova et al., 2023); 3 – *M. paludis* MG30^T (Danilova et al., 2013); 4 – *M. albis* EbA^T; 5 – *M. fluvii* EbB^T; 6 – *M. methanica* S1^T (Bowman et al., 1993); 7 – *M. fodinarum* UQM3268^T (Bowman et al., 1990); 8 – *M. aurantiaca* UQM3406^T (Bowman et al., 1990); 9 – *M. scandinavica* SR5^T (Kalyuzhnaia et al., 1999); 10 – *M. koyamae* Fw12E-Y^T (Ogiso et al., 2012); 11 – *M. lenta* R-45377^T (Hoefman et al., 2014)

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Размеры	0.9 × 1.5	1.1 × 2.1	1.3 × 3	0.8 × 2.5	0.8 × 2.5	0.7 × 1.6	0.7 × 1.2	0.6 × 1.3	0.8 × 1.7	0.9 × 1.7	0.9 × 2.0
Пигментация	Белая	Розовая	Бледно-розовая	Бледно-розовая	Розовая	Розовая	Оранжевая	Оранжевая	Розовая	Розово-оранжевая	Бледно-розовая
Формирование цепочек	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–
Подвижность	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+
Температура (оптимум)	8–37 (30)	5–45 (35)	8–30 (25)	1–30 (15)	1–30 (15)	10–37 (25)	10–35 (25)	15–40 (35)	5–30 (15)	10–40 (30)	15–28 (20)
Диапазон pH (оптимум)	5.5–7.5 (6.3–7.0)	5.5–7.8 (7.0)	3.8–7.3 (6.0)	6.0–9.0 (6.0)	5.5–9.0 (6.0)	5.5–9.0 (7.0)	5.5–9.0 (7.0)	5.0–9.0 (6.5)	5.0–9.5 (7.2)	5.5–7.0 (6.5)	6.3–7.8 (7.0)
Максимальное содержание NaCl, %	1	3	1	5	15	1.5	Н.о.	Н.о.	1	0	1
Рост на метаноле	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
pММО	–	–	–	+	+	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	–	–
Фиксация N ₂	+	–	+	±	±	±	+	+	Н.о.	+	–
Содержание Г + Ц в ДНК, %	52.4	52.8	48.5	51.1	51.5	52.0*	58.4*	56.5*	53.3*	57.1	47.0

Примечание. Н.о. – не определено; * – по данным температуры плавления (T_m); “±” – *nif* гены в геноме присутствуют, но активность не обнаружена.

штамм MW1^T был способен к фиксации атмосферного азота, что подтверждается наличием в геноме кластера генов *nifDHK*, кодирующего Мо-Fe нитрогеназу. В геноме штамма MW1^T отсутствуют характерные для большинства представителей рода *Methylomonas* гены 4,4'-диапофитоендесатуразы (*crtN*) и 4,4-диаполикопиноксидазы (*crtP*), что объясняет неспособность штамма к синтезу каротиноидов.

Проведенный нами сравнительный анализ морфологических, физиолого-биохимических и геномных характеристик позволил выявить ряд отличий нового изолята от других представителей рода *Methylomonas* (табл. 1). Отличием штамма MW1^T от всех ранее охарактеризованных видов *Methylomonas* является отсутствие пигментации. Клетки нового изолята не синтезируют каротиноиды, присутствие которых является типичным для представителей рода *Methylomonas*. Штамм MW1^T наиболее близок к недавно описанным видам *M. fluvii* EbV^T и *M. albis* EbA^T, выделенным из речных осадков, однако отличается от них наличием подвижности, повышенной термотолерантностью и неспособностью расти при высоких концентрациях NaCl в среде. Низкие значения сходства нуклеотидной последовательности генома (ANI) и величины ДНК : ДНК гибридизации штамма MW1^T и ныне известных представителей рода позволяет описать его в качестве нового вида рода *Methylomonas*, для которого предлагается видовое название *Methylomonas montana*.

Диагноз нового вида — *Methylomonas montana* sp. nov.

Methylomonas montana sp. nov. (mon.ta'na. L. fem. adj. *montana* — горная).

Одиночные, не образующие цепочек палочковидные подвижные клетки размером $0.9 \pm 0.04 \times 1.5 \pm 0.2$ мкм. Расположение внутрицитоплазматических мембран в клетках характерно для метанотрофов I типа. Колонии непигментированные, кремово-белого цвета, округлые, выпуклые, слизистые. В жидкой среде растут гомогенно, поверхностных пленок не образуют. Облигатные аэробы. Психротолерантные мезофилы и нейтрофилы с оптимумами роста 25–30°C и pH 6.3–7.0. Единственными источниками углерода являются метан и метанол. Метанол поддерживает рост до 3% (об./об.). Не обладают растворимой метанмонооксигеназой. Источниками азота служат соли аммония, нитрат, мочевины, аланин, серин, глутамин, формамид, казаминовые кислоты, пептон и атмосферный азот. NaCl подавляет рост при концентрации в среде выше 1%. Типовым штаммом вида является штамм MW1^T (=VKM В-3737^T = UQM 41536^T), выделенный из донных отложений реки Хоста, Краснодарский край, Россия.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00034). Секвенирование генома штамма MW1^T проведено в рамках выполнения работ по Соглашению № 075-15-2021-1051 с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500 с.
- Данилова О.В., Дедыш С.Н. Численность и разнообразие метанотрофных представителей *Gammaproteobacteria* в северных болотных экосистемах // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 204–214.
- Danilova O.V., Dedysh S.N. Abundance and diversity of methanotrophic *Gammaproteobacteria* in northern wetlands // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 67–76.
- Auman A.J., Speake C.C., Lidstrom M.E. *nifH* sequences and nitrogen fixation in type I and type II methanotrophs // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4009–4016.
- Auman A.J., Lidstrom M.E. Analysis of sMMO-containing type I methanotrophs in Lake Washington sediment // Environ. Microbiol. 2002. V. 4. P. 517–524.
- Bowman J.P., Sly L.I., Cox J.M., Hayward A.C. *Methylomonas fodinarum* sp. nov. and *Methylomonas aurantiaca* sp. nov.: two closely related type I obligate methanotrophs // Syst. Appl. Microbiol. 1990. V. 13. P. 279–287.
- Bowman J.P., Sly L.I., Nichols P.D., Hayward A.C. Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family *Methylococcaceae* includes only the group I methanotrophs // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 43. P. 735–753.
- Bowman J.P. *Methylomonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh. 2016. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01183.pub2>
- Bussmann I., Horm F., Hoppert M., Klings K.-W., Saborowski A., Warnstedt J., Liebner S. *Methylomonas albis* sp. nov. and *Methylomonas fluvii* sp. nov.: two cold-adapted methanotrophs from the river Elbe and emended description of the species *Methylovulum psychrotolerans* // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126248.
- Chang J., Wu Q., Yan X., Wang H., Lee L.W., Liu Y., Liang P., Qiu Y., Huang X. Enhancement of nitrite reduction and enrichment of *Methylomonas* via conductive materials in a ni-

- trite-dependent anaerobic methane oxidation system // Environ. Res. 2021. V. 193. Art. 110565.
- Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: A Toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Chen Y., Dumont M.G., Cebon A., Murrell J.C. Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 2855–2869.
- Danilova O.V., Kulichevskaya I.S., Rozova O.N., Detkova E.N., Bodelier P.L., Trotsenko Y.A., Dedysh S.N. *Methylomonas paludis* sp. nov., the first acid-tolerant member of the genus *Methylomonas*, from an acidic wetland // Syst. Appl. Microbiol. 2013. V. 63. P. 2282–2289.
- Dianou D., Ueno C., Ogiso T., Kimura M., Asakawa S. Diversity of cultivable methane-oxidizing bacteria in microsites of a rice paddy field: investigation by cultivation method and fluorescence in situ hybridization (FISH) // Microbes Environ. 2012. V. 27. P. 278–287.
- Hibi Y., Asai K., Arafuka H., Hamajima M., Iwama T., Kawai K. Molecular structure of La³⁺-induced methanol-dehydrogenase-like protein in *Methylobacterium radiotolerans* // J. Biosci. Bioeng. 2011. V. 111. P. 547–549.
- Hoefman S., Heylen K., De Vos P. *Methylomonas lenta* sp. nov., a methanotroph isolated from manure and a denitrification tank // Syst. Appl. Microbiol. 2014. V. 64. P. 1210–1217.
- Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V.N., Kotelnikova S., Holmquist L., Pedersen K., Trotsenko Y.A. *Methylomonas scandinavica* sp. nov., a new methanotrophic psychrotrophic bacterium isolated from deep igneous rock ground water of Sweden // Syst. Appl. Microbiology. 1999. V. 22. P. 565–572.
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 726–731.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
- Kip N., Dutilh B.E., Pan Y., Bodrossy L., Neveling K., Kwint M.P., Jetten M.S., Op den Camp H.J. Ultra-deep pyrosequencing of *pmoA* amplicons confirms the prevalence of *Methylomonas* and *Methylocystis* in *Sphagnum* mosses from a Dutch peat bog // Environ. Microbiol. Rep. 2011. V. 3. P. 667–673.
- Kits K.D., Klotz M.G., Stein L.Y. Methane oxidation coupled to nitrate reduction under hypoxia by the *Gammaproteobacterium Methylomonas denitrificans*, sp. nov. type strain FJG1 // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. P. 3219–3232.
- 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.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinform. 2013. V. 14. P. 60.
- Ogiso T., Ueno C., Dianou D., Van Huy T., Katayama A., Kimura M., Asakawa S. *Methylomonas koyamae* sp. nov., a type I methane-oxidizing bacterium from floodwater of a rice paddy field in Japan // Syst. Appl. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1832–1837.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 208.
- Rodriguez-R. L.M., Konstantinidis K.V. Bypassing cultivation to identify bacterial species // Microbe. 2014. V. 9. P. 111–118.
- Seemann T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2068–2069.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Tikhonova E.N., Suleimanov R.Z., Miroshnikov K.K., Oshkin I.Y., Belova S.E., Danilova O.V., Ashikhmin A.A., Konopkin A.A., But S.Y., Khmelenina V.N., Pimenov N.V., Dedysh S.N. *Methylomonas rapida* sp. nov., a novel species of fast-growing, carotenoid-producing obligate methanotrophs with high biotechnological potential // Syst. Appl. Microbiol. 2023. V. 46. P. 126398.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.
- Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // PLoS Comput. Biol. 2017. V. 13. e1005595.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2001. V. 56. P. 2–4. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00011-2>
- Zhu P., Cheng M., Pei D., Liu Y., Yan X. *Methylomonas rhizoryzae* sp. nov., a type I methanotroph isolated from the rhizosphere soil of rice // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 2167–2176.

Methylomonas Montana sp. nov., the First Unpigmented Methanotroph of the Genus *Methylomonas*, Isolated from Mountain River Sediments

R. Z. Suleimanov¹, E. N. Tikhonova¹, I. Y. Oshkin¹, O. V. Danilova¹, and S. N. Dedysh^{1, *}

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

*e-mail: dedysh@mail.ru

Received July 19, 2023; revised July 25, 2023; accepted July 27, 2023

Abstract—Aerobic methanotrophic bacteria of the genus *Methylomonas* inhabit a wide spectrum of habitats including freshwater bodies, river sediments, wetlands, rice paddies, landfill cover soils, and hydromorphic soils. Majority of the currently described species of this genus are represented by neutrophilic, motile, grow-

ing on methane rod-shaped bacteria, whose pigmentation varies from yellow to pink and red. This study reports characterization of a novel, unpigmented isolate of these bacteria, strain MW1^T, which was obtained from sediments of the mountain river Khosta, Krasnodar region, Russia. Strain MW1^T grew on methane and methanol within a temperature range of 8–37°C (optimum at 25–30°C) and at pH 5.5–7.5 (optimum at 6.3–7.0). The 16S rRNA gene sequence of strain MW1^T displayed 95.48–98.47% similarity to those in earlier described *Methylomonas*. The closest taxonomically characterized phylogenetic relative of strain MW1^T was *M. fluvii* EbB^T, isolated from the river Elbe sediments. Complete genome sequence of strain MW1^T was 4.6 Mb in size and contained three rRNA operons and about 4200 protein-encoding genes, including the gene cluster *pmoCAB* coding for membrane methane monooxygenase. Soluble methane monooxygenase was not encoded in the genome. The G+C DNA content was 52.4%. The average nucleotide identity of the genome of strain MW1^T with those in earlier described representatives of the genus *Methylomonas* was 79.4–82.1%. We propose to classify this isolate as representing a novel species of the genus *Methylomonas*, *M. montana* sp. nov. Strain MW1^T (=VKM 3737^T = UQM 41536^T) is the type strain of the newly proposed species.

Keywords: methanotrophic bacteria, genus *Methylomonas*, *Methylomonas montana*, growth on methane, freshwater sediments, genome analysis

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ПОКОЯЩИХСЯ ЦИСТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*¹

© 2023 г. Ю. А. Николаев^{a,*}, Н. Г. Лойко^a, О. А. Галуза^a, А. В. Марданов^b, А. В. Белецкий^b,
Д. Г. Дерябин^c, Е. В. Демкина^a, Г. И. Эль-Регистан^a

^a Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ

“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^b Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ

“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^c ФНЦ биологических систем и агротехнологий РАН, Оренбург, 460000 Россия

*e-mail: nikolaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2023 г.

После доработки 19.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

Впервые исследован транскриптом покоящихся клеток *Escherichia coli* (цистоподобных покоящихся клеток). Содержание РНК в одной покоящейся клетке составляет 0.26 фг/кл., что в 13.5 раз меньше, чем в одной клетке растущей культуры. Наличие мРНК в покоящихся клетках *E. coli* показано впервые. Охарактеризованы пулы прочтений генов покоящихся и растущих клеток, а также дифференциальные экспрессии всех генов, рассчитанной по специальному алгоритму, учитывающему среднее количество мРНК в одной клетке. Впервые рассмотрено понятие “гены, активные в каждой клетке популяции”. Выявлено, что не каждый ген, представленный в пуле транскриптов всей популяции, представлен транскриптами в каждой клетке популяции. В каждой клетке популяций покоящихся и растущих клеток *E. coli* представлены транскриптами 21 и 16% генов соответственно. Выявленная разнокачественность клеток по совокупности активных генов является одной из причин (и форм) гетерогенности популяций бактерий. Выявлено 60 генов, активность которых возрастает в 2 и более раз при формировании покоящихся клеток *E. coli*. Это гены, ответственные за активность генома, строение и свойства оболочек клеток, пролиферацию клеток, стрессоадаптацию, образование и функционирование биопленок и коллективное поведение, а также обеспечивающие выживание популяции при прорастании покоящихся клеток.

Ключевые слова: цистоподобные покоящиеся клетки, *Escherichia coli* K12, транскриптом

DOI: 10.31857/S0026365623600372, **EDN:** CLVNBQ

Образование покоящихся форм (ПФ) (англ. – dormant cells) – важнейшая стадия жизни бактериальных популяций, позволяющая им переживать неблагоприятные условия существования, сохранять вид и расширять ареал его обитания (Бухарин и соавт., 2005; Jones, Lennon, 2010).

Наиболее известными и хорошо изученными являются ПФ у типа *Bacillota* (ранее – *Firmicutes*; Oren, Garrity, 2021) – эндоспоры, образующиеся в результате скоординированной деятельности предварительно удвоенного генома, первый из которых окружается многочисленными защитными покровами, а второй находится в спорангии и обеспечивает протекание этих процессов и в дальнейшем лизируется (Sussman, Douthit, 1973).

В настоящее время морфология, цитология, биохимия и генетика образования и прорастания эндоспор всесторонне исследованы (Setlow, 2014).

Представители типа *Pseudomonadota* (ранее – *Proteobacteria*; Oren, Garrity, 2021) при истощении ресурсов для роста или воздействии стрессовых факторов экстремальной интенсивности также образуют ПФ, которые характеризуются сниженным уровнем метаболизма или его отсутствием, специфической внутриклеточной организацией, а также повышенной устойчивостью к различным повреждающим факторам (Бухарин и соавт., 2005; Мулюкин и соавт., 2008, 2009, 2015). В покоящееся состояние переходит только малая часть бактериальной популяции, как правило, не более 1% от общей численности. Образование ПФ происходит на основе глубоких функциональных и морфологических изменений обычных вегетативных клеток.

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365623600372 для авторизованных пользователей.

К формам покоя, по крайней мере пролиферативного, также можно отнести “жизнеспособное, но не культивируемое состояние” (англ. — viable but non culturable; VBNC), развивающееся при воздействии различных стрессовых факторов и характеризующееся сохранением остаточной метаболической активности с одновременной утратой способности к культивированию на плотных питательных средах с использованием стандартных бактериологических техник (Pinto et al., 2015; Zhang et al., 2021).

Другим вариантом ПФ некоторыми авторами рассматриваются клетки-персистеры (англ. — persisters), традиционный подход к получению (выявлению) которых заключается в воздействии на бактериальную популяцию высоких доз антибиотиков (Shah et al., 2006). При этом для VBNC и персистеров показано наличие ряда сходств морфологической и структурной организации, включающих димеризацию рибосом (Kim et al., 2018).

Наиболее глубокой формой бактериального покоя (за исключением спор) являются цистоподобные ПФ, названные так по аналогии с цистами, образуемыми бактериями рода *Azotobacter*, важными элементами формирования которых являются жестко-кристаллическая мембрана, стабилизированные ДНК и ферменты, выход ионов K^+ и витрифицированная (стеклообразная) цитоплазма (Бухарин и соавт., 2005; Рагу, 2014). Именно цистоподобным ПФ принадлежит ключевая роль в сохранении бактериальных популяций во множестве сред обитания, условия существования в которых сопряжены с периодическим развитием трофического и иных видов стресса.

Важным инструментом исследования процессов функционирования микробных клеток, в том числе в состоянии покоя, в настоящее время стал транскриптомный анализ, основанный на исследовании профилей присутствующих в них матричных (кодирующих) РНК (мРНК).

Так, транскриптомный анализ VBNC продемонстрировал повышенный уровень образования стрессового регулятора RpoS (Boaretti et al., 2003), фермента каталазы (Kong et al., 2004) и лактатдегидрогеназы (Wagley et al., 2021), что в совокупности обеспечивает возможность их существования в неоптимальных условиях среды обитания.

Особенностью транскриптома клеток-персистеров явилось существенное повышение уровня экспрессии систем “токсин–антитоксин”, а также генов деградации ароматических соединений при одновременной выраженной репрессии других метаболических путей (Alkasir et al., 2018).

На этом фоне сведения о транскриптоме цистоподобных ПФ до сих пор отсутствуют. Ожидаемым ограничением для подобного анализа являются представления о низком времени полужизни мРНК (Selinger et al., 2003), что должно обусловить их

отсутствие при формировании глубоких форм бактериального покоя. С другой стороны, факт ингибирования гидролаз в цистоподобных бактериальных клетках (Бухарин и соавт., 2005) позволяет предполагать сохранение мРНК, образовавшихся на финальных этапах их перехода в покоящееся состояние.

Целью работы явился анализ присутствия и профиля мРНК в покоящихся клетках *Esherichia coli*, метод получения и морфология которых соответствует представлениям о цистоподобных покоящихся формах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования являлся штамм *Escherichia coli* K12 MG1655 (F-lambda-*ilvG-rfb-50* rph-1), полученный из коллекции ФГБНУ “Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе” РАН. Данные о полном геноме данного штамма представлены в работе Hayashi et al. (2006); сведения о вариантах его транскриптомов доступны в работе Sastry et al. (2019).

Культивирование. Бактерии выращивали на разбавленной в 3 раза среде Луриа–Бертани (LB Broth, Miller) состава (г/л): дрожжевой автолизат — 3.3; пептон — 1.7; NaCl — 1.7; pH среды 7.0. Инокулят — *E. coli* K12 MG1655 стационарной фазы роста (20 ч), вносили в количестве, обеспечивающем стартовую численность 8.0×10^7 клеток (КОЕ)/мл. Культуру выращивали в колбах объемом 500 мл с 300 мл среды LB/3 при температуре 28°C на качалке (100 об./мин). После 4.5 ч культивирования, что соответствовало середине фазы экспоненциального роста, часть культуры отбирали, клетки отделяли центрифугированием (15000 g, 10 мин). Данная культура соответствует точке 1 для транскриптомного анализа (рис. 1). Оставшуюся часть продолжали культивировать при тех же условиях в течение 24 ч, после чего оставляли в статических условиях на 9 сут при той же температуре. Выросшую биомассу сгущали в 20 раз центрифугированием (5000 g, 15 мин) и хранили при комнатной температуре в течение 45 сут. После указанного времени образовавшиеся ПФ три раза промывали стерильным физиологическим раствором (0.9% NaCl; pH 7–7.2), осадок собирали центрифугированием (10 000 g, 15 мин). Данная культура соответствовала точке 2 для транскриптомного анализа. Количество полученных ПФ составляло 0.5–0.8% от количества жизнеспособных клеток, определяемых как колониеобразующие единицы (КОЕ) культуры, оставленной на “созревание”.

Всего было получено по три идентичных образца-повторности для каждой из экспериментальных точек. Образцы хранили в жидком азоте

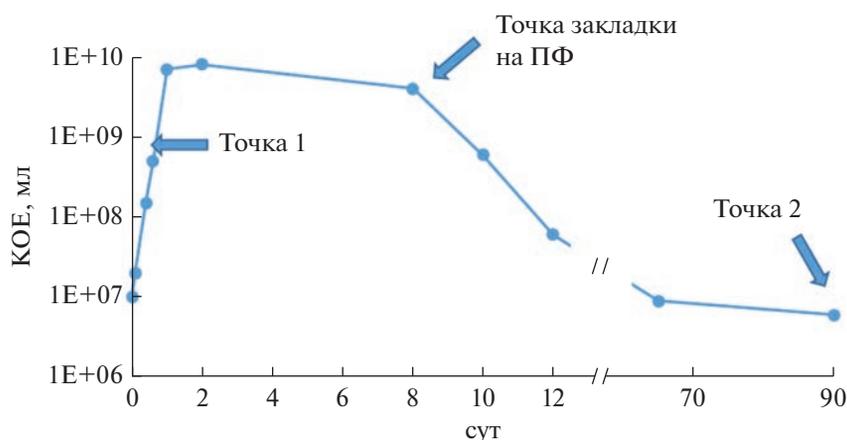


Рис. 1. Схема расположения точек отбора материала для транскриптомного анализа (1 и 2), а также обработки клеток для получения покоящихся форм.

в течение нескольких часов и затем использовали для экстракции мРНК.

Титр жизнеспособных клеток (КОЕ) определяли высевом аликвот десятичных разведений на плотную среду LB.

Образование цистоподобных ПФ контролировали методом фазово-контрастной микроскопии (“Reichert”, Австрия) по наличию характерных рефрактерных клеток (Мулюкин и соавт., 2008, 2009).

Наличие цистоподобных ПФ подтверждали по результатам трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы помещали в 2.5% раствор глутарового альдегида в какодилатном буфере (0.05 M раствор какодилата натрия; pH 7.0–7.5) и выдерживали в течение 24 ч при 4°C; затем трижды промывали тем же буферным раствором в течение 5 мин и фиксировали в растворе OsO₄ (1% OsO₄)–0.7% раствор рутениевого красного в какодилатном буфере) в течение 1.5 ч при 4°C. После фиксации образцы заключали в 2% агар-агар и последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата в 30% этиловом спирте в течение 4 ч, далее в 70% этаноле в течение 12 ч при 4°C. Материал обезвоживали в 96% этиловом спирте (2 раза по 15 мин), затем в абсолютном ацетоне (3 раза по 10 мин). Образцы пропитывали смолой ЭПОН-812 (Epoxy Embedding Medium Эпон® 812, “Sigma-Aldrich”, США) выдерживали в смеси смола–ацетон в соотношении 1 : 1 в течение 1 ч, затем в смеси смола–ацетон в соотношении 2 : 1 в течение 1 ч. Полученный материал заливали в капсулы со смолой и проводили полимеризацию при температуре 37°C в течение 24 ч, затем при 60°C в течение 24 ч. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (“LKB”, Швеция) и контрастировали в водном растворе 3% уранилацетата (30 мин), затем в водном растворе 4% цитрата свинца (30 мин). Полученные препараты анализировали с помощью

электронного микроскопа JEM 100СХП (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и рабочем увеличении 5000–50000. Фотодокументирование материалов проводили с помощью цифровой системы вывода оптических изображений Morada G2.

О наличии покоящихся форм судили по присутствию в образцах клеток, имеющих характерные признаки: утолщенную клеточную стенку, электронно-плотную цитоплазму (Мулюкин и соавт., 2008, 2009; Соляникова и соавт., 2017; Лойко и соавт., 2017).

Выделение РНК из подготовленных клеточных суспензий осуществляли с помощью набора ExtractRNA (“Евроген”, кат. № BC032) по протоколу, рекомендованному производителем. Удаление рибосомальной РНК осуществляли с использованием набора RiboZero Bacteria Kit (“Illumina”). Качество полученной мРНК проверяли при проведении электрофореза, а ее количество измеряли при помощи Qubit.

Удаление последовательностей рибосомальной РНК осуществляли при помощи набора RiboZero Bacteria Kit (“Illumina”), подготовку полученных образцов РНК к секвенированию проводили с помощью набора TruSeq Stranded Total RNA LibraryPrep Kit (“Illumina”) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Последовательность адаптеров, использованных при подготовке библиотек (read 1): AGATCG-GAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACNNNNNATCTCGTATGCCGT-CTTCT, где NNNNNN – последовательность индекса.

Подготовку библиотек кДНК проводили по технологии RNA-seq (с рассеянной заправки) для секвенаторов, совместимых с TruSeq (“Illumina”). Подготовку образцов проводили с помощью набора TruSeq Stranded Total RNA LibraryPrep Kit

(“Illumina”) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем.

Секвенирование библиотек кДНК проводили на 1 дорожке Illumina HiSeq 2500 (101 цикл с одной стороны фрагментов) с использованием реактивов TruSeq SBS sequencing kit version 4 (“Illumina”, Сан-Диего, Калифорния, США).

Обработку библиотек прочтений, расчет уровней экспрессии и дифференциальной экспрессии индивидуальных генов проводили в программе RSEM v1.1.17. после наложения чтений с помощью программы Bowtie2 и сопоставляли с эталонной последовательностью *E. coli* K-12 MG1655 (NCBI Reference Sequence: NC_000913.3). Уровни экспрессии для каждого гена рассчитывали на основе количества прочтений путем усреднения трех повторностей. Функции транскриптов были определены путем сравнения с последовательностями известных генов *E. coli*, представленных в базе данных The Clusters of Orthologous Groups (COGs) of proteins (Tatusov et al., 2000). Транскрипционные профили визуализировали с помощью браузера генома Artemis.

Для аннотированных генов был проведен расчет дифференциальной экспрессии в точке 2 (ПФ) относительно точки 1 (растущие клетки) по формуле 1, выведенной с использованием следующего алгоритма.

Мы полагаем, что именно и только величина экспрессии гена в пересчете на одну клетку имеет биологический смысл при изменении условий культивирования (жизни организмов), приводящим к изменению количества нуклеиновых кислот или эффективности их извлечения. Эта удельная величина экспрессии также позволяет делать выводы о гетерогенности клеток в популяции по признаку транскрипционной активности различных генов и их групп.

Традиционно в работах по анализу транскриптомов используют величины экспрессии генов непосредственно в библиотеках, полученных после секвенаторов. Это является корректным подходом, если для экстракции РНК берутся однотипные по физиологическому состоянию клетки, с одинаковым удельным количеством РНК, подвергнутые тем или иным одинаковым воздействиям в ходе экстракции, мультипликации, секвенирования, а также при условии, когда для первого этапа экстракции РНК берут одинаковое количество одинаковых клеток.

В условиях нашего опыта мы имели другую ситуацию, когда надо было сравнить активность генов не только в разных условиях, но и для разных состояний одного и того же биологического объекта — культуры кишечной палочки, содержащей разное количество РНК на одну клетку. Нам пришлось разработать собственный алгоритм расчета уровня дифференциальной экспрессии генов.

Поскольку невозможно точно рассчитать количество транскриптов в одной клетке на основе полученного количества прочтений генов, мы разработали алгоритм расчета относительной удельной транскрипции для исследуемых групп клеток. Эта величина позволяет сравнивать изменение активности генов в различных группах клеток в условиях данного конкретного опыта. Логика алгоритма следующая.

Очевидно, что величина прочтений определенного гена в библиотеке прочтений прямо пропорциональна экспрессии гена в клетке (количество копий гена (мРНК) в одной клетке). В секвенатор наносится стандартное и, главное, одинаковое количество (масса) РНК. Постулировали, что все экспериментальные процедуры были одинаковыми для исследуемых образцов: эффективность экстракции РНК из клеток, доля мРНК в общем пуле РНК, эффективность работы обратной транскриптазы и др., что обуславливает прямую пропорциональность количества прочтений (экспрессию) конкретного гена количеству транскриптов этого гена в пуле мРНК, вносимого в секвенатор.

Приводим алгоритм расчета.

Дано:

1) Для гена X в группах клеток А и Б число копий гена в каждой клетке было N_{x-a} и N_{x-b} соответственно.

2) Число прочтений после секвенатора было N'_{x-a} и N'_{x-b} .

3) Число клеток для экстракции РНК было $C_{кл-a}$ и $C_{кл-b}$.

4) Масса экстрагированной РНК была M_A и M_B .

5) Содержание РНК в одной клетке M'_A и M'_B .

6) Число прочтений прямо пропорционально числу копий в клетке с неизвестным коэффициентом k . Т.е. $N_{x-a} = k \times N'_{x-a}$.

7) Количество транскриптов N в одной клетке для любого гена прямо пропорционально суммарной массе мРНК в этой клетке (при прочих равных условиях).

Постулируем: В секвенатор на анализ отбирается одинаковое количество РНК, что надо учитывать при расчете количества копий мРНК на одну клетку (реальной экспрессии, активности гена) путем домножения числа копий гена (прочтений гена) на определенную величину.

Требуется: Рассчитать изменение активности гена X в клетках группы А по сравнению с клетками группы Б на основе чисел прочтения после секвенатора.

Решение: изменение активности гена, “изменение уровня экспрессии”, X определяется как частное от деления N_{x-a} на N_{x-b} . Т.е. $X = N_{x-a}/N_{x-b}$.

При расчете на 1 клетку в состоянии А:

N_{x-a} = Число прочтений $\times k \times$ массу РНК/число клеток, т.е. $= (N'_{x-a}) \times k \times (M_A)/(C_{кл-a})$,

Аналогично для состояния Б: $N_{x-b} = (N'_{x-b}) \times k \times (M_B)/(C_{кл-b})$.

Подставим эти значения в формулу $X = N_{x-a}/N_{x-b}$ и после сокращения коэффициента k получим:

$$X = N_{x-a}/N_{x-b} = (N'_{x-a})(M_A) / \left((C_{кл-a}) / (N'_{x-b})(M_B) / (C_{кл-b}) \right).$$

При этом заметим, что частное от деления массы выделенной РНК M на общее количество клеток C , из которого получена эта РНК, дает удельное содержание РНК в одной клетке $M'_A = (M_A)/(C_{кл-a})$.

Тогда имеем:

$$X = N_{x-a}/N_{x-b} = (N'_{x-a}) / (N'_{x-b})(M'_A) / M'_B,$$

т.е. изменение экспрессии гена (равное частному числа транскриптов гена X в единичных клетках групп А и Б) равно частному их прочтений, умноженному на отношение удельного содержания РНК в клетках этих групп.

Зная отношение удельного содержания РНК в группах А и Б, например H/Z , домножаем все числа прочтений всех генов группы А на H , а группы Б на Z , получаем массив скорректированных чисел прочтения $(N'_{x-a})(H)$ для массива А и $(N'_{x-b})(Z)$ для массива Б. Тогда для расчетов величин изменения экспрессии в группах А и Б, достаточно будет получить отношения скорректированных чисел чтения относительно варианта с наименьшим удельным содержанием РНК на одну клетку.

В случае условий нашего опыта для покоящихся клеток и растущих клеток, удельное содержание РНК в одной клетке составляет 0.26 и 3.5 фг соответственно. Их отношение составляет 1 : 13. Соответственно, количество чтений для каждого гена в библиотеке, полученной после секвенирования, домножали на 1 для покоящихся клеток и на 13 для экспоненциальных клеток, и именно эти величины брали в анализ изменения активностей генов.

Наш алгоритм схож с использованным в работе Milo, Phillips (2015), представлял величину экспрессии гена в пересчете на одну клетку.

В итоге – изменение уровня транскрипции гена “ X ” в клетках группы 2 по сравнению с клетками группы 1 определяется по формуле:

$$X = (N_{x-2}) / (N_{x-1} \times 13), \quad (1)$$

где N_{x-2} – число прочтений гена X в группе клеток 2 (ПФ); N_{x-1} – число прочтений гена X в группе клеток 1 (растущие клетки); 13 – отношение количества РНК в растущих клетках к количеству РНК в ПФ.

Результаты секвенирования депонированы в базе данных Bioproject, accession ID: 977551.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика покоящихся форм *E. coli* K12 MG1655. После 45 сут культивирования и последующего “созревания” образование покоящихся форм было оценено методами фазово-контрастной и трансмиссионной электронной микроскопии.

Использование фазово-контрастной микроскопии показало наличие в промытом центрифугированном осадке “рефрактерных” клеток, характеризующихся повышенным коэффициентом оптического преломления. В свою очередь, на электронномикроскопических фотографиях (рис. 2) подобные объекты визуализировались как один из двух морфотипов: (а) вытянутые клетки с более светлой гранулированной комковатой цитоплазмой, более темным фрагментированным нуклеоидом и фибриллярной капсулой; (б) округлые клетки с электронно-плотной цитоплазмой и утолщенной клеточной стенкой с поверхностным фибриллярным слоем. Их морфология соответствовала описанным нами ранее ПФ, образующимся на позднем этапе развития периодических бактериальных культур (Соляникова и соавт., 2013; Мулюкин и соавт., 2015; Лойко и соавт., 2017).

Количество полученных ПФ *E. coli* K12 MG1655 составляло 0.5–0.8% от КОЕ культуры, оставленной на созревание. Остальные >99% визуализированных объектов были представлены “теньями” – пустыми клеточными оболочками (тип “в” на рис. 2), представляющими собой отмершие и частично разрушенные бактериальные клетки.

Количественный анализ содержания мРНК в растущих и покоящихся клетках *E. coli* K12 MG1655. Для экстракции мРНК было использовано ≈ 9 млрд экспоненциально растущих клеток (точка 1) и ≈ 1.8 млрд покоящихся клеток (точка 2). В экспоненциально растущих клетках количество totalной мРНК характеризовалось значением $3.5 \pm 0.7 \times 10^{-15}$ г/кл., в то время как в покоящихся клетках ее содержание снижалось более чем на порядок (в 13.5 раз) до уровня $2.6 \pm 0.5 \times 10^{-16}$ г/кл. При этом

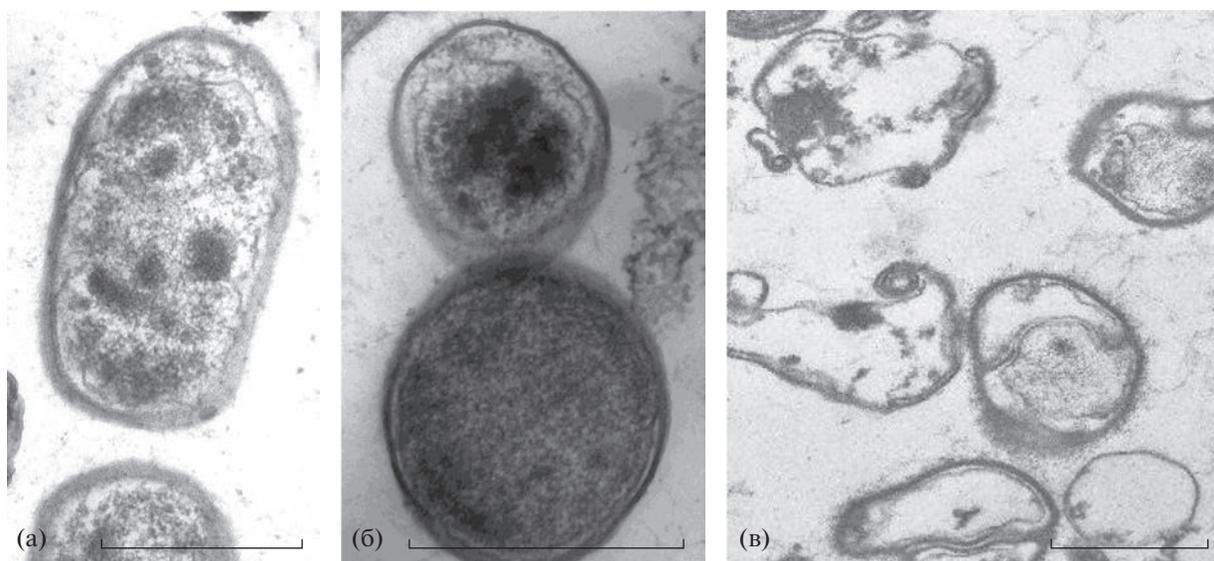


Рис. 2. Электронные фотографии ПФ *E. coli* K12 MG1655, использованных для выделения мРНК. Обозначения: а, б – морфотипы ПФ, описанные в тексте; в – остатки отмерших бактериальных клеток. Масштабная линейка – 1 мкм.

как в точке 1, так и в точке 2 выделенная мРНК имела сходные качественные характеристики без признаков деградации, что свидетельствовало о сохранении функциональности данной группы биополимеров и обеспечивало корректность последующего транскриптомного анализа.

Макрохарактеристика транскриптомов *E. coli* K12 MG1655. На основании библиотеки прочтений с применением специального алгоритма (табл. S1) было рассчитано количество транскриптов, приходящееся на одну клетку. В геноме экспоненциально растущих клеток показана транскрипция 4073 из 4101 имеющихся генов, для 28 генов не обнаружено ни одного транскрипта. Среднее число прочтений одного гена составило 54396; разброс по количеству прочтений для разных генов составлял 7 порядков; наиболее представленными были гены с числом чтений 1001–10000 (рис. 3).

Парадоксально, но в покоящихся клетках транскрипционная активность была показана также для большинства генов (для 4098 из 4101); “молчащими” оставались только 3 гена. В то же время для ПФ характерно общее подавление транскрипционной активности: среднее число прочтений одного гена снижалось более чем в 20 раз (до 2164), а наиболее представленными становились гены с числом чтений 101–1000 (рис. 3).

Оценка количества транскриптов, присутствующих во всех клетках культуры *E. coli* K12 MG1655. С учетом полученных данных о широком варьировании количества транскриптов, которыми представлены разные гены, представляло интерес оценить, транскрипты каких генов присутствуют в каждой клетке популяции, а каких – только в некоторой

части клеток популяции. Это было сделано, пользуясь следующим алгоритмом.

Известно, что в 1 клетке *E. coli* в среднем присутствует несколько тысяч молекул иРНК (транскриптов) (Milo, Phillips, 2015). Тогда при числе генов *E. coli* ~4000 это возможно при двух сценариях: если каждый ген представлен только одной–несколькими копиями, или что гены крайне неравномерно представлены транскриптами. Разброс количества прочтений генов, пропорциональных количеству транскриптов в клетке, на 7 порядков (рис. 3) свидетельствует о второй ситуации. Считается, что у *E. coli* в каждый момент активны порядка 25% генов (Richmond et al., 1999). Среднее количество единиц каждой индивидуальной мРНК в клетке не превышает нескольких копий у бактерий (Milo, Phillips, 2015) и нескольких десятков у млекопитающих (Schwanhäusser et al., 2011).

Примем, что если для какого-либо гена число прочтений, полученных в данных условиях, равно или превышает среднее количество прочтений на один ген для всей популяции генов в данной группе, то такой ген будем считать представленным в каждой клетке. Гены, представленные меньшим числом экспрессии, будем считать активными лишь в некоторой части популяции. Такая условно пороговая величина для растущих клеток и ПФ составляет 54396 и 2164 прочтений мРНК соответственно.

Подсчет числа генов, представленных разным количеством прочтений, выраженных в %, дает долю генов, активных в каждой клетке популяции (табл. 1). Для растущих клеток и ПФ эти величины составляют, соответственно, 16 и 21%. Полу-

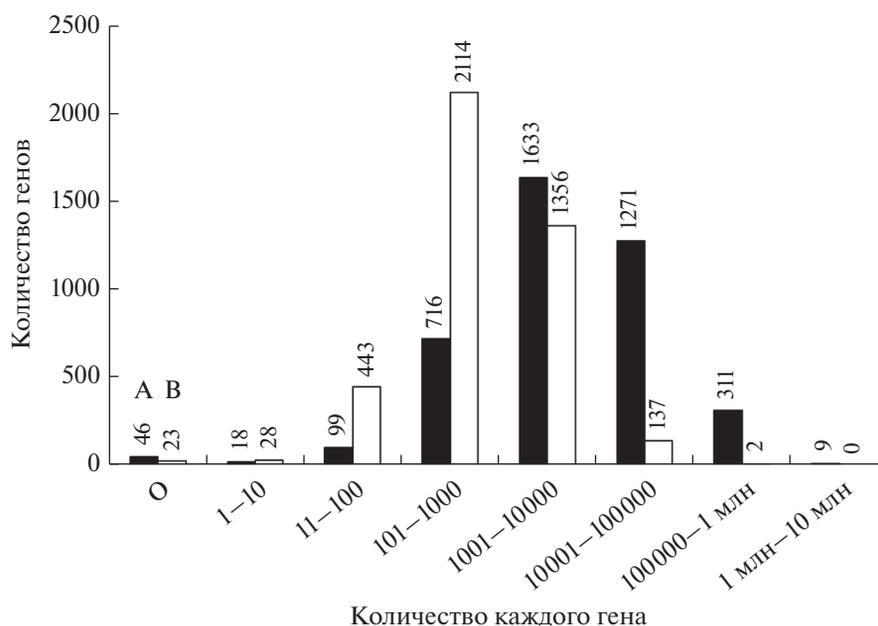


Рис. 3. Сравнение транскриптомов растущих (А) и покоящихся (В) клеток *E. coli* K12 MG1655 по численности прочтений отдельных генов. Гены объединены в группы, различающиеся по численности прочтений на 1 порядок.

ченные величины близки литературным данным о доле активной части генома в клетках бактерий (25%) (Richmond et al., 1999), что доказывает адекватность нашего расчета. Аналогичный нашему расчет по количеству мРНК на одну клетку приведен в работе (Milo, Phillips, 2015).

Гены, активные в каждой метаболически активной клетке, можно считать необходимыми для развития бактерий в данных условиях.

Наличие значительного количества генов, активных не в каждой клетке популяции, указывает на то, что полученный транскриптом относится не к одной клетке, а ко всей популяции бактерий, в которой клетки весьма гетерогенны по набору чтений различных генов. Такая ситуация обуславливает и отражает высокую внутривидовую гетерогенность клеток бактерий.

Сравнительный анализ транскриптомов растущих и покоящихся клеток *E. coli* K12 MG1655 по функциональным группам генов. По результатам

аннотирования на основе базы данных COGs (The Clusters of Orthologous Groups) транскрипты были разделены на 5 блоков (метаболизм низкомолекулярных соединений, метаболизм полимеров, энергетика клетки, функционирование клетки как единого целого, неопределенное назначение), включающих 19 функциональных групп (табл. 2).

Проведенный сравнительный анализ свидетельствовал в пользу качественных различий транскриптомного профиля растущих и покоящихся клеток *E. coli* K12 MG1655, что соответствовало исходным представлениям о дифференцированном уровне активности генов у морфологически и физиологически различающихся растущих и покоящихся клеток. Гены, активные в каждой клетке, с максимальной относительной активностью в ПФ в 2 раза более высокой, чем в растущих клетках, принадлежат к группам: оборота ДНК, подвижности клеток, механизмам защиты, генов с неопределенными функциями.

Таблица 1. Статистические количественные характеристики транскриптомов растущих клеток и покоящихся форм *E. coli* K12 MG1655

Тип клеток	Общее число генов	Число неактивных генов	Максимальное число чтений гена*	Среднее число чтений	Количество генов, активных во всех клетках популяции	
					число	%
Растущие клетки	4101	28	7.2 млн.	54396	650	16%
ПФ	4101	3	425 тыс.	2164	798	21%

* Гены с максимальным числом прочтений представлены в табл. 3.

Таблица 2. Функциональные группы генов и их представленность прочтениями в каждой клетке в различных популяциях *E. coli* – растущих клеток и ПФ

Тип клеток	Растущие	ПФ
Блок I – метаболизм низкомолекулярных соединений		
Аминокислоты (транспорт и метаболизм)	122	162
Липиды (транспорт и метаболизм)	50	34
Углеводы (транспорт и метаболизм)	142	112
Коферменты (транспорт и метаболизм)	30	44
Неорганические ионы (транспорт и метаболизм)	72	72
Нуклеотиды (транспорт и метаболизм)	48	34
Вторичные метаболиты (синтез, транспорт и метаболизм)	12	14
Блок II – метаболизм полимеров		
Белки – оборот, шапероны, пост-трансляционная модификация	74	84
ДНК – репликация, рекомбинация, репарация	28	76
Транскрипция	80	122
РНК – процессинг и модификация	1	1
Трансляция, структура и сборка рибосом	188	182
Блок III – энергетический метаболизм		
Энергия – продукция и конверсия	162	122
Блок IV – уровень целой клетки		
Деление клеток, контроль клеточного цикла, деление хромосомы	14	22
Подвижность клеток	16	42
Механизмы защиты	2	4
Механизмы передачи сигнала	70	112
Внутри- и внеклеточный транспорт белков	26	44
Блок V – функции не определены		
Общие функции только предсказаны	77	102
Неопределенная функция	46	104

Примечание. Жирным шрифтом выделены группы генов с различиями в величине экспрессии генов между фазами развития клеток в 2 и более раз.

В целом можно заключить, что групповой анализ генов оказался малоэффективным (видимо, по причине присутствия в каждом из функциональных блоков генов с чрезвычайно низким уровнем активности) и поэтому должен быть дополнен тотальным анализом изменения активности отдельных генов независимо от их представленности.

Поэтому поиск генов, важных для образования ПФ, был далее продолжен путем использования двух нижеописанных подходов.

Идентификация генов, важных для формирования цистоподобных ПФ, проведена с использованием двух подходов: (а) путем определения генов, представленных в ПФ максимальным количеством прочтений; (б) путем сравнения активности генов, активность которых возрастает в 2 и более раз независимо от уровня их экспрессии.

С использованием первого подхода были выявлены 6 генов, максимально транскрибируемых в ПФ (табл. 3): *pspA* (регуляторный белок оперона

фагового шока; 153274 прочтений), жизненно важный для поддержания протонной движущей силы через мембраны в стрессовых условиях (Flores-Kim, Darwin, 2016); *rmf* (фактор модуляции рибосом; 149375 прочтений), делающий рРНК более устойчивой к деградации и вовлеченный в процесс димеризации 70S рибосом с формированием т.н. “100S рибосом” (Yoshida et al., 2021); *cspE* (анти-терминатор транскрипции, относящийся к семейству белков холодового шока; 133624 прочтений), в том числе, что важно в контексте настоящего исследования, выступающий в качестве регулятора стабильности РНК; а также ген *rhsD* (кодирует пираназу D-рибозы; 130465 прочтений) вовлеченный в процесс углеводного метаболизма. Интересно, что генами с наибольшим количеством прочтений являются *raiA* (cold shock protein associated with 30S ribosomal subunit; 425157 прочтений) и *ompF* (outer membrane porin 1a (Ia; b; F), высокая транскрипционная активность которых харак-

Таблица 3. Гены, представленные максимальным числом прочтений

Клетки	Количество прочтений мРНК	Ген	Продукт (функция) гена
Активные	2926225	<i>aspA</i>	Аспартат-аммоний-лиаза
	3024222	<i>ompA</i>	Белок наружной мембраны А
	3102452	<i>pflB</i>	Формиатлиаза 1
	3200888	<i>fusA</i>	Фактор элонгации цепи EF-G
	3508555	<i>gapA</i>	Глицероальдегид-3-фосфат дегидрогеназа А
	3508766	<i>tufA</i>	Фактор элонгации EF-Tu 1
	3632342	<i>raiA</i>	Белок холодового шока, ассоциированный с 30S субъединицей рибосом
	6453556	<i>lpp</i>	Синтез липопротеина муреинового слоя
	7216487	<i>ompF</i>	Порин наружной мембраны F
ПФ	130465	<i>rbsD</i>	Пираназа D-рибозы
	133624	<i>cspE</i>	Белок холодового шока, фактор антитерминации транскрипции, участвует в плавлении РНК, связывает ssДНК
	149375	<i>rmf</i>	Фактор модуляции рибосом
	153274	<i>pspA</i>	Фаговый белок-регулятор
	253939	<i>ompF</i>	Порин наружной мембраны F
	425157	<i>raiA</i>	Белок холодового шока, ассоциированный с 30S субъединицей рибосом

терна и для экспоненциально растущих клетках. Последний факт подтверждает более длительную выживаемость мРНК, чем считали ранее (Selinger et al., 2003), не минуты—десятки минут, а десятки суток.

Наиболее понятна важность для формирования ПФ генов *raiA* и *cspE*. Первый из них стабилизирует 70S рибосому, ингибирует процесс элонгации и повышает точность трансляции (Agafonov, Spirin, 2004), а второй обеспечивает правильную укладку молекул РНК и помогает им принимать функционально активные состояния (Rennella et al., 2017).

Очевидно, что такой подход, не учитывающий сравнительных активностей всех генов, не является плодотворным, поскольку он выявляет, во-первых, не все гены, важные для образования ПФ, и, во-вторых, может ошибочно выявлять гены, активность которых более характерна для других фаз развития культур. Кроме того, нет объективного критерия для определения уровня, определяющего гены, с максимальным уровнем транскриптов. Этот подход приводится в работе в качестве сравнения.

Наиболее значимые результаты получены при анализе всей совокупности транскриптов мРНК, когда были рассчитаны отношения экспрессии генов в ПФ относительно их экспрессии в экспоненциально растущих клетках. В табл. 4 представлены гены, экспрессия которых в 2 и более раз выше в ПФ. Всего было обнаружено 60 таких генов.

Все гены можно объединить в функциональные группы (рис. 4) на основе активностей их продуктов или их функций:

- функционирование генома (токсин/антитоксинавая система, иммунитет, транспозазы; 6 генов);

- свойства оболочек (мембраны, периплазма; 13 генов);

- метаболизм (5 генов);

- био пленки (адгезия и коллективное поведение; 12 генов);

- стрессоадаптация (8 генов);

- регуляция пролиферации (клеточное деление, консервация рибосом; 2 гена).

Большая группа генов, активируемых при формировании ПФ, пока не имеет выявленных функций (14 генов). При этом часть функциональных генов принадлежит фаговым геномам (в виде профагов) (выделены в табл. 4 жирным шрифтом с подчеркиванием) (13 генов).

Рассмотрим гены с максимальным уровнем повышения активности. Восемь генов характеризовались транскрипционной активностью, превышающей таковую в растущих клетках в 8–10 раз (в таблице выделены голубой заливкой). Два из них (*uscO* и *uncJ*) кодировали белки с неизвестной функцией, функция шести генов позволяла предполагать их роль в переходе бактериальных клеток в покоящееся состояние. Высокий уровень экспрессии гена *csgB*, дополняемый повышенным в 2 раза уровнем экспрессии гена *csgA* свиде-

Таблица 4. Гены, экспрессия которых возрастает в ПФ в 2 и более раз по сравнению с растущими клетками. Гены, активность которых возрастает в 8 и более раз, выделены жирным шрифтом и подписаны в первом столбце. Флаговые гены выделены жирным шрифтом с подчеркиванием в первом столбце

Ген	Продукт гена
Стрессадаптация	
<i>pspB</i>	Активатор транскрипции оперона <i>psp</i> operon
<i>pspA</i>	Белок-регулятор шоковых белков
<i>acrS</i>	Репрессор транскрипции оперона <i>acrAB</i> (синтеза токсина <i>AcgAB</i> – <i>ToIC</i>)
<i>ynaE</i>	Белок холодового шока
<i>ydfK</i>	Белок холодового шока
<i>ynfN</i>	Белок холодового шока
<i>cspI</i>	Шоковый белок
<i>pspG</i>	Шоковый белок G
Биопленки (адгезия и коллективное поведение)	
<i>espR</i>	Предполагаемый регулятор транскрипции оперона <i>esp</i>
<i>csgB</i> – 10 раз	Белок малой субъединицы белка фимбрий типа курлей
<i>csgA</i>	Амилоидный белок фимбрий типа курлей
<i>ycgZ</i>	Белок регуляции биопленок и кислотоустойчивости
<i>yngA</i>	Белок регуляции биопленок
<i>yngC</i> – 8 раз	Белок адаптации к низкой температуре и др. стрессам, образования биопленок
<i>ariR</i>	Белок регуляции биопленок и кислотоустойчивости
<i>ypdI</i>	Предполагаемый липопротеин, участвующий в синтезе колановой кислоты
<i>yraI</i>	Предполагаемый периплазматический шаперон пилина
<i>ydeQ</i>	Предполагаемый адгезин типа фимбрий
<i>ydeR</i>	Предполагаемый адгезин типа фимбрий
<i>ydeS</i> – 10 раз	Предполагаемый адгезин типа фимбрий
Оболочки (мембраны, периплазма)	
<i>srxP</i> – 10 раз	Периплазматический ингибитор оперона <i>srx</i>
<i>kdpA</i>	Субъединица А АТФ-зависимой транслоказы K ⁺
<i>kdpB</i>	Субъединица В АТФ-зависимой транслоказы K ⁺
<i>kdpC</i>	Субъединица С АТФ-зависимой транслоказы K ⁺
<i>ybfB</i>	Предполагаемый мембранный белок
<i>artJ</i>	Периплазматический связывающий белок системы транспорта аргинина ABC
<i>ycdU</i>	Предполагаемый белок внутренней мембраны
<i>ompG</i>	Белок внешней мембраны G
<i>ynbA</i>	Белок внутренней мембраны
<i>yneM</i>	Белок внутренней мембраны
<i>ynbB</i> – 8 раз	Предполагаемая синтаза диглицеридов CDP
<i>yiaW</i>	Белок внутренней мембраны DUF3302
<i>yjbT</i>	Предполагаемый периплазматический белок
Метаболизм	
<i>rspB</i>	Предполагаемая Zn-зависимая NAD(P)-связывающая оксидоредуктаза
<i>argF</i>	Орнитин-карбамаил-трансфераза профага CP4-6
<i>trpE</i>	Компонент I антранилат-синтазы
<i>argC</i>	N-ацетил-гаммаглутамилфосфатредуктаза, NAD(P)-связывающая
<i>argI</i>	Орнитин-карбамаил-трансфераза I

Таблица 4. Окончание

Ген	Продукт гена
Регуляция пролиферации (клеточное деление, консервация рибосом)	
<i>dicB</i>	Белок-ингибитор клеточного деления профага Q _{in}
<i>rmf</i>	Фактор модуляции рибосом
Функциональность генома-ДНК (системы токсинов/антитоксинов, иммунитета, транспозазы)	
<i>yhhZ</i> – 10 раз	Предполагаемый токсин семейства Hcr1 с колициноподобной ДНКазной и тРНКазной активностью
<i>yhhH</i>	Предполагаемый антитоксин токсина RhsB семейства NTF2, фактор иммунитета
<i>yjcF</i>	Белок с пентапептидными повторами YjcF
<i>yhhI</i>	Предполагаемая транспозаза
<i>ydcC</i>	Предполагаемая транспозаза с повторами H-типа
<i>ybfD</i>	Предполагаемая транспозаза с повторами H-типа
<i>insK</i>	Транспозаза типа В мобильного элемента IS150
Гены без специфических выявленных (известных) функций	
Регуляторы транскрипции (пока без функций)	
<i>ygeH</i>	Предполагаемый регулятор транскрипции
<i>yagA</i>	Предполагаемый регулятор транскрипции профага CP4-6
Фаги	
<i>ydaE</i>	Белок профага Rac
<i>ydfD</i>	Белок профага Q _{in}
<i>ybcV</i>	Белок профага DLP12
<i>ydfD</i>	Белок профага Q _{in}
С неизвестными функциями	
<i>yseO</i> – 10 раз	Белок с неизвестной функцией
<i>ybeR</i>	Белок с неизвестной функцией
<i>yqeJ</i>	Белок с неизвестной функцией
<i>yqeK</i>	Белок с неизвестной функцией
<i>yncJ</i> – 10 раз	Белок с неизвестной функцией
<i>yncH</i>	Белок с неизвестной функцией
<i>yjbL</i>	Белок с неизвестной функцией

тествовал об интенсивном биосинтезе белков внеклеточного матрикса (“курлей”), формирующего дополнительный адгезивный слой поверх клеточной стенки формирующихся ПФ и предполагающих дальнейшее существование ПФ в прикрепленном состоянии на границах раздела фаз (Hammer et al., 2007). Аналогичное заключение может быть сделано в отношении гена *ydeS*, вместе с также активно транскрибируемыми генами *ydeQ* и *ydeR* кодирующего вероятный фимбрия-подобный адгезивный протеин. Ген *ymgC* также связан с формированием биопленок, особенно в стрессовых условиях (Domka et al., 2007; Kannan et al., 2008; White-Ziegler et al., 2008). Ген *yhbV* отвечает за синтез фосфатидцитидилтрансферазы, фермента, связанного с фосфатидинозитольной сигнальной системой и обуславливающего встра-

ивание белков во внутреннюю мембрану *E. coli* (Sato et al., 2019).

На этом фоне роль гена *yhhZ* (кодирует предполагаемый полиморфный токсин семейства Hcr1) может определяться его колициноподобной активностью тРНКазы (как условия для остановки процесса трансляции). Активность токсин-антитоксина модулей характерна для образования персистеров (Maisonneuve, Gerdes, 2014; Alkadir et al., 2018), что согласуется с нашим предположением о том, что персистеры являются предшественниками ПФ (Мулюкин и соавт., 2015). Наконец, еще одним свехэкспрессируемым в ПФ геном являлся *srpP*, кодирующий периплазматический адапторный белок, который ингибирует индукцию стрессовой реакции при неправильной упаковке белков (Thede et al., 2011), а также способствует *DegP*-опосредованному протеолизу не-

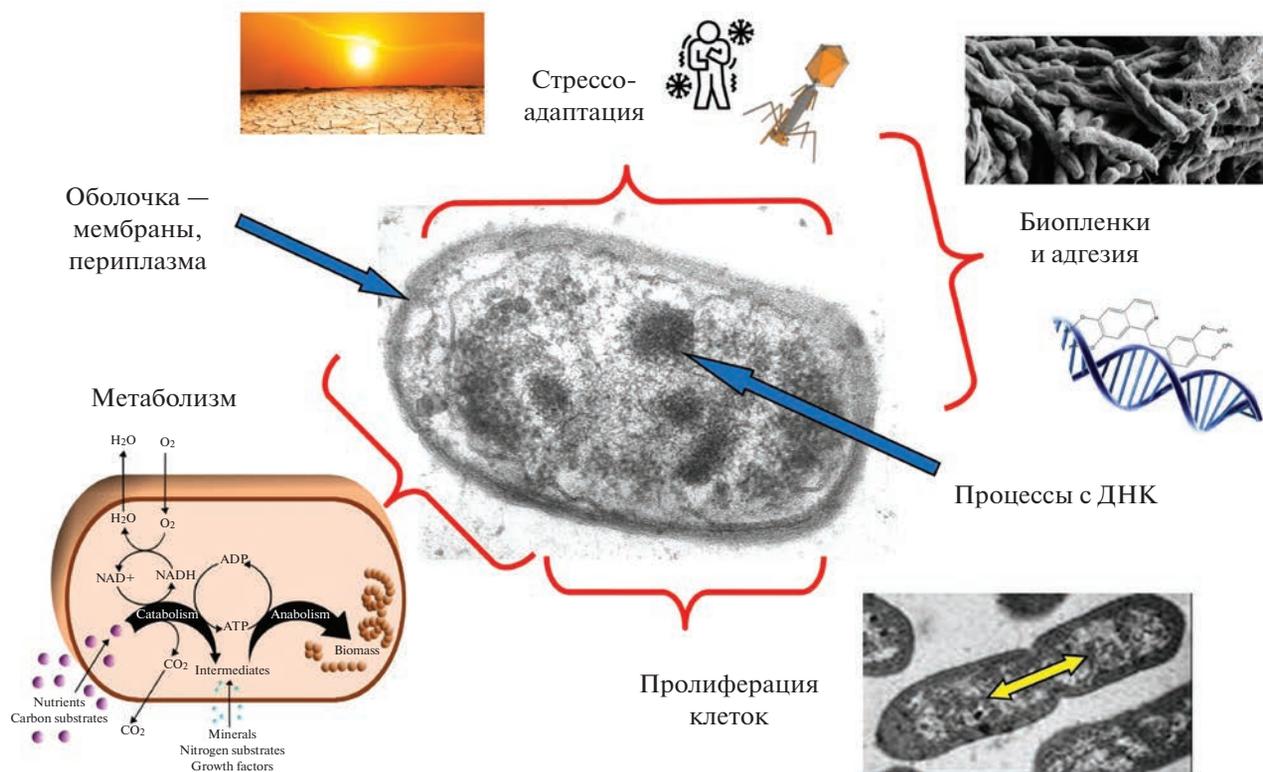


Рис. 4. Функциональные группы генов, важных для формирования покоящихся клеток *E. coli*.

правильно свернутых белков (Isaac et al., 2005). По сути, это наиболее сильно индуцированный член регулона *Spx*, который улавливает различные типы экстрацитоплазматических стрессов и устраняет их, чтобы гарантировать выживание организма и, как показывает настоящее исследование, обеспечить его переход в состояние глубокого покоя. Очевидно, что функции этих генов важны при созревании ПФ.

Из других генов отметим наиболее важные:

Функция генов *kdp* — транспорт K^+ . Его роль в формировании ПФ заключается в следующем. В конце стационарной фазы, когда в популяции достаточно энергетических субстратов, и позже в фазу лизиса, когда остается функциональной малая доля клеток-персистеров (будущих покоящихся клеток), этот транспортер нужен для энергозависимой накачки ионов K^+ в клетку. Когда энергодающие системы клеток угасают, и формируются собственно ПФ, этот белок осуществляет пассивный транспорт K^+ по градиенту концентрации (в дополнение к его выходу по порам, формирующимся в цитоплазматической мембране (Эль-Регистан и соавт., 1985; Бухарин и соавт., 2005). Вынос воды с ионами K^+ приводит к обезвоживанию цитоплазмы и ее витрификации, что является важнейшим механизмом покоя у микроорганизмов (Parry et al., 2014).

Чрезвычайно важным видится повышенная активность гена *dicB*, кодирующего белок-ингибитор деления клеток (Labie et al., 1990; Masuda et al., 2012).

Репрессирование системы выброса токсинов *AcrAB–TolC* (ген ингибитора этой системы — *acrS*) обусловлено тем, что в ее активности в нерастущей клетке нет необходимости.

Активация блока генов, связанных с адгезией и образованием биопленок, обуславливает повышенную выживаемость популяции в состоянии биопленок в ходе созревания ПФ.

Очевидной и важной для ПФ видится функция гена *rmf*, продукт которого, фактор модуляции рибосом, во время стационарной фазы преобразует незрелые рибосомы 70S в димерную форму (90S рибосомы), которые преобразуются в неактивные 100S рибосомы (процесс “рибосомальной спячки”) (Wada et al., 1995). Димеризация рибосом ведет к подавлению связывания аминоксил-тРНК, останавливает синтез белка, одновременно делая рРНК более устойчивой к деградации, что может быть оценено как универсальный механизм перехода в покоящееся состояние. Такой механизм зафиксирован также и в VBNC и клетках-персистерах (Kim et al., 2018).

Активность генов с повышенной в ПФ активностью, регулирующих активность ДНК, может

быть связана не с образованием ПФ, а с подготовкой к их пробуждению. Нейтрализация ингибитора клеточного роста продуктом гена *yhhH* выглядит более востребованной в фазе пробуждения ПФ в благоприятных условиях, а не при их формировании.

Активность четырех транспозаз (*yhhI*, *ycdC*, *ybfD*, *insK*) также видится более связанной с функционированием клеток, образующихся из проросших ПФ. Известно, что популяции, вырастающие из ПФ, характеризуются расширенным диссоциативным спектром по сравнению с активно растущими культурами (Solyanikova et al., 2011; Соляникова и соавт., 2013, 2017; Ivshina et al., 2015). При этом одним из двух механизмов переключения фенотипов является сайт-специфическая рекомбинация, основанная на наличии в переключаемых генах IS-элементов (van der Woude, Bäumlger, 2004). Ферментами, обеспечивающими функционирование таких генов, являются рекомбиназы и транспозазы (относящиеся к одному классу ДНК-узнающих рекомбиназ). Наличие широкого спектра диссоциантов обеспечивает максимальную вероятность выживания популяции бактерий, вырастающих из ПФ, в чем и заключается биологический смысл высокой активности транспозаз в ПФ.

Часть генов относится к генам с неизвестной функцией, и эти гены являются резервом для исследования механизмов формирования покоящихся клеток.

Путь превращения растущих клеток в зрелые ПФ состоит из нескольких ключевых стадий: дифференциация растущих клеток на клетки-персистеры, переход в стационарную фазу, автолиз большей части клеток, созревание персистеров в покоящиеся клетки. По литературным данным к генам, важным для формирования персистеров, относятся некоторые системы токсинов–антитоксинов, сигнальные системы с участием *ppGpp* и SOS-ответа (Maisonneuve, Gerdes, 2014). Однако, против нашего ожидания, мРНК генов, важных для формирования клеток персистеров, в нашем исследовании не найдено, за исключением некоторых генов токсинов–антитоксиновой системы, что также указывает на завершенность повышенной активности таких генов к моменту начала формирования покоящихся клеток и, поэтому, отсутствия транскриптов этих генов в ПФ.

Большая часть генов ожидаемо снижала активность при переходе из активного состояния в покоящееся (приложение S1). Однако пятнадцать генов снижали свою активность в 200 и более раз (табл. 5). Рассмотрим их функции.

Наиболее выраженная репрессия зафиксирована для расположенных рядом и совместно транскрибируемых генов *treB* и *treC*, вовлеченных в процесс транспорта и метаболизма трегалозы (Klein et al., 1995). Зафиксированное снижение в

ПФ уровня экспрессии генов *treB* и *treC* в 2–4 тыс. раз относительно экспоненциально растущих клеток свидетельствует о практически полном выключении рассматриваемого транспортного и метаболического процессов.

Существенно ингибируемым в ПФ оказался и процесс транспорта железа белком внешней мембраны FecA, функционирующим также как приемник и передатчик сигнала для инициации транскрипции *fec*-оперона (Sauter et al., 2004). Уровень экспрессии гена *fecA* снижался в 1460 раз, что ожидаемо кратно подавляло транскрипцию расположенных рядом генов *fecE*, *fecD*, *fecC* и *fecB*, кодирующих структурные белки ABC-транспортера цитрата железа.

Еще одной группой генов, активность которых существенно угнеталась в ПФ, оказались гены, связанные с транспортом и метаболизмом органических кислот и аминокислот:

ген *nanA*, продукт которого катализирует альдольное расщепление N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты с образованием пирувата и N-ацетилманнозамина;

ген *garD*, ответственный за утилизацию D-галактарата, и ген *garP*, кодирующий предполагаемый переносчик D-галактарата;

ген *nagB*, отвечающий за деградацию глюкозамина, что также сопровождалась нарушением транспорта названного аминокислота вследствие снижения экспрессии рядом расположенного гена *nagE*;

ген *mgIB*, отвечающий за транспорт D-галактозы/метилгалактозида;

гены *manX*, *manY* и *manZ*, в совокупности отвечающие за функционирование маннозо-специфической фосфотрансферазной системы.

В транскриптом ПФ также обнаружено выраженное снижение экспрессии фермента энергетического метаболизма фосфоглицератмутазы, катализирующего взаимопревращение 2- и 3-фосфоглицерата в гликолитическом и глюконеогенном путях (активность гена *gpmM* подавлена в 247 раз), а также нарушение метаболизма аминокислот как следствие снижения экспрессии периплазматической L-аспарагиназы (продукта гена *ansB*) – в 200 раз.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о комплексном подавлении процессов транспорта и метаболизма низкомолекулярных соединений в ПФ *E. coli* K12 MG1655, в ряде случаев сопряженных с нарушением энергетического метаболизма. Тем самым данный результат хорошо согласуется с устойчивыми представлениями о гипо- и анабиотическом статусе покоящихся форм неспорообразующих бактерий (Karelyants et al., 1993; Бухарин и соавт., 2005), позволяющем им длительно сохранять свою жизнеспособность.

Таблица 5. Гены, уровень транскрипции которых снижался в покоящихся клетках *E. coli* K12 MG1655 относительно экспоненциально растущих клеток в 200 и более раз

Ген	Продукт гена/функция	Функциональный блок (см. табл. 2)	Кратность понижения уровня экспрессии
<i>ansB</i>	Периплазматическая L-аспарагиназа	I	200
<i>garP</i>	Предполагаемый переносчик D-галактарата	I	204
<i>gpmM</i>	Фосфоглицеромутаза III (кофактор-независимая)	I/III	247
<i>manY</i>	Маннозо-специфический фермент фосфотрансферазной системы (ПС компонент)	I	252
<i>manX</i>	Маннозо-специфический фермент фосфотрансферазной системы (IIA и IIB компоненты)	I	280
<i>yeiQ</i>	Предполагаемая НАД-зависимая D-маннонатовоксидоредуктаза	I/III	290
<i>nagE</i>	N-ацетилглюкозамин-специфический фермент фосфотрансферазной системы (ПС, IIB и IIA компоненты)	I	302
<i>tdcE</i>	2-кетобутиратформиат-лиаза (пируватформиат-лиаза)	I/III	311
<i>mglB</i>	D-галактоза/метилгалактозид-связывающий периплазматический белок	I	348
<i>nagB</i>	Глюкозамин-6-фосфатдеаминаза	I/III	364
<i>garD</i>	D-галактаратдегидрогеназа	I/III	552
<i>nanA</i>	N-ацетилнейраминалиаза	I/III	732
<i>fecA</i>	Белок внешней мембраны – переносчик цитрата железа, приемник и передатчик сигнала для инициации транскрипции <i>fec</i> -оперона	I	1459
<i>treC</i>	Трегалозо-6-фосфатгидролаза	I/III	1867
<i>treB</i>	Трегалозо-специфический фермент фосфо-трансферазной системы (IIB и IIC компоненты)	I	4302, 585

Полученные нами данные соотносятся с аналогичными, полученными другими исследователями.

Транскриптомный анализ созревания ПФ микобактерий (Wu et al., 2016) выявил, что снижается активность генов трансляции и транскрипции, гены клеточного деления сначала активируются, а к моменту созревания ПФ снижают активность на несколько порядков, что согласуется с нашими данными. Гены энергетического метаболизма в большинстве активируются до 1000 раз, гены сигнальных систем и факторов транскрипции вели себя разнонаправлено: некоторые сигма-факторы и факторы транскрипции индуцировались, синтез других подавлялся. В нашей работе мРНК факторов транскрипции в ПФ не активировались.

В покоящихся некультивируемых клетках *M. tuberculosis* (Ignatov et al., 2015), как и в нашей работе, было отмечено снижение уровня мРНК на порядок (в 30–50 раз). В них сохранялись мРНК, кодирующие ферменты биосинтеза, белки, участвующие в процессах адаптации и репарации, детоксикации и контроле инициации транскрипции,

а также некодирующие малые РНК. Повышение активности отмечено для генов синтеза НАДН-дегидрогеназы II (*ndhA*) и системы взаимодействия этого патогена с хозяином PE-PGRS (51 ген из 62 был активирован), большинство генов основного метаболизма активированы не были. Однако покоящиеся некультивируемые клетки *M. tuberculosis* существенно отличаются от ПФ *E. coli*.

Анализ транскриптома при созревании спор грамотрицательных микобактерий (Müller et al., 2010) выявил, что при созревании спор микобактерий подавлялись в наибольшей степени гены энергетического метаболизма, низкомолекулярных интермедиатов, синтеза и оборота белка, клеточных оболочек, регуляторов, а активировались – передачи сигнала, транскрипции, метаболизма ДНК. Данный паттерн активации генов весьма отличен от *E. coli* и других грамотрицательных бактерий.

В работе (Dong, Bauer, 2015) исследовали транскриптом форм покоя (цист) других грамотрицательных бактерий, родоспиррилл. При созревании цист повышалась активность (экспрессия) следующих генов: транспорт неорганических ионов,

движение клеток, оборот белков, метаболизм липидов и углеводов, энергетический. Такая ситуация естественна для начала процесса созревания ПФ.

Для анализа наших данных представляет особый интерес работа Arunasri et al. (2014), в которой исследовали транскриптом длительной стационарной фазы *E. coli*, в которой речь идет об условиях, аналогичных нашей работе. Этой группой выявлено, что в поздней стационарной фазе существенно меняется экспрессия 95 генов (22 — активируются, 73 — подавляются). Активировались 9 генов, связанных с метаболизмом ДНК, IS-элементами и транспозицией генов, 2 гена с N-повторностями, 3 гена метаболизма, а подавлялись — связанные с синтезом белка, транспортом и метаболизмом, что совпадает с нашими результатами. В силу иного акцента указанных исследований, авторы работы Arunasri et al. (2014) не связывали активность генов с созреванием ПФ.

Интересно, что в ПФ бацилл, спорах, найдено всего 23 типа транскриптов (Keijser et al., 2007), тогда как в ПФ *E. coli* присутствуют транскрипты практически всех генов. Очевидно, что такая ситуация происходит по причине принципиальной разницы спор и цистоподобных ПФ.

Таким образом, можно заключить, что:

(1) впервые проведен транскриптомный анализ форм глубокого покоя, цистоподобных покоящихся клеток *E. coli*;

(2) впервые показано присутствие в них существенного количества мРНК практически всех генов;

(3) количество мРНК по сравнению с экспоненциальным ростом в пересчете на одну клетку снижено в 13.5 раз, но она функционально полноценна;

(4) в ПФ обнаруживаются транскрипты большинства генов; транскрипты распределены по клеткам популяции не равномерно, только небольшая часть генов представлена транскриптами во всех клетках популяции. Поэтому клетки популяции ПФ крайне гетерогенны по представленности транскриптами — во всех клетках работают лишь самые нужные гены, а большая часть генов может быть активна лишь в некоторой части клеток популяции, что обуславливает гетерогенность клеток популяции;

(5) только 21% генов представлены транскриптами в каждой клетке. Эти гены важны для реализации самых важных функций (core-metabolism). Остальные гены, которых большинство, очевидно, кодируют ферменты с функциями, без которых в условиях опыта можно выжить. Эти гены обуславливают гетерогенность популяции. Одна группа клеток имеет ферменты и системы, дающие им преимущество в данных условиях роста, такие клетки составляют доминирующий фенотип. Часть клеток, не имеющая важных белков,

будет проигрывать конкуренцию клеткам доминантного фенотипа и медленнее расти, они составляют минорные фенотипы. В последнем случае клетки могут иметь преимущества при изменении условий роста (в пределах видовых пределов роста и развития);

(6) причиной наличия мРНК в покоящихся клетках, очевидно, является ингибирование активности гидролаз, включая РНКазы, что характерно для ПФ;

(7) разработанный алгоритм расчета дифференциальной активности генов на основе учета количества РНК в одной клетке позволил вычленивать наиболее активные гены. Использование альтернативных алгоритмов выявляло число генов с повышенной активностью в ПФ относительно растущих клеток на порядок больше, что затрудняет проведение анализа;

(8) гены, представленные в ПФ транскриптами, представлены тремя онтогенетическими группами — а) специфическими для ПФ, важными для формирования ЦПК; б) неспецифическими, оставшимися от предыдущих стадий развития; в) важными для последующих стадий — прорастания и активного роста. Функционально эти гены относятся к группам:

обеспечивающим функциональность генома (ДНК) (токсин/антитоксинавая система, иммунитет, транспозазы;

связанным с функционированием оболочек клетки (мембраны, периплазмы);

метаболизма;

образования и функционирования биопленок и связанного с этим коллективного поведения;

стрессоадаптации;

регуляции пролиферации (клеточное деление, консервация рибосом).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по госзаданию для ФИЦ Биотехнологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.

- Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* шт. 504 // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 811–819.
- Doroshenko E.V., Loiko N.G., Il'inskaya O.N., Kolpakov A.I., Gornova I.B., Klimanova E.V., El'-Registan G.I. Characterization of *Bacillus cereus* dissociants // Microbiology (Moscow). 2001. V. 70. P. 698–706.
- Капельянец А.С., Скрыпин В.И., Эль-Регистан Г.И., Стоянович Ф.М., Лилле Ю.Э., Островский Д.Н. Изменение структурного состояния мембран *M. lysodeikticus* под влиянием препаратов ауторегуляторных факторов d₁ // Прикл. биохимия и микробиология. 1985. Т. 21. С. 378–381.
- Лойко Н.Г., Сузина Н.Е., Соина В.С., Смирнова Т.А., Зубашева М.В., Азизбекян Р.Р., Синицын Д.О., Терешкина К.Б., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Биокристаллические структуры в нуклеоидах стационарных и покоящихся клеток прокариот // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 703–719.
- Loiko N.G., Suzina N.E., Soina V.S., Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Azizbekyan R.R., Siniцыn D.O., Tereshkina K.B., Nikolaev Yu.A., Krupyanskiy Yu.F., El'-Registan G.I. Biocrystalline structures in the nucleoids of the stationary and dormant prokaryotic cells // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 714–728.
- Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Формы выживания *Pseudomonas aeruginosa* при антибиотической обработке // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 645–659.
- Mulyukin A.L., Kozlova A.N., Sorokin V.V., Suzina N.E., Cherdynitseva T.A., Kotova I.B., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V., El'-Registan G.I. Surviving forms in antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 751–764.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Структурное и физиологическое разнообразие цистоподобных покоящихся клеток бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 512–523.
- Mulyukin A.L., Suzina N.E., Duda V.I., El'-Registan G.I. Structural and physiological diversity among cystlike resting cells of bacteria of the genus *Pseudomonas* // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 455–466.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Погорелова А.Ю., Антонюк Л.П., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 42–51.
- Mulyukin A.L., Suzina N.E., Pogorelova A.Yu., Antonyuk L.P., Duda V.I., El'-Registan G.I. Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 33–42.
- Погорелова А.Ю., Мулюкин А.Л., Антонюк Л.П., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Фенотипическая вариабельность у *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и Sp245: сопряженность с состоянием покоя и свойства диссоциантов // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 618–628.
- Pogorelova A.Y., Mulyukin A.L., Galchenko V.F., El'-Registan G.I., Antonyuk L.P. Phenotypic variability in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: association with dormancy and characteristics of the variants // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 559–568.
- Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Кряжевских Н.А., Сузина Н.Е., Воробьева Л.И., Дуда В.И., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Покоящиеся формы *Micrococcus luteus* и *Arthrobacter globiformis*, не прорастающие на стандартных средах // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 456–468.
- Mulyukin A.L., Demkina E.V., Kryazhevskikh N.A., Suzina N.E., Vorob'eva L.I., Duda V.I., Galchenko V.F., El'-Registan G.I. Dormant forms of *Micrococcus luteus* and *Arthrobacter globiformis* not platable on standard media // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 407–419.
- Ратнер В.А. Что содержит геном *Escherichia coli*? // Вавилонский журн. генетики и селекции. 2002. № 18. Статья 1.
- Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Егозарьян Н.С., Поливцева В.Н., Мулюкин А.Л., Егорова Д.О., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Особенности структурно-функциональных перестроек клеток актинобактерий BN52 при переходе от вегетативного роста в состояние покоя и при прорастании покоящихся форм // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 463–475.
- Solyanikova I.P., Suzina N.E., Egozarjan N.S., Polivtseva V.N., Mulyukin A.L., Egorova D.O., El'-Registan G.I., Golovleva L.A. Structural and functional rearrangements in the cells of actinobacteria *Microbacterium foliorum* BN52 during transition from vegetative growth to a dormant state and during germination of dormant forms // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 476–487.
- Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Влияние состояния покоя на штамм *Pseudomonas fluorescens* 26K – деструктор ксенобиотиков // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 552–562.
- Solyanikova I.P., Suzina N.E., Mulyukin A.L., El'-Registan G.I., Golovleva L.A. Effect of a dormant state on the xenobiotic-degrading strain *Pseudomonas fluorescens* 26K // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 562–571.
- Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Голод Н.А., Милько Е.С., Воейкова Т.А., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция фенотипической диссоциации у *Bacillus licheniformis* // Журнал микробиол., эпидемиол. иммунобиол. 2006. № 6. С. 9–13.
- Цыганкова С.В., Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Хабибуллин С.С., Дорошенко Е.В., Коротков Е.В., Эль-Регистан Г.И. Получение внутривидовых диссоциантов некоторых бацилл и применение метода DIR-ПЦР для их идентификации // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 398–405.
- Tsygankova S.V., Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Khabibulin S.S., Doroshenko E.V., Korotkov E.V., El'-Registan G.I. Obtaining of intrapopulational dissociants of some bacilli and the use of DIR-PCR for their identification // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 334–341.
- Agafonov D.E., Spirin A.S. The ribosome-associated inhibitor A reduces translation errors // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 320. P. 354–358.
- Alkasir R., Ma Y., Liu F., Li J., Lv N., Xue Y., Hu Y., Zhu B. Characterization and transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* persister cells // Microbial. Drug Resist. 2018. V. 24. P. 1466–1474.
- Almiron M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in

- starved *Escherichia coli* 2646 // Genes & Development. 1992. V. 6. P. 2646–2654.
- Armstrong R.L., Sueoka N. Phase transitions in ribonucleic acid synthesis during germination of *Bacillus subtilis* spores // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968. V. 59. P. 153–160.
- Arunasri K., Adil M., Khan P.A.A., Shivaji S. Global gene expression analysis of long-term stationary phase effects in *E. coli* K12 MG1655 // PLoS One. 2014. V. 9. Art. e96701.
- Bishop H.L., Doi R.H. Isolation and characterization of ribosomes from *Bacillus subtilis* spores // J. Bacteriol. 1966. V. 91. P. 695–701.
- Boaretti M., Lleo M.M., Bonato B., Signoretto C., Canepari P. Involvement of rpoS in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state // Environ. Microbiol. 2003. V. 5. P. 986–996.
- Boone T., Driks A. Protein synthesis during germination: shedding new light on a classical question // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 3251–3253.
- Chung L.M., Ferguson J.P., Zheng W., Qian F., Bruno V., Montgomery R.R., Zhao H. Differential expression analysis for paired RNA-seq data // BMC Bioinform. 2013. V. 14. P. 110.
- Doi R.H., Igarashi R.T. Ribonucleic acids of *Bacillus subtilis* spores and sporulating cells // J. Bacteriol. 1964. V. 87. P. 323–328.
- Domka J., Lee J., Bansal T., Wood T.K. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 332–346.
- Dong Q., Bauer C.E. Transcriptome analysis of cyst formation in *Rhodospirillum centenum* reveals large global changes in expression during cyst development // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 68.
- Dworkin M., Gibson S.M. A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus* // Science. 1964. V. 146. P. 243–244.
- Flores-Kim J., Darwin A.J. The phage shock protein response // Annu. Rev. Microbiol. 2016. V. 70. P. 83–101.
- Hammer N.D., Schmidt J.C., Chapman M.R. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 12494–12499.
- Hayashi K., Morooka N., Yamamoto Y., Fujita K., Isono K., Choi S., Ohtsubo E., Baba T., Wanner B.L., Mori H., Horiuchi T. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110 // Mol. Syst. Biol. 2006. V. 2. Art. 2006.0007.
- Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 954.
- Isaac D.D., Pinkner J.S., Hultgren S.J., Silhavy T.J. The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 17775–17779.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0508936102>
- Ishihama A. Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival // Genes to Cells. 1999. V. 4. P. 135–143.
- Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. P. 307–314.
- Jones S.E., Lennon J.T. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 5881–5886.
- Kannan G., Wilks J.C., Fitzgerald D.M., Jones B.D., Bondurant S.S., Slonczewski J.L. Rapid acid treatment of *Escherichia coli*: transcriptomic response and recovery // BMC Microbiol. 2008. V. 8. P. 37.
- Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. Dormancy in non-sporulating bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 1993. V. 3–4. P. 271–285.
- Keijser B.J.F., Beek A.T., Rauwerda H., Schuren F., Montijn R., van der Spek H., Brul I S. Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 3624–3634.
- Kim J.S., Chowdhury N., Yamasaki R., Wood T.K. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state // Environ. Microbiol. 2018. V. 20. P. 2038–2048.
- Klein W., Horlacher R., Boos W. Molecular analysis of *treB* encoding the *Escherichia coli* enzyme II specific for trehalose // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 4043–4052.
<https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4043-4052.1995>
- Koch R. The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis* // Beiträge zur Biologie der Pflanzen. 1876. V. 2. P. 277–310.
- Kong I.S., Bates T.C., Hulsmann A., Hassan H., Smith B.E., Oliver J.D. Role of catalase and oxyR in the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus* // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 50. P. 133–142.
- Kvam V.M., Liu P., Si Y. A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data // Am. J. Bot. 2012. V. 99. P. 248–256.
- Labie C., Bouché F., Bouché J.P. Minicell-forming mutants of *Escherichia coli*: suppression of both DicB- and MinD-dependent division inhibition by inactivation of the *minC* gene product // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 5852–5855.
- Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters // Cell. 2014. V. 157. P. 539–548.
- Masuda H., Tan Q., Awano N., Wu K., Inouye M. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2012. V. 84. P. 979–989.
- Milo R., Phillips R. Cell biology by the numbers. N.Y.: Garland Science, 2015. 400 p.
<https://doi.org/10.1201/9780429258770>
- Müller F.-D., Treuner-Lange A., Heider J., Huntley S.M., Higgs P.I. Global transcriptome analysis of spore formation in *Myxococcus xanthus* reveals a locus necessary for cell differentiation // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 264.
- Oren A., Garrity G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71.
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005056>
- Oshlack A., Robinson M.D., Young M.D. From RNA-seq reads to differential expression results // Genome Biol. 2010. V. 11. P. 220.
- Parry B.R., Surovtsev I.V., Cabeen M.T., O'Hern C.S., Dufresne E.R., Jacobs-Wagner C. The bacterial cytoplasm has

- glass-like properties and is fluidized by metabolic activity // *Cell*. 2014. V. 156. P. 183–194.
- Pinto D., Santos M.A., Chambel L. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms // *Crit. Rev. Microbiol.* 2015. V. 41. P. 61–76.
- Raivio T.L., Leblanc S.K.D., Price N.L. The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. P. 2755–2767.
- Rennella E., Sára T., Juen M., Wunderlich C., Imbert L., Solyom Z., Favier A., Ayala I., Weinhäupl K., Schanda P., Konrat R., Kreutz C., Brutscher B. RNA binding and chaperone activity of the *E. coli* cold-shock protein CspA // *Nucleic Acids Res.* 2017. V. 45. P. 4255–4268.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell. Biol.* 1963. V. 17. P. 208–213.
- Richmond C.S., Glasner J.D., Mau R., Jin H., Blattner F.R. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12 // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 3821–3835.
- Rolfe M.D., Rice C.J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A.D.S., Alston M., Stringer M.F., Betts R.P., Baranyi J., Peck M.W., Hinton J.C.D. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. P. 686–701.
- Sastry A.V., Gao Y., Szubin R., Hefner Y., Xu S., Kim D., Choudhary K.S., Yang L., King Z.A., Palsson B.O. The *Escherichia coli* transcriptome mostly consists of independently regulated modules // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 5536. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13483-w>
- Sato R., Sawasato K., Nishiyama K. YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPIase involved in membrane protein integration // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 510. P. 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.145>
- Sauter A., Braun V. Defined inactive FecA derivatives mutated in functional domains of the outer membrane transport and signaling protein of *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 5303–5310.
- Schwahnäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control // *Nature*. 2011. V. 473. P. 337–342.
- Selinger D.W., Saxena R.M., Cheung K.J., Church G.M., Rosenow C. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation // *Genome Res.* 2003. V. 13. P. 216–223.
- Setlow P. Germination of spores of *Bacillus* Species: what we know and do not know // *J. Bacteriol.* 2014. V. 196. P. 1297–1305.
- Setlow P. Protein metabolism during germination of *Bacillus megaterium* spores. II. Degradation of pre-existing and newly synthesized protein // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. P. 631–637.
- Shah D., Zhang Z., Khodursky A.B., Kaldalu N., Kurg K., Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli* // *BMC Microbiol.* 2006. V. 6. P. 53.
- Sinai L., Rosenberg A., Smith Y., Segev E., Ben-Yehuda S. The molecular timeline of a reviving bacterial spore // *Molecular Cell*. 2015. V. 57. P. 695–707.
- Solyanikova I.P., Suzina N.E., Golovleva L.A., Mulyukin A.L., El-Registan G.I. Improved xenobiotic-degrading activity of *Rhodococcus opacus* strain Icp after dormancy // *J. Environ. Sci. Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 2011. V. 46. C. 638–647.
- Soneson C., Delorenzi M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data // *BMC Bioinform.* 2013. V. 14. P. 91.
- Sussman A.S., Douthitt H.A. Dormancy in microbial spores // *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 1973. V. 24. P. 311–352.
- Tatusov R.L., Galperin M.Y., Natale D.A., Koonin E.V. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 33–36.
- Thede G.L., Arthur D.C., Edwards R.A., Buelow D.R., Wong J.L., Raivio T.L., Glover J.N.M. Structure of the periplasmic stress response protein CpxP // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 2149–2157.
- Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J.L., Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 46–53.
- Ueta M., Wada C., Daifuku T., Sako Y., Bessho Y., Kitamura A., Ohniwa R.L., Morikawa K., Yoshida H., Kato T., Miyata T., Namba K., Wada A. Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria // *Genes to Cells*. 2013. V. 18. P. 554–574.
- van der Woude M.W., Bäuml A.J. Phase and antigenic variation in bacteria // *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. V. 17. P. 581–611. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.3.581-611>
- Wada A., Igarashi K., Yoshimura S., Aimoto S., Ishihama A. Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 214. P. 410–417.
- Wada A. Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes // *Genes Cells*. 1998. V. 3. P. 203–208.
- Wada A., Yamazaki Y., Fujita N., Ishihama A. Structure and probable genetic location of a “ribosome modulation factor” associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 2657–2661.
- Wagley S., Morcrette H., Kovacs-Simon A., Yang Z.R., Power A., Tennant R. K., Love J., Murray N., Titball R.W., Butler C.S. Bacterial dormancy: a subpopulation of viable but non-culturable cells demonstrates better fitness for revival // *PLoS Pathogens*. 2012. V. 17. Art. e1009194.
- Wainwright J., Hobbs G., Nakouti I. Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies // *Arch. Microbiol.* 2021. V. 203. P. 5899–5906.
- White-Ziegler C.A., Um S., Pérez N.M., Berns A.L., Malhowski A.J., Young S. Low temperature (23°C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12 // *Microbiology (SGM)*. 2008. V. 154. P. 148–166. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012021-0>
- Wu M.-L., Gengenbacher M., Chung J.C.S., Chen S.L., Mollenkopf H.-J., Kaufmann S.H.E., Dick T. Developmental transcriptome of resting cell formation in *Mycobacterium smegmatis* // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. P. 837.

Yoshida H., Nakayama H., Maki Y., Ueta M., Wada C., Wada A. Functional sites of ribosome modulation factor (RMF) involved in the formation of 100S ribosome // Front. Mol. Biosci. 2021. V. 8. P. 661691.

Zhang D., de Souza R.F., Anantharaman V., Iyer L.M., Aravind L. Polymorphic toxin systems: comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of ac-

tion, immunity and ecology using comparative genomics // Biology Direct. 2012. V. 7. P. 18.

Zhang X.H., Ahmad W., Zhu X.Y., Chen J., Austin B. Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms // Mar. Life Sci. Technol. 2021. V. 3. P. 189–203.

Transcriptome Analysis of *Escherichia coli* Dormant Cystlike Cells

Yu. A. Nikolaev^{1, *}, N. G. Loiko¹, O. A. Galuza¹, A. V. Mardanov², A. V. Beletskii², D. G. Deryabin³, E. V. Demkina¹, and G. I. El'-Registan¹

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

² Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

³ Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia
*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Received July 9, 2023; revised July 19, 2023; accepted July 20, 2023

Abstract—The transcriptome of *Escherichia coli* cystlike dormant cells was investigated. RNA content in a single dormant cell was 0.26 fg, i.e., 13.5 times less than in a cell of a growing culture. The presence of mRNA in *E. coli* dormant cells has not been reported previously. The pools of gene reads for the dormant and growing cells were characterized, as well as the differential expression of all genes, calculated according to the special algorithm considering the average mRNA amount in a single cell. The notion of the genes active in every cell of the population was introduced. In each cell of the dormant and growing *E. coli* population, such genes were represented by the transcripts of 21 and 16% of the genes, respectively. The revealed cell heterogeneity in the set of active genes is one of the reasons (and forms) of heterogeneity of bacterial populations. Sixty genes were revealed, for which activity increased twice or more during formation of *E. coli* dormant cells. These were the genes responsible for genome activity, structure and properties of the cell envelope, cell proliferation, stress adaptation, biofilm formation and functioning, and collective behavior, as well as the genes providing for survival of the cell population during germination of the dormant cells.

Keywords: cystlike dormant cells, *Escherichia coli* K12, transcriptome

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

АНОКСИГЕННЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ МЕРОМИКТИЧЕСКОГО
ОЗЕРА БОЛЬШИЕ ХРУСЛОМЭНЫ (О. ОЛЕНИЙ, КАНДАЛАКШСКИЙ
ЗАЛИВ, МУРМАНСКАЯ ОБЛАСТЬ, РОССИЯ)

© 2023 г. О. Н. Лунина^а *, Д. С. Груздев^б, С. В. Пацаева^с, А. А. Жильцова^с, Н. Е. Сузина^д,
Е. Д. Краснова^е, Д. А. Воронов^в, Н. М. Кокрятская^г, Е. Ф. Веслополова^а, А. С. Саввичев^а

^а Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ

“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117312 Россия

^б *ciBear OU, Tartu Mnt 67/1-13b, Kesklinna Linnaosa, Tallinn, 10115 Estonia*

^с Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^д Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук” (ФИЦ ПНЦБИ РАН), Пушкино, 142290 Россия

^е Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^ф Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, 127051 Россия

^г Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова УрО РАН, Архангельск, 163020 Россия

*e-mail: onlun@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.05.2023 г.

После доработки 03.07.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Проведено исследование сообщества аноксигенных фототрофных бактерий водной толщи меромиктического оз. Большие Хрусломены в зимнее время, определен его состав и структура. Сообщество развивалось на глубине 4.25 м, в подледный период его активность была крайне низкой (6.2 мкмоль С л⁻¹ сут⁻¹). Цвет воды в зоне максимального развития фототрофных бактерий был необычным, лимонно-желтым, предположительно за счет образования и накопления в ней полисульфидов. Цвет придонной воды также был лимонно-желтым, придонная вода была устойчива к окислению кислородом воздуха. В слое максимального развития АФБ содержание Бхл *d* зелено-окрашенных зеленых серобактерий существенно превышало содержание Бхл *e* коричнево-окрашенных зеленых серобактерий и составляло 77 и 23% соответственно. Из воды озера выделены культуры зеленых и пурпурных серобактерий, определены их физиологические и генетические характеристики. Два штамма зеленых серных бактерий (коричнево-окрашенный *BrKhr17* и зелено-окрашенный *GrKhr17*) содержали в клетках газовые вакуоли. Филогенетически они оказались наиболее близки к зелено-окрашенному штамму *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 265 и по совокупности свойств были причислены к новым штаммам вида *Chlorobium phaeovibrioides*.

Ключевые слова: арктические экосистемы, Белое море, меромиктические озера, полисульфиды, зеленые серные бактерии, *Chlorobium phaeovibrioides*, пурпурные серобактерии, *Thiocapsa*, *Thiocystis gelatinosa*, бактериохлорофиллы *d* и *e*, флуоресцентное разделение пигментов

DOI: 10.31857/S0026365623600268, EDN: CZCZEV

Аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ) являются типичными обитателями освещенной границы сероводородной зоны водной толщи стратифицированных водоемов. Сообщества АФБ разнообразны, и их видовой состав, плотность и структура определяются типом водоема и совокупностью физико-химических факторов, из которых наиболее существенное значение имеют минерализация воды, pH, освещенность, наличие

биогенных элементов, а также прозрачность и цветность расположенной выше толщи воды.

Участвуя в процессах круговорота углерода и серы, АФБ являются продуцентами органического вещества и осуществляют светозависимое окисление сероводорода. Вместе с нефототрофными серобактериями, АФБ предотвращают проникновение сероводорода в верхние слои воды и отравление водоема. Продукция АФБ часто сопоставима с продукцией оксигенных фототрофов, а

нередко и значительно превышает ее, например, в оз. Могильное (Горленко и соавт., 1977). Для зеленых серных бактерий (ЗСБ), развивающихся в условиях постоянного присутствия сероводорода, характерно окисление сероводорода до этапа образования молекулярной серы.

Сера, продуцируемая микробами серного цикла в процессе окисления сульфидов, имеет разнообразные формы. К настоящему времени в бактериях, накапливающих серу, было идентифицировано множество химических соединений, отличных от циклооктасеры (S_8), включая неорганические полисульфиды (S_n^{2-}), политионаты ($-O_3S-S_n-SO_3^-$) и длинноцепочечные органосульфаны ($R-S_n-R$). Растворимость этих соединений S^0 в воде различна: от почти нерастворимых колец S_8 до чрезвычайно растворимых неорганических полисульфидов (Berg et al., 2014). Известно, что глобулы серы, продуцируемые фототрофными бактериями, состоят из длинных цепей, оканчивающихся органическими группами, тогда как хемотрофные бактерии производят глобулы, состоящие из серных колец (S_8) (Kleinjan et al., 2003).

При доминировании ЗСБ в стратифицированных водоемах часто развиваются как зелено-окрашенные (з/о) так и коричнево-окрашенные (к/о) виды, соотношение их клеток может сильно варьировать. В настоящий момент в научной литературе нет четкого объяснения тому факту, что в одних озерах развиваются преимущественно з/о ЗСБ, а в других – к/о ЗСБ.

Данная работа является продолжением микробиологических исследований структуры и состава сообщества АФБ водной толщи меромиктических озер в районе Беломорской биологической станции МГУ им. М.В. Ломоносова. Ранее нами были подробно исследованы состав и структура сообществ АФБ из озер Кисло-Сладкое (Лунина и соавт., 2014; 2016) и Трехцветное (Лунина и соавт., 2019). В исследованиях этих и других меромиктических озер данного региона, проводимых на протяжении 20 лет, было неоднократно показано, что для хемоклина водной толщи характерно массовое развитие ЗСБ (Краснова и соавт., 2015; Krasnova et al., 2018). При этом в сообществах АФБ наблюдается совместное развитие з/о и к/о ЗСБ в различных соотношениях (Kharcheva et al., 2016; Жильцова и соавт., 2018; Харчева и соавт., 2018).

Микробиологические исследования оз. Большие Хрусломены начаты в 2017 г. Были определены состав и функциональная активность микробных сообществ озера в зимний и летний сезоны, а также скорости проходящих в нем микробных процессов (автотрофная и гетеротрофная фиксация CO_2 , сульфатредукция, метаногенез и окисление метана) (Федулов и соавт., 2018; Саввичев

и соавт., 2019; Savvichev et al., 2020). Также был проведен метагеномный анализ состава микробного сообщества хемоклина озера (Kadnikov et al., 2019) и выполнен полный сиквенс геномов двух штаммов ЗСБ, выделенных нами из хемоклина оз. Большие Хрусломены (Grouzdev et al., 2019).

Задачами данной работы было определить классическими методами микробиологии состав фототрофного сообщества зоны хемоклина оз. Большие Хрусломены и попытаться проанализировать причины доминирования одной из окрашенных форм зеленых серных бактерий (зеленой или коричневой). В работе были использованы метод расчета содержания бактериохлорофиллов ($d + e$) по спектрам поглощения природной воды, и метод разделения содержания Бхл d и Бхл e с помощью флуоресцентной спектроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оз. Большие Хрусломены ($66^{\circ}43'01''$ N $32^{\circ}51'31''$) расположено на острове Олений, губа Ковда, пос. Лесозаводский, Кандалакшский залив Белого моря (рис. 1). В отличие от ранее исследованных нами прибрежных озер, отделившихся от Белого моря благодаря постепенному поднятию суши, оз. Большие Хрусломены и рядом расположенное оз. Малые Хрусломены (ныне оз. Банное), были созданы искусственно при постройке лесозавода на о. Олений в 1895 г. До постройки лесозавода оба этих озера представляли собой глубоко врезающиеся в сушу морские заливы (рис. 2) (Сент-Илер, 1909). Отсюда понятна необычная форма оз. Большие Хрусломены: 1000×280 м, с сильно изрезанной береговой линией, включающей также три больших залива (длиной 300, 300 и 600 м). По сравнению с другими исследованными водоемами на побережье Белого моря, это озеро по-настоящему глубокое: его глубина достигает 21 м.

Отбор проб воды осуществляли в марте 2017 г. со льда в точке с глубиной 17–18 м с помощью портативного насоса Whale Premium Submersible Pump GP1352 (США) с силиконовой трубкой и калиброванным тросом.

Физико-химическая характеристика воды. Общую соленость воды определяли кондуктометром WTW Condi 3110 (Германия). Концентрацию кислорода измеряли *in situ* кислородомером “Марк 302 Е” (Россия) с погружным зондом, с поправкой на температуру и соленость; рН определяли портативным рН-метром WaterLiner (Китай). Освещенность измеряли люксметром AR813A (Китай), модифицированным для погружения регистрирующего элемента под воду, с калиброванным тросом. Содержание сероводорода и общую численность микроорганизмов определяли по методикам, описанным ранее (Лунина и соавт., 2019).

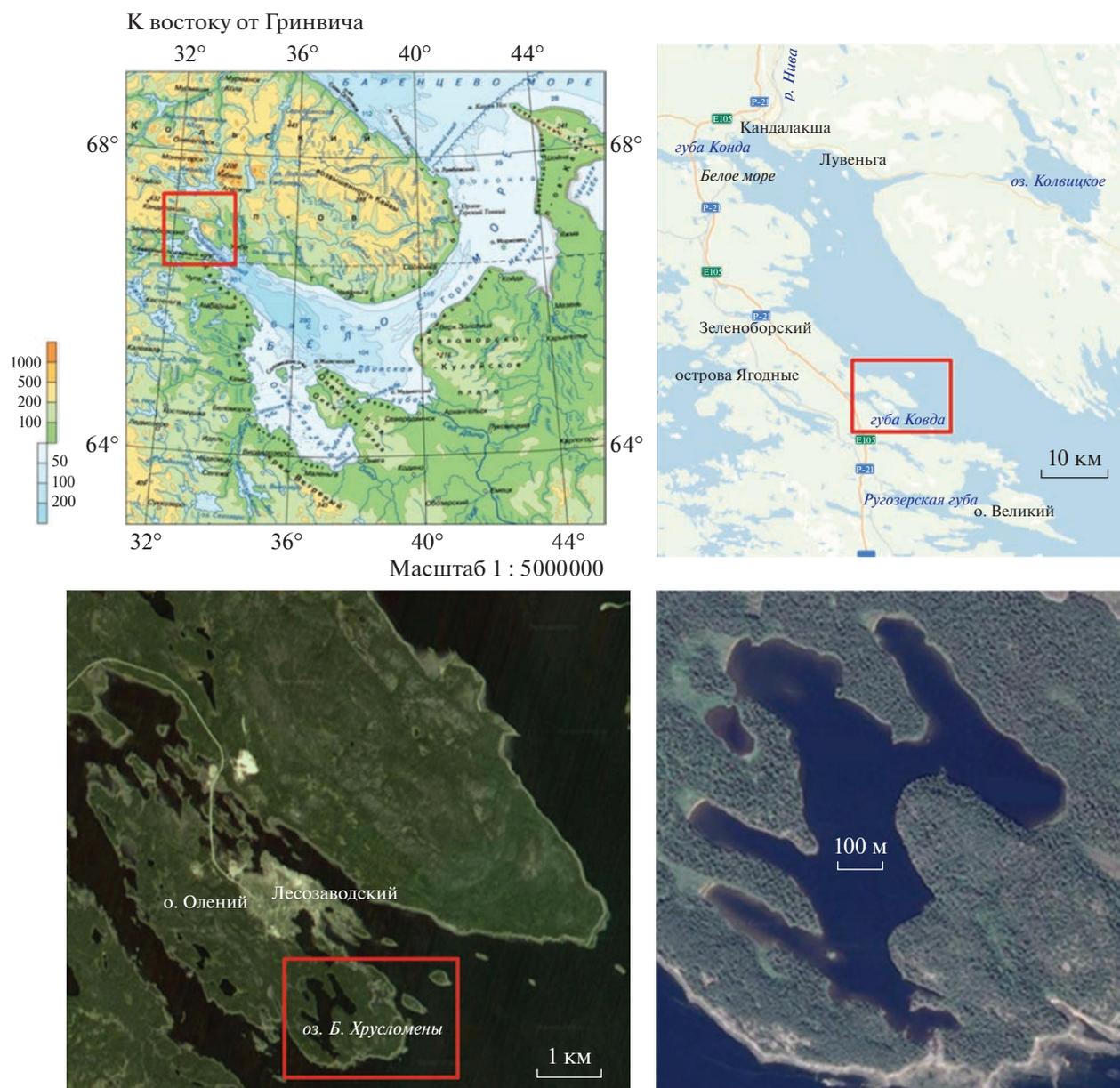


Рис. 1. Географическое расположение озера Большие Хрусломены: пос. Лесозаводский, о. Олений, губа Ковда, Кандалакшский залив Белого моря, Мурманская область, Россия.

Содержание бактериохлорофиллов. Суммарное содержание Бхл ($d + e$) в каждой пробе воды рассчитывали по методике, описанной в статьях (Емельянцева и соавт., 2020; Жильцова и соавт., 2022). Для этого регистрировали спектры поглощения воды с микроорганизмами в кюветках с длиной оптического пути 3 см. По площади длинноволновой полосы поглощения Бхл в спектральном диапазоне 650–800 нм определяли суммарную концентрацию хлоросомных бактериохлорофиллов, Бхл ($d + e$). Данный метод оценки Бхл применим не только к пробам с ЗСБ одного типа (или только з/о, или только к/о), но и к их

смеси в любой пропорции, поскольку эмпирические коэффициенты расчета концентрации Бхл по длинноволновой полосе поглощения одинаковы для обоих типов пигмента, Бхл d или Бхл e . (Емельянцева и соавт., 2020). Для определения процентного соотношения Бхл d и e были измерены спектры флуоресценции Бхл с помощью флуориметра Solar CM2203 при возбуждении светом с длиной волны 440 нм. В спектрах наблюдается полоса свечения хлоросомных Бхл с максимумом от 740 до 770 нм в зависимости от процентного содержания Бхл d и e , а также более длинноволновая флуоресценция Бхл a (Kharcheva et al., 2016b).

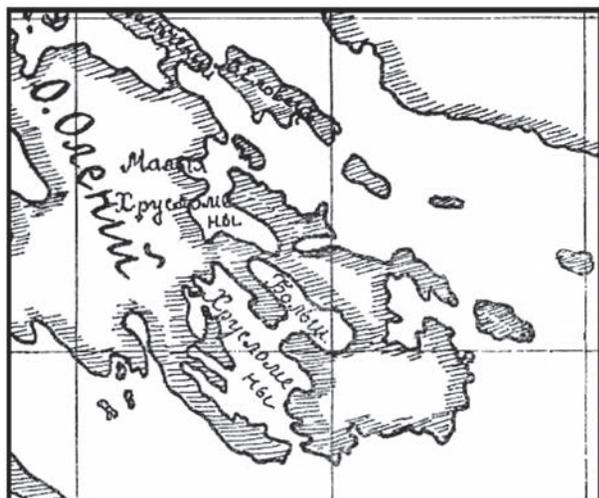


Рис. 2. Карта о. Олений (из отчета К.К. Сент-Илера, 1909 г.).

Разложение полосы флуоресценции хлоросомных Бхл на компоненты гауссовой формы позволяет оценить относительное содержание каждого пигмента (Бхл *d* и Бхл *e*) по площади соответствующего спектрального компонента с фиксированной длиной волны максимума и шириной (Жильцова и соавт., 2018). Относительную долю Бхл *d* и Бхл *e* находили как отношение площади соответствующего гауссиана к общей площади спектра флуоресценции. Далее, зная суммарное содержание Бхл (*d* + *e*), а также процентное содержание каждого пигмента, мы смогли рассчитать количественное содержание Бхл *d* и Бхл *e* в исходных пробах природной воды.

Содержание Хл *a* находили из спектров поглощения ацетон-метанольных экстрактов по методу (Overmann, Tilzer, 1989).

Для получения накопительных культур АФБ в полевых условиях свежееотобранную озерную воду закрывали без доступа воздуха в бутылки объемом 0.5 л. Посев производили в лабораторных условиях, на 5 сут. после отбора проб. Для получения накопительных культур пробы озерной воды объемом 5 мл добавляли в герметично закрытые стеклянные флаконы со средой объемом 30 мл. Использовали среду следующего состава (на 1 л дистиллированной воды): KH_2PO_4 – 0.7 г; NaCl – 15 г для проб воды с глубины 3.25 и 3.75 м, 17.5 г для проб воды с глубины 4.25 и 4.75 м, 25 г для проб воды с глубины 3.25 и 3.75 м для проб воды с глубины 18 м и осадка; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5 г; NH_4Cl – 0.7 г; KCl – 0.33 г; NaHCO_3 – 0.15 г; CaCl_2 – 0.1 г; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1 г; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0.5 г; Na -ацетат – 0.5 г; дрожжевой экстракт – 0.1 г; раствор микроэлементов – 1 мл (Pfennig, Lippert, 1966); витамин B_{12} – 20 мкг; pH среды 7.0. Для по-

давления кислородного фотосинтеза в среду добавляли диурон в концентрации 50 mg l^{-1} .

Культивирование проводили анаэробно в течение месяца в люминостате при освещенности 2000 люкс и температуре $20\text{--}25^\circ\text{C}$. Выделение и очистку культур проводили методом предельных разведений посевного материала с использованием жидких и агаризованных (0.5% агара) сред, содержащих $15 \text{ g l}^{-1} \text{ NaCl}$.

Первичную идентификацию микроорганизмов производили с учетом формы, размера, цвета клеток и микроколоний, наличию газовых вакуолей, капель серы и по спектрам поглощения пигментов.

Пигментный состав полученных культур АФБ исследовали в препаратах целых клеток в 50% глицерине, в ацетон-метанольных (7 : 2) экстрактах. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Cary 100 (“Varian”, Австралия) в диапазоне длин волн 350–900 нм. О присутствии каротиноида хлоробактина, характерного для з/о ЗСБ, судили по появлению в экстрактах пика в области 430 нм. О присутствии каротиноида изорениератина, характерного для к/о ЗСБ, судили по появлению в экстрактах пика в области 470 нм.

Микрофотографии клеток бактерий получали с помощью светового микроскопа Olympus BX 41 (“Olympus”, Япония) с объективом $\times 100$ с фазовым контрастом, с использованием фотонасадки OLIMPUS C5060-ADU; 5G 10064 JAPAN.

Электронно-микроскопические исследования проводили описанными ранее стандартными методами (Лунина и соавт., 2014). Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100B (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Филогенетический анализ штаммов. Выделение ДНК проводили с помощью модифицированной методики щелочного выделения Бирнбойма–Доли (Булыгина и соавт., 2002). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система (Lane, 1991). Секвенирование продуктов амплификации проводили по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977) на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3730 (“Applied Biosystems, Inc.”, США). Последовательности выравнивали в MAFFT (Kato, Standley, 2013), а филогенетический анализ проводили с помощью IQ-TREE (Nguyen et al., 2015), с выбором модели через ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) и подсчетом поддержки ветвей с помощью UFBoot2 (Hoang et al., 2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В марте 2017 г. верхние слои воды до глубины 2 м имели соленость 6.5–7.3 г/л. На глубине 1–5 м наблюдалось резкое увеличение солености от 7.5 до

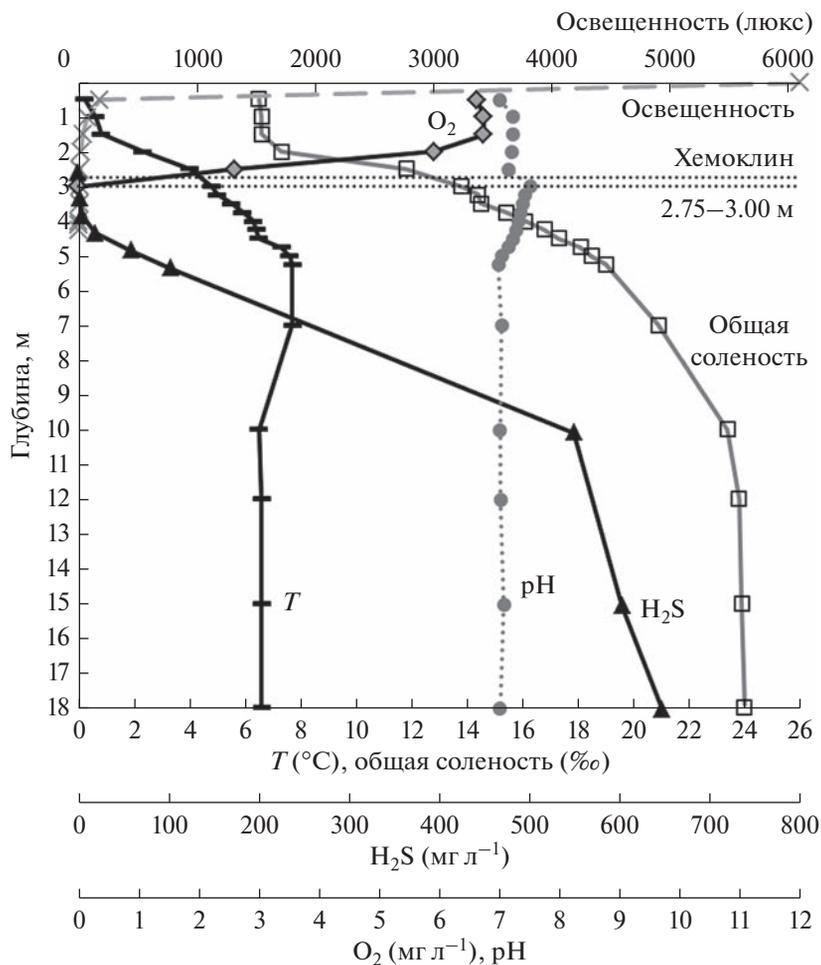


Рис. 3. Гидрохимические характеристики воды оз. Большие Хрусломены, март 2017.

18.5 г/л (галоклин). Соленость у дна составляла 24–24.3 г/л. Кислородная зона достигала глубины 2.5 м. Граница кислородной и сероводородной зон (хемоклин) находилась в интервале глубин 2.75–3.0 м. Начиная с 2.6 м, содержание сероводорода в воде возрастало и возле дна достигало 647 мг/л. Значения pH по всей глубине были около 7. Температура воды у поверхности была отрицательной, в зоне хемоклина около 5°C, у дна 6.6°C. Озеро было покрыто льдом, солнечный свет проникал до глубины 4.25 м. Освещенность на глубине 3.5 м составляла 7 люкс, а на глубине 4.1 м – 1 люкс (рис. 3).

Пробы озерной воды различались по окраске на разной глубине. До глубины 1.5 м вода имела слабую коричневатую окраску, по-видимому, за счет содержания в ней небольшого количества гуминовых веществ. С глубины 2.5 м и до хемоклина (3 м) вода была бесцветной. Развитие АФБ зафиксировано в сероводородной зоне ниже хемоклина на глубине 3.75–4.25 м. Цвет озерной воды в слое максимального развития АФБ был необычно

желтый, слегка зеленоватый, и не был похож на цвет, обычно образуемый сообществом к/о или з/о ЗСБ. Вода расположенных ниже слоев была светлая, она не мутнела при фильтрации, но цветность ее увеличивалась с глубиной. На глубине 10–18 м окраска озерной воды практически не отличалась от окраски воды с глубины 4.25 м. Вода нижних слоев озера, несмотря на присутствие в ней сероводорода, была устойчива к окислению кислородом воздуха и не мутнела при фильтрации.

На глубине 4.25 м зарегистрирована максимальная численность микроорганизмов и максимум аноксигенного фотосинтеза (АнФ). Продукция АнФ в оз. Большие Хрусломены была крайне низкой и составляла 6.2 мкмоль С л⁻¹ сут⁻¹, что было связано с сильным затенением ледовым покровом. Продукция АнФ более чем в 2 раза превышала продукцию оксигенного фотосинтеза (рис. 4).

На спектрах воды, начиная с глубины 3.25 м и до дна, одновременно присутствуют пики пигментов, характерные для з/о (430 нм) и к/о (465 нм) ЗСБ (рис. 5). На этой же глубине уменьшается содер-

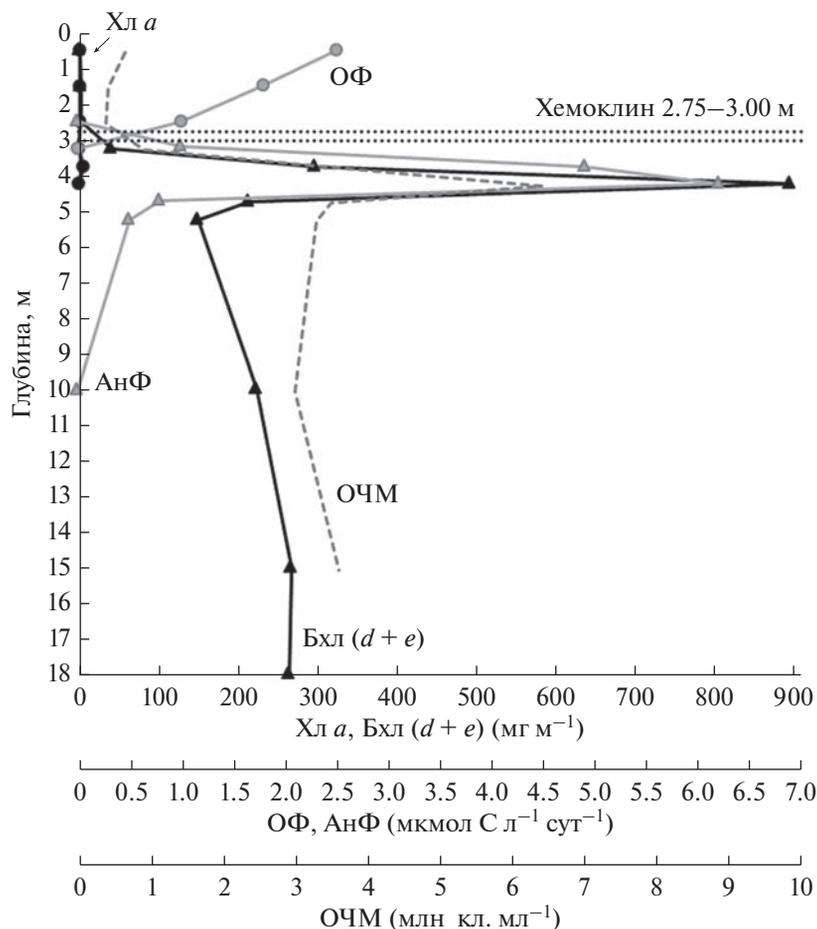


Рис. 4. Профили интенсивности фотосинтеза, содержания пигментов и общего числа клеток бактерий в воде оз. Большие Хрусломены, март 2017. Обозначения: ОФ – кислородный фотосинтез; АнФ – анаэробный фотосинтез; Хл *a* – хлорофилл *a*; Бхл (*d + e*) – суммарно содержание бактериохлорофиллов *d* и *e* зеленых серобактерий; ОЧМ – общая численность микроорганизмов.

жание в воде Хл *a* и появляется заметное количество Бхл (*d + e*) (рис. 4; табл. 1).

При микроскопировании проб воды практически все наблюдаемые клетки содержали газовые вакуоли. Преимущественно это были мелкие вибриоидные клетки 0.3×0.3 – 0.5 мкм с газовыми вакуолями (рис. 6а), а также палочки 0.3 – 0.4×0.3 – 0.7 мкм с газовыми вакуолями, собранные по 2–3 клетки или в короткие цепочки и агрегаты (рис. 6б–6д).

Из озерной воды с глубины 3.25 м было выделено 4 монокультуры АФБ, отдельные колонии которых были взяты для проведения филогенетического анализа. Таким образом, выделены: з/о ЗСБ штамм *GrKhr17*, к/о ЗСБ штамм *BrKhr17*, ПСБ штамм *AmKhr17*, ПСБ штамм *TcgKhr17*. Все штаммы оказались медленно растущими и витаминно-зависимыми, за исключением штамма *AmKhr17*, который был способен к росту на среде без органических добавок.

Клетки з/о ЗСБ штамма *GrKhr17* представляли собой короткие неподвижные палочки 0.6 – 0.7 мкм \times 1.5 – 2 мкм с газовыми вакуолями (рис. 6б–6и). Они располагались либо одиночно, либо были собраны в ветвящиеся цепочки или группы неправильной формы. Фотосинтетическими пигментами у этой культуры были Бхл *d* и каротиноид хлоробактин (рис. 7а). Оптимальная соленость для роста по NaCl составила 5–10 г/л.

Клетки к/о ЗСБ штамма *BrKhr17* были округлой или вибриоидной формы, неподвижные, размером 0.3 мкм \times 0.6 – 0.7 мкм, в культуре обычно располагались одиночно или неправильными группами (рис. 6к–6м). Эти бактерии способны образовывать газовые вакуоли, однако при росте на среде обычно газовых вакуолей не содержали. Фотосинтетическими пигментами у этой культуры были Бхл *e* и каротиноид изорениератин (рис. 7б). Оптимальная соленость для роста культуры составила 10–15 г/л.

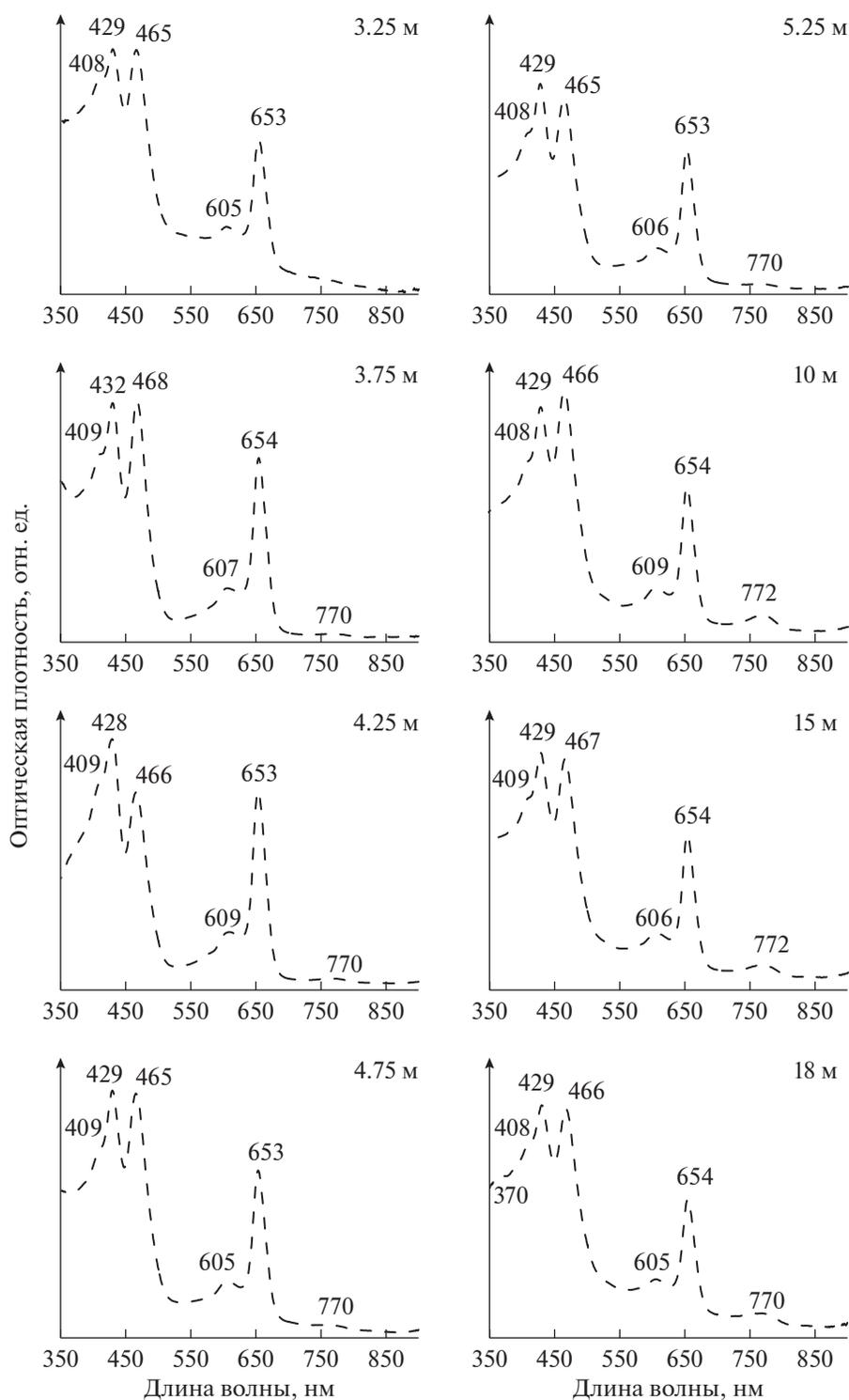


Рис. 5. Спектры поглощения ацетон-метанольных (7 : 2) экстрактов пигментов из взвеси в воде Большие Хрусломены, март 2017.

Идентификация и сравнение полных геномов зеленого и коричневого штаммов ЗСБ из оз. Большие Хрусломены показало, что они различаются наличием кластера генов, кодирующих коричне-

вую окраску у коричневого штамма. В геномах выделенных нами штаммов ЗСБ *sox*-система, ответственная за окисление тиосульфата, обнаружена не была. По совокупности свойств оба выде-

Таблица 1. Распределение хлоросомных бактериохлорофиллов (в клетках) зеленых серобактерий по глубине в воде оз. Большие Хрусломены в марте 2017 г.

Глубина, м	Общее содержание Бхл ($d + e$), мг/м ³	Соотношение Бхл по спектрам флуоресценции проб воды, %		Расчетное содержание Бхл, мг/м ³	
		Бхл d	Бхл e	Бхл d	Бхл e
3.25	41	Нд	Нд	Нд	Нд
3.75	298	Нд	Нд	Нд	Нд
4.25	895	77	23	689	206
4.75	215	66	34	142	73
5.25	151	64	36	97	54
10	224	65	35	146	79
15	268	64	36	171	96
18	265	62	38	164	101

Примечание. Нд – нет данных. Зеленым цветом выделена строка с глубиной, на которой отмечено максимальное развитие зеленых серных бактерий.

ленные штамма ЗСБ были причислены к новым штаммам вида *Chlorobium phaeovibrioides* (Grouzdev et al., 2019).

Филогенетический анализ последовательностей гена 16S рРНК для штаммов з/о GrKhr17 (номер в Генбанке MG065693) и к/о BrKhr17 (MG065694) показал их наибольшее родство с з/о штаммом *C. phaeovibrioides* DSM 265 (бывший *Chlorobium vibrioforme* f. thiosulfatophilum DSM 265) (рис. 8). Аналогичные по цвету и филогении пары ЗСБ были выделены нами ранее из озер Кисло-Сладкое и Трехцветное (рис. 8), однако, в отличие от них и от *C. phaeovibrioides* DSM 265, оба штамма ЗСБ из оз. Большие Хрусломены содержали в клетках газовые вакуоли. Еще одной отличительной особенностью штаммов ЗСБ из оз. Большие Хрусломены от ранее выделенных нами ЗСБ являлось то, что в отсутствие тиосульфата в среде их рост в культурах не наблюдался.

Пурпурные серобактерии (ПСБ) были в воде озера минорным компонентом. Однако в накопительных культурах, за счет малых потребностей и высокой скорости роста, они часто начинали доминировать, полностью вытесняя ЗСБ.

Клетки ПСБ штамм AmKhr17 были неподвижные, округлой формы, обычно с газовыми вакуолями и включениями в виде капель серы. Они располагались одиночно, парами или тетрадами (рис. 9а–9в). Размер клеток сильно варьировал в зависимости от условий роста. В оптимальных условиях диаметр клеток составлял 1.5–2 мкм, также встречались крупные овальные делящиеся клетки размером до 5–6 мкм. В неоптимальных условиях размер клеток мог уменьшаться до 0.5–0.7 мкм. Фотосинтетическими пигментами были Бхл a и каротиноид окенон (рис. 7в). Оптимальная соленость для роста культуры составила 10–

25 г/л NaCl, максимальный рост наблюдался при 15 г/л. По данным филогенетического анализа, штамм AmKhr17 (номер в Генбанке MK272776) имел 99% сходства со спириллоксантин-содержащим штаммом *T. rosea* DSM 235^T (AJ002798.2). Также штамм AmKhr17 имел по 99% сходства с ранее выделенными беломорскими штаммами AmPS10 (KC702856.1) и TcyrPS10 (KC702858) из оз. Кисло-Сладкое и AmTcv13 (MG193753.1) из оз. Трехцветное (рис. 10).

ПСБ штамм TcgKhr17 представляли собой одиночные клетки округлой или овальной формы размером 2–3 мкм, без газовых вакуолей (рис. 9г–9ж), подвижные за счет жгутика. Однако чаще всего культура была представлена неподвижными клетками, обраставшими дно и стенки флаконов. Также встречались более крупные клетки 2.5–3 × 5–5.5 мкм и даже тяжи из 10 и более неотделившихся клеток. Фотосинтетическими пигментами были Бхл a и каротиноид окенон (рис. 7г). Оптимальная соленость составляла 15–20 г/л NaCl, максимальный рост наблюдался при 20 г/л. Наибольшее филогенетическое сходство в 99% у штамма TcgKhr17 (номер в Генбанке MK278671) отмечено с типовым штаммом *Thiocystis gelatinosa* (Y11317.1) и *Thiocystis* sp. Mog3 (EF149014) из оз. Могильное (рис. 10).

При посеве пробы верхнего слоя осадка на твердую питательную среду выросли колонии ПСБ с клетками морфологии TcgKhr17 размером 1–1.5 мкм, пронизанные крупными нитями зеленых несерных бактерий (*Chloroflexi*) морфологически похожих на *Chloroplaca* sp. семейства *Chloroflexaceae* (рис. 11). Бактерии *Chloroflexi* в дальнейшем были выделены в монокультуру на среде с низкой соленостью, их изучение продолжается.

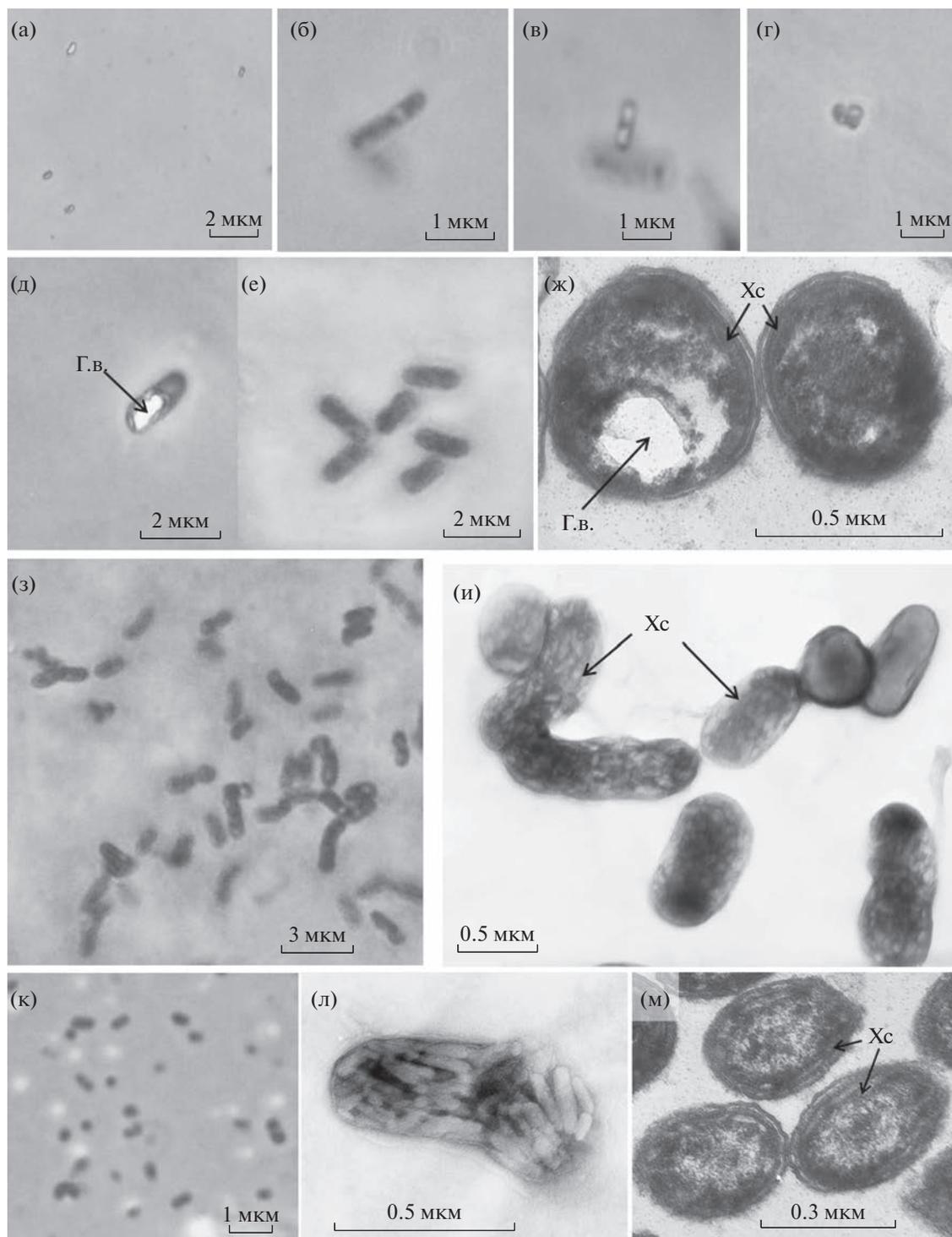


Рис. 6. Морфология и ультратонкое строение клеток зеленых серобактерий из оз. Большие Хрусломены: проба воды с глубины 4.25 м, видны мелкие 0.3×0.3 мкм вибриоидные клетки с газовыми вакуолями (а), короткие нити по 2 клетки с образующимися в них газовыми вакуолями (б, в), группа клеток с газовыми вакуолями, образовавшаяся из распавшейся на клетки нити (г), палочка размером 0.7×2 мкм, с газовой вакуолью (д), зелено-окрашенные зеленые серобактерии штамм *GrKhr17* (е–и), коричнево-окрашенные зеленые серобактерии штамм *BrKhr17* (к–м). На микрофотографии (з) светлые области, расположенные ближе к концам клеток – это небольшие газовые вакуоли. В клетках хорошо видны крупные вытянутой формы хлоросомы (и, л), вплотную прилегающие к клеточной мембране (ж, м). Световая микроскопия, фазовый контраст (а–е, з, к); электронные микрофотографии тотального препарата (и, л) и ультратонких срезов клеток бактерий (ж, м). Обозначения: Г.В. – газовые вакуоли; Хс – хлоросомы.

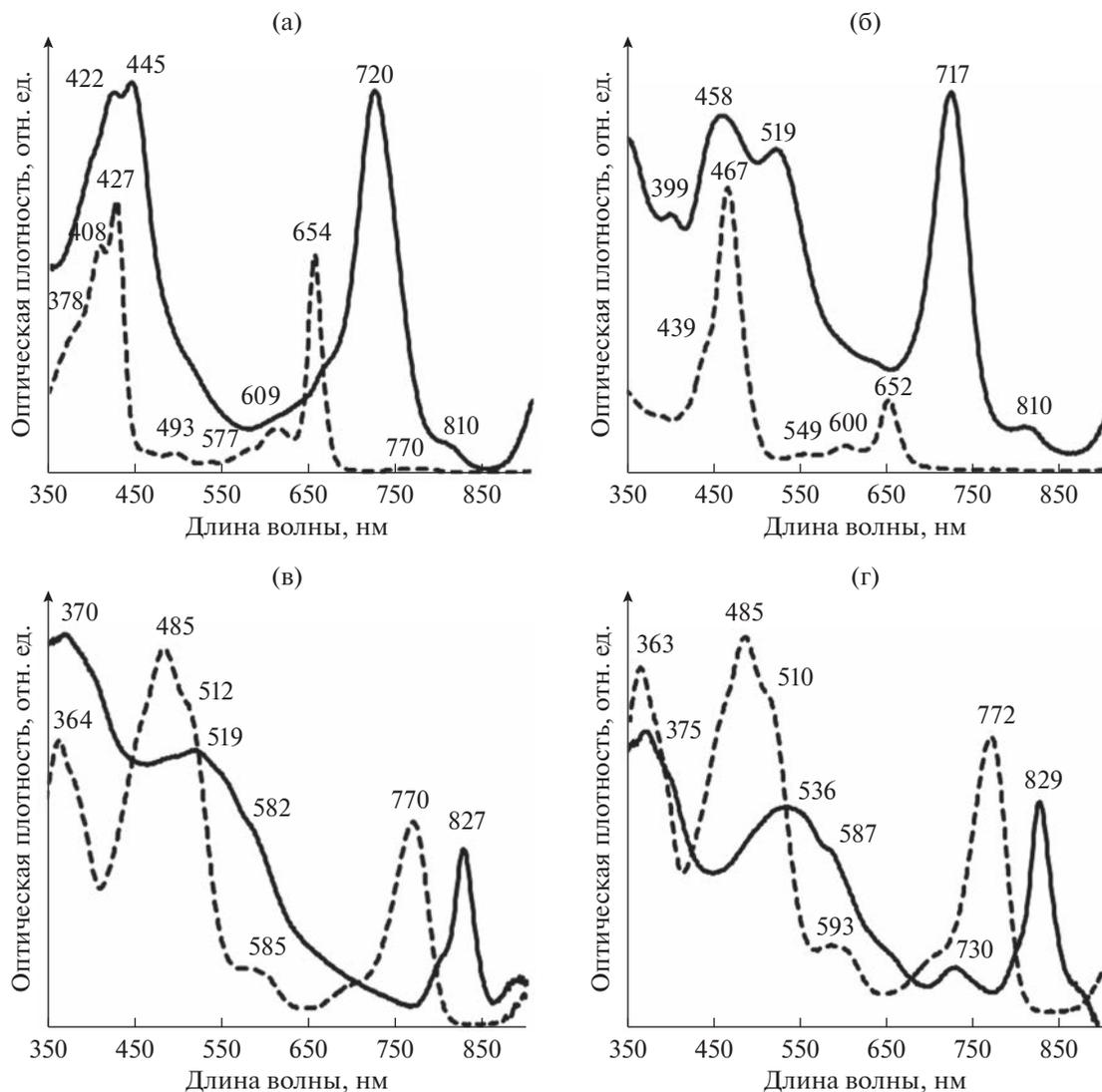


Рис. 7. Спектры поглощения света пигментами анаоксигенных фототрофных бактерий из оз. Большие Хрусломены: а – зелено-окрашенные зеленые серобактерии штамм *GrKhr17*; б – коричнево-окрашенные зеленые серобактерии штамм *BrKhr17*; в – пурпурные серобактерии штамм *AmKhr17*; г – пурпурные серобактерии штамм *TgKhr17*. Сплошная линия – спектр живой культуры в глицерине, пунктирная линия – спектр ацетон-метанольного экстракта пигментов (7 : 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Особенностью оз. Большие Хрусломены является его изоляция от моря искусственной валунной дамбой, которая ограничивает поступление воды из моря во время прилива, и питание пресной водой за счет осадков и с водосбора. Озеро подвержено приливно-отливным течениям, в процессе которых морская вода переливается через дамбу, поступает в мелководную часть озера, где смешивается с опресненной водой верхних слоев, благодаря чему соленость наиболее опресненного слоя в озере поддерживается на уровне 6.5–7.3 г/л (Savichev et al., 2020). Низкая и узкая перемычка, отделяющая оз. Большие Хрусломены от рядом расположенного оз. Банного, испытывающего сильное антропо-

генное влияние, не исключает проникновение из последнего биогенных соединений, стимулирующих развитие водорослей и цианобактерий. Таким образом, в оз. Большие Хрусломены создается стабильное равновесие гидрохимических параметров, основанное на динамическом равновесии естественных процессов опреснения и заболачивания (за счет затрудненного водообмена с морем и поступления биогенов с поверхностным стоком) и постоянного притока соленой морской воды (разбавляющей и обновляющей поверхностный слой). В озере произошло быстрое (по сравнению с водоемами, отделяющимися естественным путем за счет поднятия суши) развитие застойных процессов: в нижних слоях воды накопился серо-

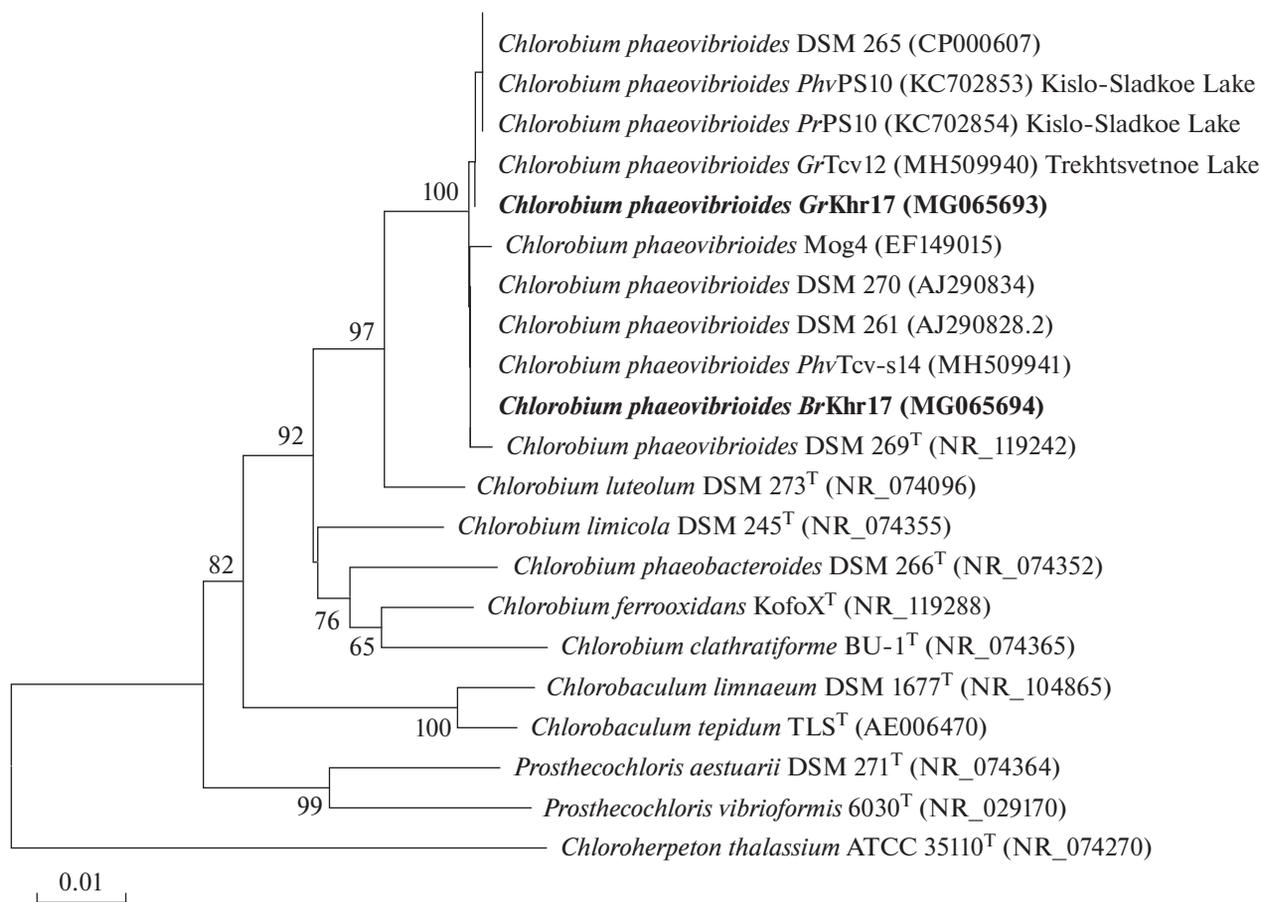


Рис. 8. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей генов 16S рРНК (1241 п. н.) филума *Chlorobi*, отражающее филогенетическое положение штаммов *GrKhr17* и *BrKhr17*. Дерево построено с помощью алгоритма maximum likelihood с применением эволюционной модели TN + F + I + G4. Масштабный отрезок соответствует 1 замене на 100 нуклеотидов.

водород и установилась устойчивая стратификация с развитием сообщества АФБ в освещенной зоне хемоклина.

По термохалинным характеристикам оз. Большие Хрусломены походит на оз. Могильное (о. Кильдин, Баренцево море). За счет глубоко залегающего и достаточно соленого мнимомолимиона (28‰) в хемоклине оз. Могильное развиваются к/о ЗСБ и небольшое количество ПСБ. Развитие к/о форм АФБ также характерно для морских стратифицированных водоемов. В хемоклине водной толщи Черного моря на глубине 150–180 м (соленость 20.7–21.0‰) найдены к/о ЗСБ (Горленко и соавт., 2005). В зоне хемоклина Бухты Биофильтров (в районе Беломорской биологической станции МГУ) с соленостью 25–27‰ тоже происходит развитие преимущественно к/о видов ЗСБ, а также ПСБ, в то время как з/о ЗСБ вырастали из проб воды только в виде редких колоний (Краснова, Воронов, 2019; Саввичев и соавт., 2022).

В данной работе мы проанализировали содержание пигментов АФБ в оз. Большие Хрусломе-

ны в подледный период в марте 2017 г., когда, на наш взгляд, благодаря затенению воды ледовым покровом, развитие к/о бактерий в хемоклине должно было быть максимальным. Однако, по полученным нами результатам, в слое максимального развития АФБ содержание Бхл *d* з/о ЗСБ существенно превышало содержание Бхл *e* к/о ЗСБ и составляло 77 и 23% соответственно.

Наши работы по озерам Кисло-Сладкое (Лунина и соавт., 2014) и Трехцветное (Лунина и соавт., 2019), находящимся на разных стадиях изоляции от Белого моря, показывают тенденцию развития и доминирования зеленых форм ЗСБ в хемоклине по мере опреснения поверхностного слоя воды. Развитию з/о форм ЗСБ в отделяющихся водоемах также способствует близкое к поверхности нахождение зоны хемоклина и, следовательно, относительно высокая его освещенность. Так, оз. Кисло-Сладкое сообщается с морем во время сизигийных приливов, что прямо сказывается на солености воды и глубине расположения хемоклина в этом водоеме. После таяния льда и

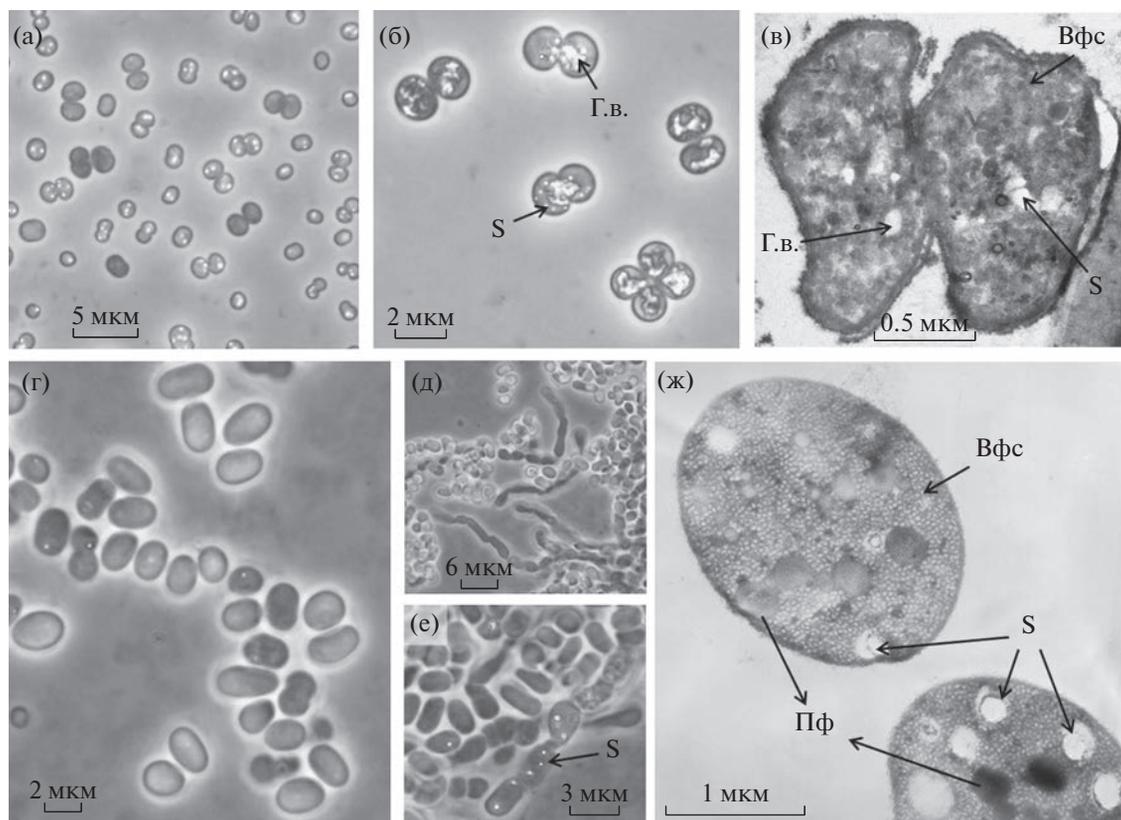


Рис. 9. Морфология и ультратонкое строение клеток пурпурных серобактерий из оз. Большие Хрусломены: штамм *AmKhr17* (а–в), штамм *TcgKhr17* (г–ж). Видны стадии деления крупной клетки с образованием диплококков и тетрад (а), в клетках хорошо различимы мелкие круглые капельки серы и крупные неправильной формы газовые вакуоли (б), на срезе видны мелкие газовые вакуоли, характерной для этого увеличения, полигональной формы и везикулярный фотосинтетический аппарат (в). Световая микроскопия, фазовый контраст (а, б, г, д, е); электронные микрофотографии ультратонких срезов клеток бактерий (в, ж). Обозначения: Г.в. – газовые вакуоли; Вфс – везикулярные фотосинтетические мембраны; S – отложения элементарной серы; Пф – предположительно, полифосфаты.

снега соленость поверхностного слоя воды в этом водоеме снижается до 4–7‰, постепенно возрастает в течение лета и достигает морских значений к осени. Глубина залегания хемоклина варьирует, и в разные годы в нем могут доминировать как з/о, так и к/о ЗСБ. Оз. Трехцветное совсем отделилось от моря, поверхностный слой воды в нем полностью опреснен. В оз. Трехцветное сформировалась меромиксия с постоянным хемоклином на глубине 2 м, в котором доминируют з/о ЗСБ, в то время как к/о ЗСБ встречаются в минорном или в единичном количестве.

В оз. Большие Хрусломены в период наших исследований водная толща в зоне максимального развития АФБ и в придонных слоях имела необычный желто-лимонный цвет. Тот же цвет наблюдался нами ранее в придонных слоях оз. Трехцветное, тогда как в хемоклине оз. Трехцветное вода была во все сезоны исследований окрашена в зеленый цвет за счет массового развития з/о ЗСБ. Поскольку в оз. Большие Хрусломены ак-

тивность сообщества АФБ в хемоклине в зимний сезон была крайне низкой, и желтый цвет воды хемоклина не может быть объяснен накоплением биомассы АФБ, мы предположили, что на цвет воды и ее устойчивость к окислению кислородом воздуха могут влиять полисульфиды, образующиеся в результате деятельности микроорганизмов.

Полисульфиды, по-видимому, представляют собой универсальный пул активированной серы, используемой микроорганизмами как в окислительной, так и в восстановительной частях цикла серы. Метод прижизненной рентгеновской абсорбционной спектроскопии, примененный в работе (Prange et al., 2002) для культур бактерий *Chlorobium vibrioforme* (f. thiosulfatophilum) DSM 263 (ныне штамм вида *C. phaeovibrioides*) и *Halorhodospira halophila* DSMZ 244Т (выделяющих серу вне клеток), а также для культур *Allochroium vinosum* DSMZ 180Т, *Thiocapsa roseopersicina* DSMZ 219 и *Marichromatium purpuratum* (ранее *Chromatium purpuratum*) DSMZ 1591Т (откладыва-

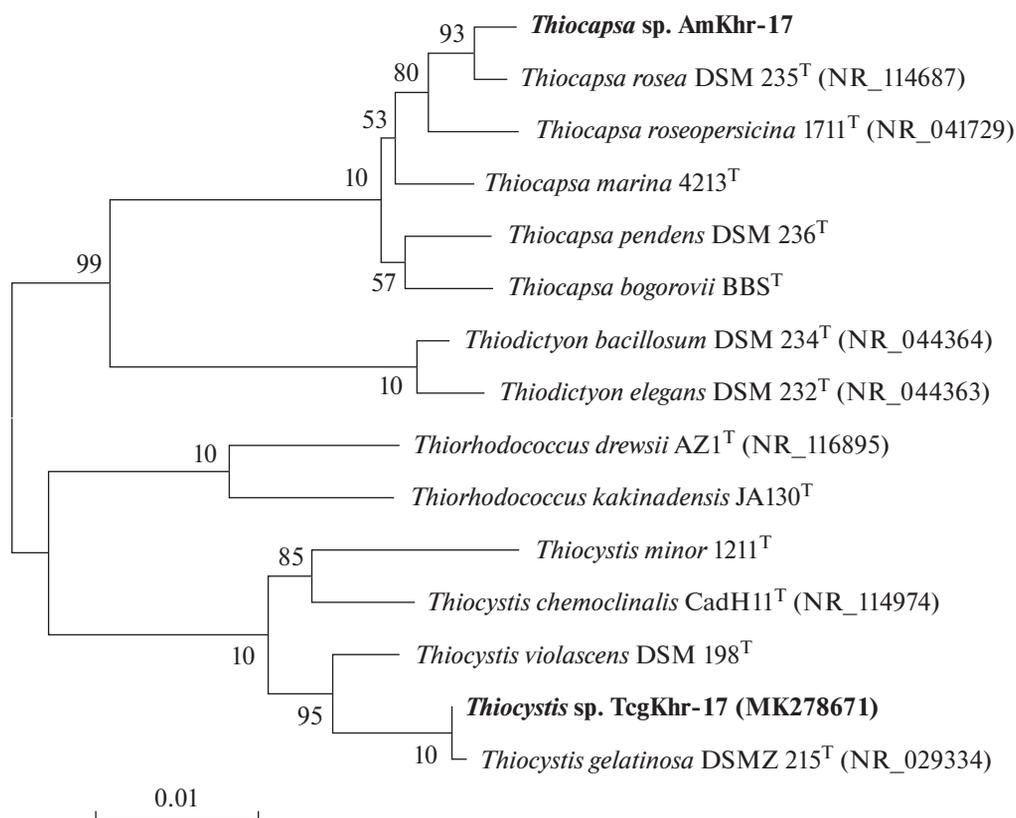


Рис. 10. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей генов 16S рРНК (1314 п. н.) семейства *Chromatiaceae*, показывающее филогенетическое положение штаммов *AmKhr-17* и *TcgKhr-17*. Дерево построено с помощью алгоритма maximum likelihood с применением эволюционной модели TN + F + I + G4. Масштабный отрезок соответствует 1 замене на 100 нуклеотидов.

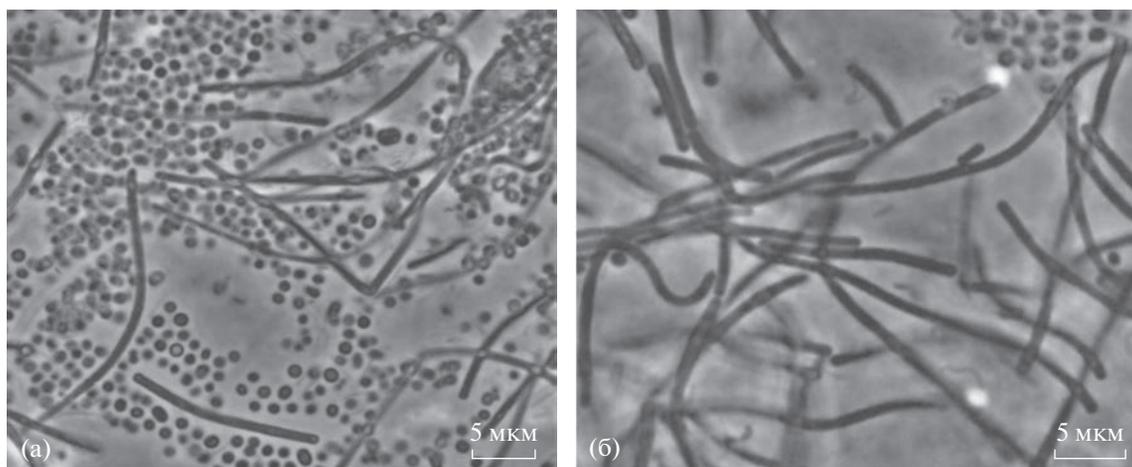


Рис. 11. Зеленые несерные бактерии *Chloroploca* sp. из оз. Большие Хрусломены. Колония пурпурных серобактерий, пронизанная нитями зеленых несерных бактерий (а), нити *Chloroploca* sp. Световая микроскопия, фазовый контраст.

ющих серу внутри клеток), показал высокую вероятность того, что выделяемая этими микроорганизмами сера представлена в виде длинных це-

почек, оканчивающихся атомами углерода ($R-S_n-R$; где $n > 3$). Авторами было показано, что у всех этих бактерий образуются полисульфидные

цепи сопоставимого химического состава, а также было отмечено, что при окислении серы в глобулах полисульфидные цепи укорачиваются.

В пользу выдвигаемых нами предположений также говорит тот факт, что для морских штаммов *Chlorobium vibrioforme* (Горленко и соавт., 1977) (ныне штаммы вида *C. phaeovibrioides*) и для штамма *Chlorobium thiosulfatophilum* (Лис, 1958) (позднее *C. vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*, ныне *C. phaeovibrioides* DSM 265, который оказался наиболее филогенетически близким к выделенным нами штаммам) в лабораторных условиях была показана возможность доокисления выделенной ранее серы до сульфата при исчерпании сероводорода в среде.

Поскольку выделенные нами штаммы не используют тиосульфат, но при этом их рост в отсутствие тиосульфата не происходит (что не было замечено для близкородственных штаммов ЗСБ, выделенных нами из ранее изученных озер), мы предполагаем, что промежуточные продукты окисления сульфидов могут быть не только результатом их биогеохимической деятельности, но и играть важную роль для развития самого сообщества АФБ в оз. Большие Хрусломены. Преобладающие продукты окисления сульфидов (полисульфиды, элементная сера, тиосульфат, сульфит и тетраионат) различаются в зависимости от того, является ли процесс биотического или абиотическим, от типа окислителя и соотношения окислителя к сульфиду (Jørgensen et al., 2019). Для выяснения природы необычной окраски воды хемоклина оз. Большие Хрусломены и химического состава серных соединений в ней требуются дополнительные исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность В.М. Горленко за всестороннюю поддержку в процессе работы, Т.В. Колгановой, И.И. Русанову за консультации, оказанные в процессе подготовки статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание ФИЦ Биотехнологии РАН). Биогеохимические и молекулярно-генетические исследования проведены за счет средств гранта РНФ № 23-24-00208.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 500–508.
- Bulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Turova T.P., Kravchenko I.K., Bykova S.A., Kolganova T.V., Gal'chenko V.F. Study of nucleotide sequences of *nifH* genes in methanotrophic bacteria // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 425–432.
- Горленко В.М., Дубинина Г.А., Кузнецов С.И. Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977. С. 62, 119–130, 151–200.
- Горленко В.М., Михеев П.В., Русанов И.И., Пименов Н.В., Иванов М.В. Экофизиологические свойства фотосинтезирующих бактерий из зоны хемоклина Черного моря // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 239–247.
- Gorlenko V.M., Mikheev P.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Ivanov M.V. Ecophysiological properties of photosynthetic bacteria from the Black Sea chemocline zone // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 201–209.
- Емельянец П.С., Жильцова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Рымарь В.В., Пацаева С.В. Определение концентрации хлоросомных бактериохлорофиллов по спектрам поглощения клеток зеленых серных бактерий в пробах природной воды // Вестн. Московского ун-та. Сер. 3: Физика, астрономия. 2020. № 2. С. 25–30.
- Emeliantsev P.S., Zhiltsova A.A., Krasnova E.D., Voronov D.A., Rymar V.V., Patsaeva S.V. Quantification of chlorosomal bacteriochlorophylls using absorption spectra of green sulfur bacteria in natural water // Moscow University Physics Bull. 2020. V. 75. № 2. P. 137–142.
<https://doi.org/10.3103/S0027134920020046>
- Жильцова А.А., Харчева А.В., Краснова Е.Д., Лунина О.Н., Воронов Д.А., Саввичев А.С., Горшкова О.М., Пацаева С.В. Спектральное исследование зеленых серных бактерий в стратифицированных водоемах Кандалакшского залива Белого моря // Оптика атмосферы и океана. 2018. Т. 31. С. 233–239.
- Zhiltsova A.A., Kharcheva A.V., Krasnova E.D., Lunina O.N., Voronov D.A., Savvichev A.S., Gorshkova O.M., Patsaeva S.V. Spectroscopic study of green sulfur bacteria in stratified water bodies of the Kandalaksha Gulf of the White Sea // Atmospheric and Oceanic Optics. 2018. V. 31. P. 390–396.
<https://doi.org/10.15372/AOO20180315>
- Жильцова А.А., Филиппова О.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Пацаева С.В. Сравнительный анализ спектральных методов определения концентрации бактериохлорофилла *d* зеленых серных бактерий в воде // Оптика атмосферы и океана. 2022. Т. 35. С. 312–318.
- Zhiltsova A.A., Filippova O.A., Krasnova E.D., Voronov D.A., Patsaeva S.V. Comparative analysis of spectral methods for determining bacteriochlorophyll *d* concentration in green sulfur bacteria in water // Atmospheric and Oceanic Optics. 2022. V. 35. P. 5627–568.
<https://doi.org/10.15372/AOO20220411>
- Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Кократская Н.М., Пантюлин А.Н., Рогатых Т.А., Самсонов Т.Е., Фролова Н.Л., Шапоренко С.И. К инвентаризации реликтовых водоемов, отделяющихся от Белого моря // Комплексные исследования Бабыего моря, полу-изо-

- лированной беломорской лагуны: геология, гидрология, биота – изменения на фоне трансгрессии берегов. Труды Беломорской биостанции МГУ. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2016. Т. 12. С. 211–241.
- Краснова Е.Д., Воронов Д.А.* Подводное меромиктическое озеро в бухте Биофильтров (Белое море, Канда-лакшский залив, окрестности Беломорской биостанции МГУ) // Геология морей и океанов: Материалы XXII Международной научной конференции (Школы) по морской геологии. М.: ИО РАН, 2019. Т. 3. С. 165–169.
- Лис Г.* Биохимия автотрофных бактерий. М.: Изд-во иностранной литературы, 1958.
- Лунина О.Н., Саввичев А.С., Кузнецов Б.Б., Пименов Н.В., Горленко В.М.* Аноксигенные фототрофные бактерии стратифицированного озера Кисло-Сладкое, (Канда-лакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 90–108.
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Kuznetsov B.B., Pimenov N.V., Gorlenko V.M.* Anoxic phototrophic bacteria of the Kislo-Sladkoe stratified lake (White Sea, Kandalaksha Bay) // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 815–832. <https://doi.org/10.1134/S0026261714010081>
- Лунина О.Н., Саввичев А.С., Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Кузнецов Б.Б., Горленко В.М.* Сукцессионная динамика развития сообщества аноксигенных фототрофных бактерий в озере Кисло-Сладкое (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 531–544.
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Krasnova E.D., Kokryatskaya N.M., Veslopolova E.F., Kuznetsov B.B., Gorlenko V.M.* Succession processes in the anoxygenic phototrophic bacterial community in Lake Kislo-Sladkoe (Kandalaksha Bay, White Sea) // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 570–582. <https://doi.org/10.1134/S0026261716050118>
- Лунина О.Н., Саввичев А.С., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Кузнецов Б.Б., Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Летарова М.А., Летаров А.В., Горленко В.М.* Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий меромиктического озера Трехцветное (Кандалакшский залив, Белого моря) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 100–115.
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Babenko V.V., Boldyreva D.I., Kuznetsov B.B., Kolganova T.V., Krasnova E.D., Kokryatskaya N.M., Veslopolova E.F., Voronov D.A., Demidenko N.A., Letarova M.A., Letarov A.V., Gorlenko V.M.* Seasonal changes in the community structure of anoxygenic phototrophic bacteria in meromictic Trekhsvetnoe Lake (Kandalaksha Bay, White sea) // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 100–114. <https://doi.org/10.1134/S0026261719010041>
- Саввичев А.С., Кадников В.В., Каллистова А.Ю., Русанов И.И., Воронов Д.А., Краснова Е.Д., Равин Н.В., Пименов Н.В.* Фотозависимое окисление метана – важнейший процесс цикла метана в водной толще полярного озера Большие Хрусломены // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 367–371.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Kallistova A.Yu., Rusanov I.I., Voronov D.A., Krasnova E.D., Ravin N.V., Pimenov N.V.* Light-dependent methane oxidation is the major process of the methane cycle in the water column of the Bol'shie Khruslomeny Polar Lake // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 370–374. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030108>
- Саввичев А.С., Кулакова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Кадников В.В., Белецкий А.В., Козяева В.В., Русанов И.И., Летарова М.А., Веслополова Е.Ф., Беленкова В.В., Демиденко Н.А., Горленко В.М.* Микробное сообщество морского меромиктического желоба (Бухта Биофильтров), расположенного в Кандалакшском заливе Белого моря // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 492–506.
- Savvichev A.S., Kulakova A.A., Krasnova E.D., Voronov D.A., Kadnikov V.V., Beletskii A.V., Kozyaeva V.V., Rusanov I.I., Letarova M.A., Veslopolova E.F., Belenkova V.V., Demidenko N.A., Gorlenko V.M.* Microbial community of a marine meromictic trough (Biofilter Bay) in the Kandalaksha Bay, White Sea // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 432–444. <https://doi.org/10.1134/S0026261722100940>
- Сент-Илер К.К.* Отчет об экскурсии на Белое море студентов естественников Юрьевского университета летом 1908 года // Ученые записки Императорского Юрьевского Университета. 1909. Т. 17. С. 1–67.
- Федулов В.Ю., Беляев Н.А., Коновалов Б.В.* Геохимические исследования оз. Большие Хрусломены // Процессы в геосредах. 2018. Т. 17. С. 143–144.
- Харчева А.В., Жильцова А.А., Лунина О.Н., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Саввичев А.С., Пацаева С.В.* Флуоресценция бактериохлорофиллов зеленых серных бактерий в анаэробной зоне двух природных водоемов // Вестн. Московского ун-та. Сер. 3: Физика, астрономия. 2018. № 4. С. 40–45.
- Kharcheva A.V., Zhiltsova A.A., Lunina O.N., Krasnova E.D., Voronov D.A., Savvichev A.S., Patsaeva S.V.* Bacteriochlorophyll fluorescence of green sulfur bacteria in the anaerobic zone of two natural water bodies // Moscow University Physics Bull. 2018. V. 73. № 4. P. 377–381. <https://doi.org/10.3103/S0027134918040082>
- Berg J.S., Schwedt A., Kreutzmann A.-C., Kuypers M.M.M., Milucka J.* Polysulfides as intermediates in the oxidation of sulfide to sulfate by *Beggiatoa* spp. // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 629–636.
- Grouzdev D.S., Lunina O.N., Gaisin V.A., Krutkina M.S., Baslerov R.V., Savvichev A.S., Gorlenko V.M.* Genome sequences of green- and brown-colored strains of *Chlorobium phaeovibrioides* with gas vesicles // Microbiol. Resour. Anounc. 2019. V. 8. e00711–19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00711-19>
- Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S.* UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 35. P. 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Jørgensen B.B., Findlay A.J., Pellerin A.* The Biogeochemical sulfur cycle of marine sediments // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 849. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00849>
- Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V.* Metagenomic data of the microbial community of the chemocline layer of the meromictic subarctic Lake Bolshie Hruslomeny, North European Russia // Data in Brief. 2019. V. 23. P. 103800. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103800>
- Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermiin L.S.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // Nat. Methods. 2017. V. 14.

P. 587–589.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Kharcheva A.V., Krasnova E.D., Gorlenko V.M., Lunina O.N., Savvichev A.S., Voronov D.A., Zhiltsova A.A., Patsaeva S.V. Depth profiles of spectral and hydrological characteristics of water and their relation to abundances of green sulfur bacteria in the stratified lakes of the White sea // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. 2016. V. 9917. P. 99170Q-1–99170Q-16. <https://doi.org/10.1117/12.2229855>

Kharcheva A.V., Zhiltsova A.A., Lunina O.N., Savvichev A.S., Patsaeva S.V. Quantification of two forms of green sulfur bacteria in their natural habitat using bacteriochlorophyll fluorescence spectra // *Proc. SPIE*. 2016b. V. 9917. P. 99170P-0–99170P-8. <https://doi.org/10.1117/12.2229848>

Kleinjan W.E., Keizer A., Janssen A.J.H. Biologically produced sulfur // *Top. Curr. Chem.* 2003. V. 230. P. 167–188. <https://doi.org/10.1007/b12114>

Krasnova E., Matorin D., Belevich T., Efimova L., Kharcheva A., Kokryatskaya N., Losyuk G., Todorenko D., Voronov D., Patsaeva S. The characteristic pattern of multiple colored layers in coastal stratified lakes in the process of separation from the White sea // *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 2018. P. 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00343-018-7323-2>

Lane D.J. 16S/23S sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. New York. 1991. P. 115–175.

<https://doi.org/10.12691/jaem-2-4-11>

Montesinos E., Guerrero R., Abella C., Esteve I. Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium*

limicola and *Chlorobium paeobacteroides* in natural habitats // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. V. 46. P. 1008. <https://doi.org/10.1128/aem.46.5.1007-1016.1983>

Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. P. 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Overmann J., Tilzer M.M. Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic kettle lake Mittlerer Buchensee, West-Germany // *Aquatic Sci.* 1989. V. 51. P. 4. <https://doi.org/10.1007/bf00877171>

Pfennig N., Lippert K.D. Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien // *Arch. Mikrobiol.* 1966. V. 55. P. 245–256. <https://doi.org/10.1007/BF00410246>

Prange A., Arzberger I., Engemann C., Modrow H., Schumann O., Trüper H.G., Steudel R., Dahl C., Hormes J. *In situ* analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1428. P. 446–454.

Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Beletsky A.V., Krasnova E.D., Voronov D.A., Kallistova A.Yu., Veslopolova E.F., Zakharova E.E., Kokryatskaya N.M., Losyuk G.N., Demidenko N.A., Belyaev N.A., Sigalevich P.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Microbial processes and microbial communities in the water column of the polar meromictic lake Bol'shie Khruslomeny at the White sea coast // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 1945. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01945>

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 84. P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Anoxygenic Phototrophic Bacteria of the Meromictic Lake Bol'shie Khruslomeny (Oleniy Island, Kandalaksha Gulf, Murmansk Oblast, Russia)

O. N. Lunina^{1, *}, D. S. Grouzdev², S. V. Patsaeva³, A. A. Zhil'tsova³, N. E. Suzina⁴, E. D. Krasnova⁵, D. A. Voronov⁶, N. M. Kokryatskaya⁷, E. F. Veslopolova¹, and A. S. Savvichev¹

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

² ciBear OU, Tartu Mnt 67/1-13b, Kesklinna Linnaosa, Tallinn, 10115 Estonia

³ Faculty of Physics, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

⁴ Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, 142290 Russia

⁵ Pertsov White Sea Biological Station, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

⁶ Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia

⁷ Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Arkhangalsk, 163020 Russia

*e-mail: onlun@yandex.ru

Received May 16, 2023; revised July 3, 2023; accepted July 4, 2023

Abstract—The composition and structure of the anoxygenic phototrophic bacterial (APB) community in the water column of Lake Bol'shie Khruslomeny during winter were investigated. The community developed at the depth of 4.25 m, and its activity during the ice-covered period was very low (6.2 μmol C L⁻¹ day⁻¹). The water in the zone of highest development of phototrophic bacteria was of an unusual lemon-yellow color,

probably due to the production and accumulation of polysulfides. The near-bottom water was also of lemon-yellow color and was resistant to oxidation by the air oxygen. In the zone of peak APB development the content of BChl *d* from green-colored green sulfur bacteria was considerably higher than that of BChl *e* from brown-colored green sulfur bacteria: 77 and 23%, respectively. The cultures of green and purple sulfur bacteria were isolated from lake water, and their physiological and genetic characteristics were determined. Two strains of green sulfur bacteria (brown-colored *BrKhr17* and green-colored *GrKhr17*) contained gas vacuoles in their cells. Phylogenetically they were most closely related to the green-colored strain *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 265 and were identified as new *Chlorobium phaeovibrioides* strains.

Keywords: arctic ecosystems, White Sea, meromictic lakes, polysulfides, green sulfur bacteria, *Chlorobium phaeovibrioides*, purple sulfur bacteria, *Thiocapsa*, *Thiocystis gelatinosa*, bacteriochlorophylls *d* and *e*, fluorescent pigment separation

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТНЫХ СООБЩЕСТВ ПОВЕРХНОСТНЫХ СЛОЕВ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ

© 2023 г. Д. В. Бадмадашиев^{a, *}, А. Р. Строева^{a, b}, А. А. Клюкина^b,
Е. Н. Полудеткина^c, Е. А. Бонч-Осмоловская^{a, b}

^a Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^b Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

^c Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, геологический факультет, Москва, 119234 Россия

*e-mail: dbadmadashiev@gmail.com

Поступила в редакцию 07.05.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Микробные сообщества донных отложений Кандалакшского залива Белого моря до сих пор являются малоизученными. В литературе имеются данные по скорости протекания некоторых микробиологических процессов, однако, о микроорганизмах, населяющих донные отложения, известно очень мало. В настоящей работе путем высокопроизводительного секвенирования варибельных участков генов 16S рРНК были охарактеризованы микробные сообщества 47 образцов донных отложений Кандалакшского залива с глубины 10 см под поверхностью дна. Самыми многочисленными филумами оказались *Pseudomonadota* и *Desulfobacterota*, представители которых вместе составляли около половины от всех прокариот. На родовом уровне выделить какой-либо таксон в качестве доминирующего оказалось невозможным. Среди хемоорганотрофных организмов наиболее представленными были некультивируемые *Sandaracinaceae* (до 10.8%) и *Woeseia* (до 7.5%). Сульфатредуцирующие бактерии являлись важным компонентом сообществ даже в исследованных поверхностных слоях, причем наиболее многочисленными среди них были некультивируемые группы SEEP-SRB1 (до 7.0%) и Sva0081 (до 5.9%). Роды *Sulfurovum* (до 15.5%) и *Thiohalophilus* (до 7.0%), вовлеченные в процессы окисления серосодержащих соединений, являлись важными членами сообществ в некоторых исследованных образцах. Наибольшую долю среди ASV, отнесенных к домену *Archaea*, занимал род *Nitrosopumilus* (до 6.9% от общего количества прокариот), осуществляющий окисление аммония до нитрита. В исследованных образцах было обнаружено много последовательностей, определенных как участки гена 16S рРНК хлоропластов, что может указывать на то, что темпы поступления органического вещества в верхней части донных отложений преобладают над темпами его разложения.

Ключевые слова: микробные сообщества, биоразнообразие, ген 16S рРНК, донные отложения, Кандалакшский залив, Белое море, арктические моря

DOI: 10.31857/S0026365623600244, **EDN:** CYSXJT

История Белого моря началась около 14 тыс. лет назад, когда во время таяния ледника его акватория была освобождена ото льда (Lisitsyn, Demina, 2018). Мощность современных неоплейстоценовых осадков, залегающих на метаморфическом фундаменте, достигает десятков метров. В настоящее время Белое море представляет собой небольшое полузамкнутое арктическое море, сообщающееся с Северным Ледовитым океаном через Баренцево море. Водообмен между Баренцевым и Белым морями ограничен, но создает транспортную систему для твердых частиц, микроорганизмов и протекания биогеохимических циклов (Pantuyulin, 2003).

Из-за малого объема и глубины Белого моря основным источником осадочного материала является вещество, приносимое водой рек и состоящее как из минеральной, так и органической компонент. В участках впадения рек доля минеральных частиц составляет до 73% общей массы взвешенных частиц. В открытой части моря возрастает влияние фитопланктона на формирование осадков, чья продуктивность максимальна в фотической зоне, располагающейся в пределах первых 10–15 м от поверхности воды; его доля в общем количестве взвешенных частиц доходит до 65% (Kravchishina et al., 2018). Из-за близости к полярному кругу в Белом море наблюдаются изменения

в биогеохимической активности по сезонам, что связано с замерзанием и оттаиванием водоема. Воды Кандалакшского залива подвергаются довольно сильному перемешиванию в своей верхней части из-за циклов приливов и отливов (Мельников и соавт., 2003; Саввичев и соавт., 2003).

Механический состав донных отложений Белого моря довольно разнообразный: в северной части наблюдается высокая доля песка (около 70%), а в некоторых районах возрастает относительное содержание гравия и гальки, составляя 30–50%. С ростом глубины в донных отложениях увеличивается доля мелкозернистых компонентов, в наиболее глубокой центральной части процентное содержание пелита может достигать 90%. В Кандалакшском заливе в глубоководных частях, где толщина водного слоя составляет более 100 м, также наблюдается преобладание пелита, а в более мелких частях донные отложения составлены преимущественно из илистой и песчаной фракций (Berger, Naumov, 2000).

Максимальные содержания основных химических компонентов (С, Fe, Mn, P и Ti) были обнаружены в глубинных частях около границ Кандалакшского залива и Двинского залива (Невский и соавт., 1977). В донных отложениях Белого моря наблюдается повышенное содержание Mn (до 2% в центральной глубоководной части) относительно других арктических морей, что может быть объяснено его притоком с суши в связанной с гумусовыми веществами форме (Горшкова, 1966; Розанов, Волков, 2006). Несмотря на относительно высокое содержание органического углерода (1–2%), восстановительные процессы в верхней части отложений протекают довольно медленно, что связано с низким содержанием легко метаболизируемого органического вещества и окислительной обстановкой, о которой свидетельствует преобладание окисленных форм Fe и Mn (Розанов, Волков, 2006). Содержание CH_4 в верхних окисленных слоях донных отложений Белого моря составляет от 0.2 до 3.5 мкл CH_4 дм⁻³, концентрация продолжает расти при движении вниз по профилю, достигая максимальных значений на глубине нескольких метров, после чего постепенно снижается (Саввичев и соавт., 2008).

Имеющиеся в настоящий момент данные по микробному разнообразию донных отложений Белого моря довольно скудны. Большинство работ затрагивает исследования состава сообществ в ассоциированных с Кандалакшским заливом меромиктических водоемах, где доминирующим компонентом в зоне хемоклина выступают представители зеленых серобактерий (Жильцова и соавт., 2018; Лунина и соавт., 2013, 2016, 2019; Savvichev et al., 2018; Kadnikov et al., 2019; Саввичев и соавт., 2022). В воде исследованных озер наблюдалась относительно высокая концентрация

CH_4 , а также высокие темпы сульфатредукции и окисления CH_4 (Саввичев и соавт., 2020).

Образование CH_4 в Белом море происходит как в верхней окисленной части осадка (первые сантиметры от поверхности), так и в нижележащих анаэробных горизонтах. Наибольшая концентрация CH_4 наблюдалась на глубине 2–3 м, ниже значения резко падали. Темпы сульфатредукции, напротив, выше в верхних приповерхностных слоях и уменьшаются вниз по профилю. Конечные этапы анаэробного разложения органического вещества происходят в большей степени за счет сульфатредукции, скорость которой на 2–3 порядка выше, чем скорость метаногенеза. В целом, донные отложения Белого моря на больших глубинах характеризуются низкими темпами сульфатредукции и метаногенеза (Саввичев и соавт., 2008). Однако в зоне литорали эти процессы проявляют большую интенсивность (Саввичев и соавт., 2003).

В составе микробных сообществ в водном столбе Кандалакшского залива на уровне филума доминирующими микроорганизмами являются *Pseudomonadota*, наиболее представленным классом — γ -*Proteobacteria*. α -Разнообразие в сообществах снижается вместе с глубиной, что особенно заметно в придонных слоях воды, где температура опускается до 0°C (Pantulyin, 2003), а микроорганизмы предположительно адаптированы к психрофильным условиям, в которых на уровне рода доминируют представители *Halomonas*, а также существенна доля *Pseudoalteromonas* (Pesciaroli et al., 2015a, 2015b; Gorrasi et al., 2019).

Для литорали Белого моря имеются некоторые данные о структуре микробных сообществ. Так, наиболее распространенными филумами выступают *Pseudomonadota* (α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*) и *Actinomycetota* (Pesciaroli et al., 2015), а в биопленках и бактериальных матах — *Pseudomonadota* (*Thiocapsa* и *Thiorhodococcus*) и *Chlorobiota* (*Prosthecochloris*) (Бурганская и соавт., 2019).

Основной целью настоящего исследования являлось описание прокариотных сообществ донных отложений Белого моря, в частности, Кандалакшского залива. В данной работе была произведена попытка оценить разнообразие и структуру прокариотных сообществ, а также выявить основные метаболические функции микроорганизмов, населяющих данное место обитания. Для решения этих задач было проведено высокопроизводительное секвенирование переменных участков генов 16S рРНК из 47 образцов, отобранных в различных точках Кандалакшского залива.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов. Объектом нашего исследования являлся полигон, расположенный у острова

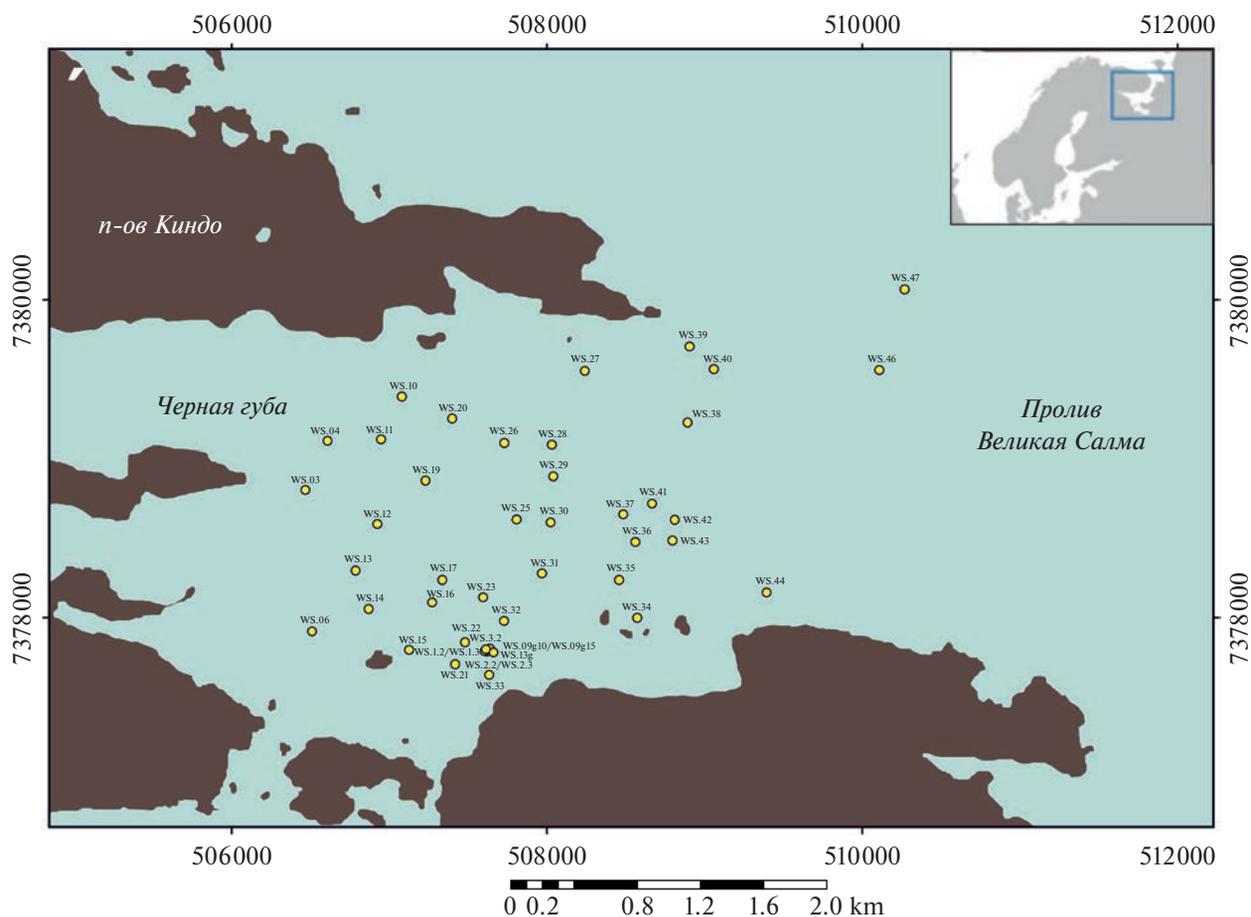


Рис. 1. Места точек отбора проб в Кандалакшском заливе Белого моря.

Великий, в пределах пролива Великая Салма, Кандалакшский залив. В геологическом отношении полигон расположен в пределах Кандалакшского грабена Балтийского щита. Образцы донных отложений были получены в результате пробоотбора в 2021 г. при помощи ковшового дночерпателя Day grab (0.1 м²), ударной прямоточной гравитационной трубы длиной 3 м, а также ручным способом при погружении с аквалангом в безвоздушную среду, с глубины 10 см ниже поверхности дна. В случае отбора проб при помощи гравитационной трубы возможно проведение детального послойного описания разреза из центральной части керна осадка (диаметр керна 11 см). При использовании дночерпателя характеризуется керн верхних 10–15 см разреза, который может перемешиваться при отборе пробы. В этом случае образцы отбирались только из верхнего структурированного слоя осадка, после предварительной проверки, что перемешивание визуально не детектировано.

Образцы для микробиологических исследований помещались в стерильные 50 мл пробирки типа Фалькон, целиком заполненные отобранным материалом для сохранения нативных усло-

вий газовой фазы. Хранение и транспортировка образцов осуществлялась при температуре ~5°C. Для исследования состава прокариотных сообществ было использовано 47 образцов донных отложений (рис. 1).

Геохимические работы на судне включали в себя комплекс работ, в том числе отбор проб для геохимического анализа газовой фазы и литолого-геохимических исследований осадка. Керновые образцы для исследований отбирались из верхних 10 см осадка при отборе ковшовым пробоотборником и каждые 30 см по всей длине керна при отборе гравитационной трубкой. На газовый анализ отбиралась проба осадка в объеме 40 мл, из которой далее была выделена газовая фаза методом “head space”. Для гранулометрических и пиролитических исследований отбиралась проба осадка 200 г в zip-lock пакет и герметично упаковывалась.

Газогеохимические, пиролитические и гранулометрические исследования. Исследования углеводородного (УВ) и не-УВ состава газовой фазы из осадков выполнялись на стационарных газовых хроматографах Хроматэк-Кристалл 5000

(Россия), оснащенных пламенно-ионизационными детекторами (ПИД) и детектором по теплопроводности (ДТП). На полученных хроматограммах выполнена идентификация пиков CH_4 . Расчет концентраций CH_4 производился по стандартным концентрациям в метрологически аттестованных газовых смесях (производство “Мониторинг”, г. Санкт-Петербург, аттестация выполнена во ВГУП ВНИИМ им. Менделеева). Изотопные исследования углерода метана и углекислого газа осуществлялись на изотопном масс-спектрометре Delta V Plus (“ThermoFisher Scientific”, Германия).

Пиролитические исследования выполнялись по методике цикла Bulk на приборе Rock-Eval 6 standard компании Vinci Technologies. В ходе исследований определялось количество органического углерода (ТОС – total organic carbon) наряду с рядом других параметров.

Гранулометрический анализ выполнялся для определения размера зерен в осадке и их соотношения на основе явления рассеяния частицами падающего света во всех направлениях с распределением интенсивностей, зависящих от размера частицы. Пробы анализировали по единой методической схеме на лазерном дифрактометре Analysette 22 Microtec Plus (“Fritsch”, Германия). Диапазон измерений прибора – от 0.08 до 2000 мкм – позволяет детально охарактеризовать пелитовую, алевритовую и песчаную фракции.

Экстракция ДНК, подготовка библиотек ампликонов, секвенирование. Для выделения тотальной ДНК из образцов донных отложений были использованы набор FastDNA™ SPIN Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) и гомогенизатор FastPrep-24™ (“MP Biomedicals”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для оценки состава прокариотных сообществ синтезировали библиотеки ампликонов гиперварибельного участка V4 гена 16S рРНК для последующего секвенирования. Подготовку библиотек проводили согласно Gohl et al. (2016). Для получения ампликонов использовали систему универсальных праймеров на регион V4: прямой праймер 515F (5'-GTGBCAG-CMGCCGCGGТАА-3') (Hugerth et al., 2014) и обратный праймер Pro-mod-805R (5'-GACTACN-VGGGТМТСТААТСС-3') (Меркель и соавт., 2019), включающие также технические последовательности для секвенирования (Fadrosh et al., 2014). Библиотеки очищали с помощью агарозного гелеэлектрофореза и набора CleanUp Standard (“Евроген”, РФ). Секвенирование проводили с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 (“Illumina”, США) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные сиквенсы были депонированы в репозитории Se-

quence Read Archive (SRA) под идентификатором доступа PRJNA975128.

Обработка последовательностей и анализ данных. Полученные сырые риды участка V4 гена 16S рРНК были обработаны с помощью алгоритма QIIME 2 (Bolyen et al., 2019). В ходе обработки сырые данные были демультимплицированы в соответствии с имеющимися баркодами, а затем были подвергнуты контролю качества с использованием алгоритма DADA2 (Callahan et al., 2016). Оценка экологических индексов α -разнообразия (индекс Шеннона; Shannon, 1948), количество вариантов последовательности ампликона (ASV – amplicon sequence variant) и Chao1 (Chao, Bunge, 2002) проводилась также с помощью алгоритма QIIME 2. Для определения количества ASV последовательности были объединены на основании сходства в 98%. Таксономическая структура сообществ была определена с использованием базы данных Silva 138.1 (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>).

На основании полученных филогенетических профилей микробных сообществ были предсказаны возможные метаболические функции микроорганизмов, населяющих исследованные образцы донных отложений. Для этих целей было использован алгоритм FAPROTAX (Louca et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Литолическое описание и результаты геохимических исследований осадков и газовой фазы. Изученные образцы представлены глинистыми и песчано-глинистыми алевритами с различной долей песчаной (1–43%, для большинства образцов – 15–23%) и пелитовой примесей (12–50%) (рис. 2). Цвет осадков темно-серый, серый, с зеленоватым оттенком, в большинстве станций – с четким запахом сероводорода. Текстура пятнистая полосчатая, неоднородная, отмечают многочисленные микролинзы песчаного алеврита. Консистенция текучая, текуче-пластичная. Плотность 1.26–1.43 г/см³. Содержание ТОС, определенного по пиролизу, изменяется от 0.38 до 2.01%, закономерно увеличиваясь к береговой зоне.

Для определения состава газовой фазы изученных осадков выполнены газохроматографические исследования газовой фазы, выделенных методом “head space”. В станциях WS.09g и WS.13g наблюдались повышенные концентрации углекислого газа (0.1–0.8%), содержание метана изменялось от 0.008 до 0.6%. Изотопные исследования углерода и водорода метана указывают на четкий биогенный облик метана ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4} = -82.4\text{--}92.8\text{‰}$; $\delta^3\text{D}_{\text{CH}_4} = -212.2\text{--}227.4\text{‰}$). Также обращает внимание высокое содержание гелия (0.9–1.7%).

Таксономический состав и α -разнообразие сообществ. Для исследуемых образцов донных отложе-

ний было получено 3491601 сырых последовательностей, в среднем по 37144 на образец. После прохождения контроля качества среднее количество последовательностей составляло 25573 на образец. Для оценки α -разнообразия были использованы индексы Шеннона и Чоа1. Всего было обнаружено 12558 уникальных ASV, в образцах количество обнаруженных ASV составляло от 277 до 991. Оценка количества ASV в исследованных образцах по индексу Чоа1 составила от 278.43 до 1015.39. Индекс разнообразия Шеннона имел разброс значений от 7.45 до 9.00. Полученные результаты индексов Шеннона и Чоа1 свидетельствуют о достаточно высоком биоразнообразии в донных отложениях Кандалакшского залива.

Анализ таксономической структуры прокариотных сообществ в исследованных образцах донных отложений Кандалакшского залива показал, что наибольшую долю во всех образцах занимают представители домена *Bacteria* (91.4–99.1%). Среди филумов этого домена наиболее многочисленны *Pseudomonadota* (18.0–54.9%) и *Desulfobacterota* (8.0–42.6%), совокупно представляя около половины от всего обилия обнаруженных ASV. Филумы *Bacteroidota* (5.1–11.6%), *Muxococcota* (0.8–11.2%), *Planctomycetota* (1.6–6.4%), *Acidobacteriota* (1.5–5.3%), *Actinomycetota* (0.5–6.6%), *Cyanobacteriota* (0.0–19.4%), *Campilobacterota* (0.0–24.0%), *Chloroflexota* (0.0–3.8%), *Nitrospirota* (0.0–2.2%), *Verrucomicrobiota* (0.4–1.9%) и филум-кандидат NB1-j (0.3–4.8%) выступали в качестве групп среднего обилия в исследованных образцах. Среди представителей *Archaea* (до 8.6% от всего обилия) филумы *Crenarchaeota* (9.0–88.2% от всего обилия *Archaea*) и *Nanoarchaeota* (12.3–73.2% от всего обилия *Archaea*) численно преобладали над остальными и составляли в сумме до 99% от всех последовательностей, отнесенных к домену *Archaea*.

Филум *Pseudomonadota* состоял преимущественно из двух классов: α -*Proteobacteria* (1.4–16.0% от общего обилия) и γ -*Proteobacteria* (13.0–37.2% от общего обилия). Последний был одним из самых распространенных классов микроорганизмов в исследованных образцах донных отложений. Большинство представителей филума *Desulfobacterota* в образцах относились к классам *Desulfobacteria* и *Desulfobulbia*.

На родовом уровне из всего имеющегося разнообразия невозможно выделить какой-либо таксон в качестве доминирующего ни в одном исследованном образце донных отложений (рис. 3).

Исключением являются образцы WS.32, WS.10 и WS.47, где доля *Sulfurovum* (филум *Campylobacterota*) доходила до 15.5% (WS.32). Также в образцах WS.41, WS.39, WS.42, WS.32, WS.41 и WS.40 наблюдалось увеличение представленности рода *Thiohalophilus* (филум *Pseudomonadota*, до 7.0%). Среди культивируемых родов микроорганизмов

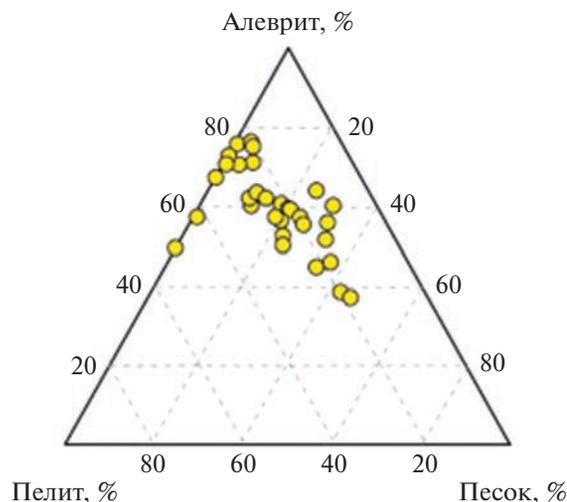


Рис. 2. Гранулометрический состав исследуемых образцов донных отложений Кандалакшского залива Белого моря.

самыми распространенными были представители рода *Woeseia* (филум *Pseudomonadota*), которые также являлись в среднем наиболее представленными прокариотами во всех исследованных образцах (до 7.5%). Образец WS.46 выделялся среди остальных заметным количеством *Colwellia* (филум *Pseudomonadota*, 7.5%). Остальные культивируемые формы микроорганизмов занимали, как правило, менее 1% от всего обилия прокариот в исследованных образцах донных отложений. Относительно многочисленной группой были некультивируемые представители семейства *Sandracinaceae* (филум *Muxococcota*, 0.7–10.8%). Также следует отметить высокую долю некультивируемых форм сульфатредуцирующих бактерий филума *Desulfobacterota*, входящих в группы SEEP-SRB1 (0.2–7.0%), и Sva0081 (0.7–5.9%). В образцах WS.1.2, WS.3.2 и WS.27 наблюдалась повышенная доля последовательностей, определенных как *Chloroplast* (до 19.2%). Наибольшую долю среди ASV, отнесенных к домену *Archaea*, занимали представители рода *Nitrosopumilus* (0.1–6.9% от общего количества прокариот). Нам не удалось обнаружить корреляцию между геологическими и геохимическими характеристиками исследуемых донных отложений и составом населяющих их прокариотных сообществ.

Предполагаемые метаболические функции. Возможные метаболические функции, представленные в исследованных прокариотных сообществах, были предположены с помощью алгоритма FAPROTAX, работа которого основывается на филогенетическом сходстве обнаруженных ASV с данными по культивируемому микроорганизмам с известными функциями. С помощью этого алгоритма удалось предсказать метаболическую функцию для 18.1%

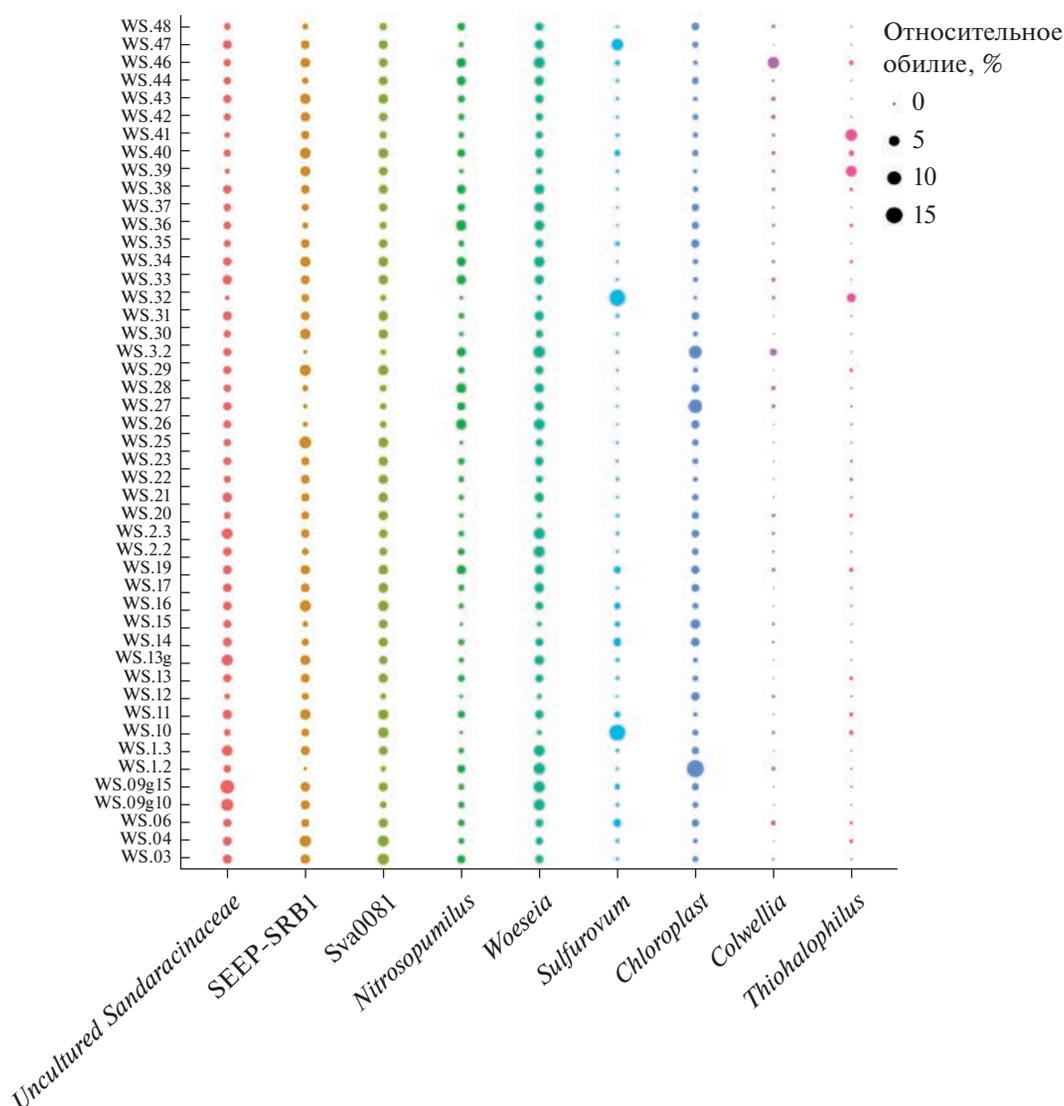


Рис. 3. Разнообразие наиболее представленных таксонов прокариот на родовом уровне в образцах донных отложений Кандалакшского залива.

ASV. На тепловой карте (рис. 4) представлен перечень функциональных характеристик, доступных для программы и обнаруженных хотя бы в одном образце. Наиболее распространенными функциями оказались хемогетеротрофия, в первую очередь аэробная, а также нитрификация и функции, связанные с фототрофным типом питания. В образцах с высоким содержанием хлоропластов также наблюдаются более высокие показатели относительной численности хемоорганотрофных микроорганизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа представляет первую в своем роде попытку дать полную характеристику состава прокариотных сообществ донных отложе-

ний Кандалакшского залива Белого моря. Описанные в литературных источниках исследования не позволяют в полной мере оценить обилие и разнообразие микроорганизмов, которые населяют исследуемый биотоп. В ходе данной работы была сделана попытка выявления основных компонентов микробного сообщества в верхних слоях донных отложений и возможных путей метаболизма этих микроорганизмов. Для этого были использованы индексы α -разнообразия и предсказанные алгоритмом FAPROTAX метаболические функции.

При постоянном притоке осадочного материала происходит аккумуляция значительного количества органики в донных отложениях. Только за четвертичный период по имеющимся оценкам было накоплено около $1,46 \times 10^{20}$ г С (LaRowe et al., 2020). В условиях донных отложений протекают

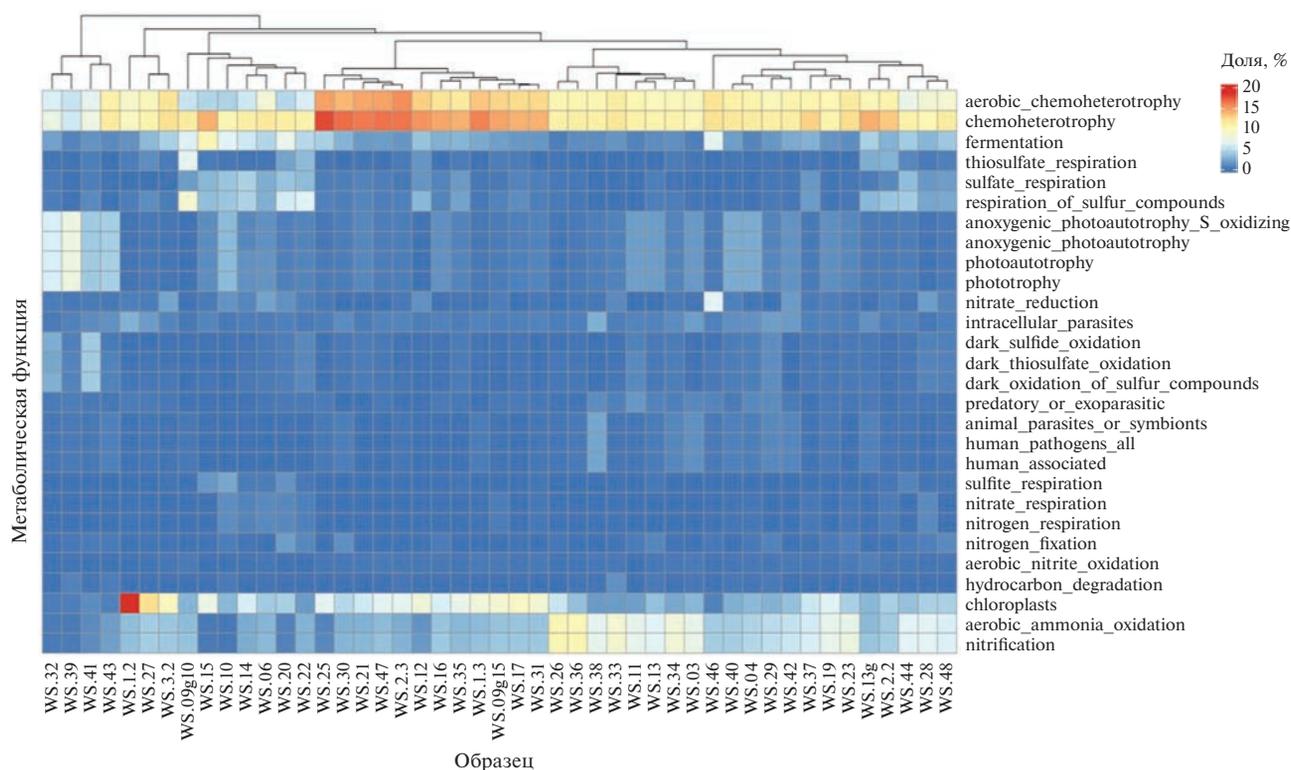


Рис. 4. Тепловая карта предполагаемых метаболических функций прокариотных сообществ донных отложений Кандакшского залива. Каждая из представленных функций была обнаружена хотя бы в одном из исследованных образцов.

заключительные стадии цикла углерода, где органическое вещество частично разлагается в аэробной обстановке, а другая его часть захоранивается, и далее, в процессе жизнедеятельности анаэробных микроорганизмов, может быть преобразована в CO₂, H₂S и CH₄ (Beulig et al., 2017; LaRowe et al., 2020). Наличие живых клеток установлено для глубоко погребенных слоев отложений (Schippers et al., 2005), однако темпы преобразования органики снижаются с глубиной залегания погребенного вещества (Middelburg, 1989). Благодаря постоянному притоку органического вещества морские отложения являются местом обитания значительного (0.6% от всей живой биомассы на планете) количества микроорганизмов (Kallmeyer et al., 2012).

В донных отложениях арктических морей, по данным секвенирования генов 16S рРНК, наиболее распространены представители филумов *Pseudomonadota*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Planctomycetota*, *Spirochaetota* и *Verrucomicrobiota*. Среди *Pseudomonadota* самыми распространенными являются представители класса *γ-Proteobacteria* (Li et al., 2009; Ravenschlag et al., 1999). Обильно представлены сульфатредуцирующие бактерии, входящие в филум *Desulfobacterota*, особенно в верхних приповерхностных

горизонтах отложений (Ravenschlag et al., 1999). Максимальная доля *γ-Proteobacteria* наблюдается в верхней приповерхностной части донных отложений, ниже возрастает содержание сульфатредуцирующих бактерий (Teske et al., 2011).

Баренцево море является географически ближайшим и связанным с Белым морем водоемом, который по сравнению с ним гораздо лучше изучен. Важными участниками терминального этапа разложения органики в донных отложениях являются сульфатредукторы, причем в Баренцевом море наиболее распространены представители *Desulfobulbaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Desulfuromonadaceae* и *Desulfarculaceae*, а также некультивируемые группы SAR324 и Sva0485 (Brioukhanov et al., 2022). В донных отложениях Баренцева моря обильно представлены микроорганизмы, относящиеся к *Shewanellaceae*, вовлеченные в восстановление Fe³⁺ и Mn⁴⁺, также заметна доля прокариот, участвующих в цикле азота (*Brocardiales* и *Nitrosopumilaceae*), высокую долю занимают метанокисляющие бактерии *Methylomirabilis* (Stevenson et al., 2020). Также среди метанокисляющих микроорганизмов в донных отложениях Баренцева моря распространены представители архейной группы ANME, ассоциированные с сульфатредуцирующими *Desulfobacterota* (SEEP-SRB1). Среди

культивируемых бактерий встречаются также представители семейств *Colwelliaceae*, *Coxiellaceae*, *Psychromonadaceae*, *Shewanellaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Haliaceae*, *Spongiibacteraceae*, *Nitrosococcaceae*, *Woeseiaceae*, *Thiotrichaceae*, *Helicobacteraceae* и *Thiohalorhabdaceae* (Begmatov et al., 2021).

Наиболее распространенными филумами в осадках Белого моря были *Pseudomonadota* и *Desulfobacterota*, что отличает его от соседнего Баренцева моря, где доля представителей *Desulfobacterota* на аналогичной глубине была ниже, а относительное количество *Chloroflexota*, наоборот, было увеличено (Begmatov et al., 2021). В донных отложениях других арктических морей наблюдается преобладание представителей филума *Pseudomonadota*; представители других филумов могут иметь различную представленность. Также к наиболее распространенным филумам в других арктических морях относятся *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Planctomycetota*, *Spirochaetota*, *Verrucomicrobiota* (Li et al., 2009; Tian et al., 2009), которые были обнаружены в составе прокариотных сообществ донных отложений Белого моря, но лишь как группы среднего обилия или вторичные компоненты, чьи доли не превышают первых двух десятков процентов.

Значения экологических индексов свидетельствуют о достаточно высоком биоразнообразии в донных отложениях Кандалакшского залива. Полученные результаты вычисления α -разнообразия, как правило, имеют более высокие значения по сравнению с литературными данными о разнообразии прокариот, населяющих водную толщу Кандалакшского залива (Gorrasi et al., 2019). При этом в фотическом слое α -разнообразие достигало максимальных значений, в то время как в придонном слое воды — минимальных (Gorrasi et al., 2019). Увеличение биоразнообразия в донных отложениях по сравнению с придонным слоем воды может быть обусловлено процессом аккумуляции органического вещества, что проявляется в наличии большего количества экологических групп.

Использование различных методов пробоотбора могло привести к различиям в полученных результатах из-за разной степени воздействия на перемешивание отложений. Однако нами не было обнаружено существенных различий по основным компонентам прокариотных сообществ в исследуемых образцах.

Среди хемоорганотрофных микроорганизмов в исследованных образцах можно выделить представителей *Sandaracinaceae*, *Woeseia* и *Colwellia* как наиболее многочисленных членов сообществ. Некультивируемый род миксобактерий, входящий в *Sandaracinaceae*, в значительной степени представлен в большей части образцов. На данный момент это семейство включает только один культивируемый вид *Sandaracinus amylolyticus*, выделенный из

почвы (Mohr et al., 2012). Имеются сведения о довольно широком распространении бактерий этого семейства в природе, особенно в морских местах обитания. Эти бактерии принимают участие в разложении органического вещества и обитают в богатых питательными веществами местах (García et al., 2018).

Наиболее многочисленными в большинстве изученных образцов организмами по данным профилирования являются представители рода *Woeseia*. Единственным культивируемым представителем этого рода является *Woeseia oceani*, выделенный из прибрежных отложений Желтого моря (Du et al., 2016). Описанный вид живет в довольно широком диапазоне физических условий, является органогетеротрофным организмом. *Woeseia* не развивается при низкой солености и является факультативным анаэробом (Du et al., 2016). *Woeseiaceae* является повсеместно распространенным таксоном, его представители обнаруживаются в донных отложениях различных морей, где они зачастую являются одними из самых многочисленных прокариот, занимающих до 22% от всех бактериальных последовательностей в прибрежных европейских и австралийских донных отложениях (Mufmann et al., 2017). Эти микроорганизмы также могут вносить свой вклад в эмиссию N_2O , так как для них была установлена способность к денитрификации (Hinger et al., 2019).

В образце WS.46 было зафиксировано повышенное количество бактерий рода *Colwellia*, представлявшего наибольшую долю среди всех прокариот. Этот род факультативно анаэробных γ -*Proteobacteria* отличается психрофилией; некоторые его представители являются барофильными организмами. Представители *Colwellia* распространены в холодных морях, где населяют толщу воды и потребляют различные органические соединения, а также способны к денитрификации (Deming et al., 1988; Methé et al., 2005; Deming, Junge, 2015). Учитывая особенности рода *Colwellia*, а также их значительное присутствие только в одном из исследованных образцов, можно сделать предположение, что данный микроорганизм попал в образец из придонных слоев воды, где могут наблюдаться оптимальные условия для жизни бактерий этого рода. На это также указывает наличие *Colwellia* в образцах воды Кандалакшского залива (Gorrasi et al., 2019).

Наиболее многочисленным родом архей в исследованных образцах донных отложений оказался *Nitrosopumilus*, представители которого участвуют в цикле азота. Археи рода *Nitrosopumilus* — аэробы, способные к окислению аммония для получения энергии и автотрофному росту. Представители этого рода распространены в фотической зоне и приповерхностной части донных отложений в морях по всему миру, включая полярные моря

(Könneke et al., 2005; Labrenz et al., 2010; Park et al., 2012; Qin et al., 2017).

Прокариоты, вовлеченные в цикл серы, составляют существенную часть от всех микроорганизмов, населяющих исследованные донные отложения. Наиболее многочисленные сульфатредукторы представлены группами SEEP-SRB1 и Sva0081. Микроорганизмы группы SEEP-SRB1 распространены в областях зон флюидной разгрузки по всему миру, в которых происходит выход УВ, особенно CH_4 (Kleindienst et al., 2012; Vigneron et al., 2017; Petro et al., 2019). Представители этой группы вовлечены в синтрофный процесс анаэробного окисления CH_4 и других УВ, где они выступают в качестве партнеров для анаэробных метанооксиляющих архей группы ANME (Boetius et al., 2000; Knittel et al., 2003; Niemann et al., 2005). SEEP-SRB1 осуществляют процесс сульфатредукции, а также в их геноме имеются последовательности, указывающие на автотрофный тип питания (Skennerton et al., 2017). Группа ANME является полифилетической группой в рамках филума *Halobacterota* (Chadwick et al., 2022), однако в исследованных образцах представители этой группы были обнаружены в крайне малом количестве, не достигающем десятых долей процента.

Еще одной обнаруженной обильной группой некультивируемых сульфатредуцирующих бактерий является Sva0081. Ее представители обнаруживаются повсеместно в морских и пресноводных донных отложениях, а также осадках сточных вод, где они занимают заметную долю от общего количества микроорганизмов (Liu et al., 2015; Kinsman-Costello et al., 2017; Coskun et al., 2019; Jantharadej et al., 2021). Есть сведения, что представители этой группы могут быть эндосимбионтами морских беспозвоночных (Sato et al., 2020). Существуют предположения о том, что представители Sva0081 могут играть значительную роль в процессах трансформации углерода, а также быть важным потребителем такого интермедиата, как H_2 , в зоне сульфатредукции (Dyksma et al., 2018).

Среди сероокисляющих прокариот в исследованных образцах донных отложений самыми распространенными являются бактерии родов *Thiohalophilus* и *Sulfurovum*. Род *Thiohalophilus* занимал доли процента в образцах донных отложений, за исключением образцов WS.41, WS.39, WS.42, WS.32, WS.41 и WS.40. Этот род был впервые выделен из соленого озера и характеризуется умеренной галофилией (1.0–4.0 M NaCl) и автотрофным типом питания, окисляя восстановленные соединения серы (Sorokin et al., 2007). Существуют сведения о нахождении представителей этого рода в морских отложениях, в том числе подверженных антропогенному влиянию, где повышена концентрация тяжелых металлов. *Thiohalophilus* имеет заметную долю среди сероокисляющих бактерий в соленых

донных отложениях (Shao et al., 2009; Sun et al., 2013; Li et al., 2021).

Еще одним родом автотрофных сероокисляющих бактерий, обнаруженным в донных отложениях Кандалакшского залива был *Sulfurovum*. В образцах WS.32, WS.10, WS.14, WS.47, WS.06, WS.19 и WS.15 его доля возрастала, превышая 1% и доходя до 15% в образце WS.32. Известные культивируемые представители этого рода являются хемолитавтотрофными организмами, окисляющими серу и тиосульфат и использующими кислород или нитрат в качестве акцептора электронов; единственным источником углерода выступает углекислый газ (Inagaki et al., 2004; Yamamoto et al., 2010; Mori et al., 2018). Также имеются сведения о наличии в этом роде строго анаэробных представителей, способных к окислению водорода, как единственного источника энергии, причем сера, тиосульфат или нитрат являются акцепторами электронов (Mino et al., 2014). Известные представители этого рода были выделены из образцов, отобранных вблизи морских гидротермальных источников. Однако имеются сведения об обитании *Sulfurovum* в зонах холодных просачиваний и в арктических морях (Sun et al., 2020; Kajale et al., 2021). Присутствие *Thiohalophilus* и *Sulfurovum* говорит о том, что в этих образцах реализуется окислительная часть цикла серы.

Предположительные метаболические функции, полученные с помощью FAPROTAX, указывают на преобладание хемоорганотрофного типа питания в исследованных прокариотных сообществах. При этом представленность микроорганизмов, обладающих хемоорганотрофным типом питания, соотносится с увеличением в образцах доли хлоропластов. Органическое вещество может аккумулироваться при постоянном его притоке из фотической зоны и из поверхностных стоков (LaRowe et al., 2020). Обнаруженные ДНК хлоропластов могут указывать на активный процесс поступления органического вещества и его аккумуляцию в донных отложениях, однако корреляции между долей хлоропластов в образцах и ТОС выявлено не было. Можно предположить, что приток органики в приповерхностных слоях донных отложений преобладает над темпами разложения, так как в ином случае доля хлоропластов, вероятно, была бы незначительной.

По предсказанным метаболическим функциям можно предположить преобладание аэробных условий в исследуемых локациях. Вероятно, исходя из данных по содержанию хлоропластов в исследуемых образцах, разложение органического вещества в полной мере не осуществляется в верхних слоях донных отложений в Кандалакшском заливе, и дальнейшие процессы преобразования протекают в более глубоких слоях. Органика потребляется, в первую очередь, гетеротроф-

ными бактериями, а также сульфатредукторами, которые могут принимать участие в финальных этапах анаэробного цикла углерода, причем анаэробные условия могут создаваться внутри конгломератов частиц в донных отложениях.

Присутствие архей рода *Nitrosopumilus* в заметных количествах в образцах указывает на активные процессы окисления аммония в верхних слоях донных отложений, источником которого может являться разлагающийся в донных отложениях белок животного происхождения. Бактерии рода *Woeseia*, являющегося, в среднем, самым многочисленным родом во всех исследуемых образцах, также могут принимать участие в протекающих процессах денитрификации (Hinger et al., 2019).

Хотя темпы сульфатредукции в донных отложениях Белого моря низки (Саввичев и соавт., 2008), микроорганизмы, вовлеченные в этот процесс, занимают значительную долю от всего многообразия. Группы SEEP-SRB1 и Sva0081 являются самыми многочисленными из обнаруженных сульфатредукторов и, вероятно, вносят заметный вклад в конечные стадии анаэробного этапа цикла углерода. Присутствие представителей группы SEEP-SRB1 во всех исследованных образцах косвенно указывает на просачивания CH_4 в исследуемых донных отложениях Кандалакшского залива Белого моря, хотя обнаруженные представители группы ANME и были очень малочисленны. Просачивания CH_4 могут быть связаны с процессами метаногенеза, которые протекают в более глубоких слоях донных отложений. Это согласуется с предположением о преобладании темпов аккумуляции органики над ее минерализацией в верхней аэробной части. Частично разложенное органическое вещество попадает в более глубокие анаэробные слои донных отложений, где, в условиях дефицита сульфатов, может служить источником энергии для синтрофных микробных ассоциаций, чьим конечным продуктом жизнедеятельности является CH_4 .

Таким образом, в донных отложениях Кандалакшского залива Белого моря протекают процессы разложения органического вещества, поступающего из верхних слоев воды и с поверхностными стоками с суши. Разложение органики протекает, в основном, в аэробной среде в верхних слоях отложений, однако, не все органическое вещество успевает перерабатываться в нем, о чем косвенно свидетельствует присутствие в пробах хлоропластов в достаточно высоких количествах. По всей вероятности, даже в верхних слоях отложений существует достаточное количество анаэробных ниш, на что указывает относительно высокое количество сульфатредуцирующих бактерий. Присутствие заметной доли архей рода *Nitrosopumilus* в исследованных образцах указывает на протекание активных процессов окисления аммония, источником

которого, вероятно, может являться белок животного происхождения. Полученные данные по таксономическому составу сообществ, вместе с результатами α -разнообразия, свидетельствуют о высоком разнообразии прокариот, населяющих донные отложения Кандалакшского залива Белого моря.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи благодарны сотрудникам Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова и НИС “Профессор Зенкевич” за организацию и проведение судовых работ; коллегам с геологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Токареву Михаилу Юрьевичу, Хомяку Алексею Николаевичу, с помощью которых был организован пробоотбор; Рыбалко Александру Евгеньевичу, ФГБУ “ВНИИОкеангеология”, за описание ядерного материала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1396).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурганская Е.И., Груздев Д.С., Круткина М.С., Горленко В.М. Бактериальные сообщества микробных матов супралиторали Белого моря и литорали отделившихся от моря озер // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 568–582.
- Burganskaya E.I., Grouzdev D.S., Krutkina M.S., Gorlenko V.M. Bacterial communities of microbial mats of the White Sea supralittoral and of the littoral of the lakes separated from the sea // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 600–612.
- Горшкова Т.И. Марганец в донных отложениях Северных морей Советского Союза и его биологическое значение // Труды ВНИРО. 1966. Т. 60. С. 89–102.
- Лунина О.Н., Саввичев А.С., Кузнецов Б.Б., Пименов Н.В., Горленко В.М. Аноксигенные фототрофные бактерии стратифицированного озера Кисло-Сладкое (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 90–109.
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Kuznetsov B.B., Pimenov N.V., Gorlenko V.M. Anoxic phototrophic bacteria of the Kисло-Sladkoe stratified lake (White Sea, Kandalaksha Bay) // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 815–832.
- Лунина О.Н., Саввичев А.С., Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Кузнецов Б.Б., Горленко В.М. Сукцес-

- сионные процессы в сообществе аноксигенных фототрофных бактерий озера Кисло-Сладкое (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 531–544.
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Krasnova E.D., Kokryatskaya N.M., Veslopolova E.F., Kuznetsov B.V., Gorlenko V.M. Succession processes in the anoxygenic phototrophic bacterial community in Lake Kисло-Sladkoe (Kandalaksha Bay, White Sea) // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 570–582.
- Лунина О.Н., Саввичев А.С., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Кузнецов Б.В., Колганова Т.В., Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Летарова М.А., Летаров А.В., Горленко В.М. Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий меромиктического озера Трехцветное (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 100–115.
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Babenko V.V., Boldyreva D.I., Kuznetsov B.V., Kolganova T.V., Krasnova E.D., Kokryatskaya N.M., Veslopolova E.F., Voronov D.A., Demidenko N.A., Letarova M.A., Letarov A.V., Gorlenko V.M. Seasonal variations in the structure of an anoxygenic phototrophic bacterial community from the meromictic lake Trekhsvetnoe (Kandalaksha Bay, White Sea) // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 100–114.
- Мельников И.А., Корнеева Г.А., Житина Л.С., Шанин С.С. Динамика эколого-биохимических характеристик морского льда в прибрежной зоне Белого моря // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2003. № 2. С. 2006.
- Melnikov I.A., Korneeva G.A., Zhitina L.S., Shanin S.S. Dynamics of ecological-biochemical characteristics of sea ice in coastal waters of the White Sea // Biology Bull. 2003. V. 30. P. 164–170.
- Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тошчаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655–664.
- 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.
- Невесский Е.Н., Медведев В.С., Калинин В.В. Белое море: седиментогенез и история развития в голоцене. М.: Наука, 1977. 236 с.
- Розанов А.Г., Волков И.И. Донные осадки Кандалакшского залива Белого моря: марганцевый феномен // Геохимия. 2009. № 10. С. 1067–1085.
- Rozanov A.G., Volkov I.I. Bottom sediments of Kandalaksha Bay in the White Sea: the phenomenon of Mn // Geochem. Int. 2009. V. 47. P. 1004–1020.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Юсупов С.К., Байрамов И.Т., Пименов Н.В., Леин А.Ю., Иванов М.В. Процесс микробной сульфатредукции в осадках прибрежной зоны и литорали Кандалакшского залива Белого моря // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 535–535.
- Savvichev A., Rusanov I., Yusupov S., Bairamov I., Pimenov N., Lein A., Ivanov M. The process of microbial sulfate reduction in sediments of the coastal zone and littoral of the Kandalaksha Bay of the White Sea // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 478–489.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Захарова Е.Е., Веслополова Е.Ф., Мицкевич И.Н., Кравчишина М.Д., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробные процессы циклов углерода и серы в Белом море // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 823–838.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Mitskevich I.N., Kravchishina M.D., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in the White Sea // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 734–750.
- Саввичев А.С., Кулакова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Кадников В.В., Белецкий А.В., Козьева В.В., Русанов И.И., Летарова М.А., Веслополова Е.Ф., Беленкова В.В., Демиденко Н.А., Горленко В.М. Микробное сообщество морского меромиктического желоба (Бухта Биофильтров), расположенного в Кандалакшском заливе Белого моря // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 492–506.
- Savvichev A.S., Kulakova A.A., Krasnova E.D., Voronov D.A., Kadnikov V.V., Beletskii A.V., Kozyaeva V.V., Rusanov I.I., Letarova M.A., Veslopolova E.F., Belenkova V.V., Demidenko N.A., Gorlenko V.M. Microbial community of a marine meromictic trough (Biofilter Bay) in the Kandalaksha Bay, White Sea // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 432–444.
- Жильцова А.А., Харчева А.В., Краснова Е.Д., Лунина О.Н., Воронов Д.А., Саввичев А.С., Горшкова О.М., Пацаева С.В. Спектральное исследование зеленых серных бактерий в стратифицированных водоемах Кандалакшского залива Белого моря // Оптика атмосферы и океана. 2018. Т. 31. С. 233–239.
- Zhil'tsova A.A., Kharcheva A.V., Krasnova E.D., Lunina O.N., Voronov D.A., Savvichev A.S., Gorshkova O.M., Patsaeva S.V. Spectroscopic study of green sulfur bacteria in stratified water bodies of the Kandalaksha Gulf of the White Sea // Atmospheric and Oceanic Optics. 2018. V. 31. P. 390–396.
- Begmatov S., Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Beletskiy A.V., Rusanov I.I., Klyuvitkin A.A., Novichkova E.A., Mardanov A.V., Pimenov N.V., Ravin N.V. Microbial communities involved in methane, sulfur, and nitrogen cycling in the sediments of the barents sea // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 2362.
- Berger V.Y., Naumov A.D. General features of the White Sea // Berichte Polarf. 2000. V. 359. P. 3–9.
- Beulig F., Røy H., Glombitza C., Jørgensen B.B. Control on rate and pathway of anaerobic organic carbon degradation in the seabed // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 115. P. 367–372.
- Boetius A., Ravensschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jørgensen B.B., Witte U., Pfannkuch O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane // Nature. 2000. V. 407. P. 623–626.
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Caporaso J.G. и др. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.
- Brioukhanov A.L., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Novigatskiy A.N., Kanapatskiy T.A., Politova N.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Phylogenetic diversity in sulphate-reducing bacterial communities from oxidised and reduced bottom sediments of the Barents Sea // Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 2022. V. 115. P. 801–820.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. DADA2: High-resolution sample

- inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods*. 2016. V. 13. P. 581–583.
- Chadwick G.L., Skennerton C.T., Laso-Pérez R., Leu A.O., Speth D.R., Yu H., Morgan-Lang C., Hatzepichler R., Goudeau D., Malmstrom R., Brazelton W.J., Woyke T., Hallam S.J., Tyson G.W., Wegener G., Boetius A., Orphan V.J. Comparative genomics reveals electron transfer and syntrophic mechanisms differentiating methanotrophic and methanogenic archaea // *PLoS Biol.* 2022. V. 20. e3001508.
- Chao A., Bunge J. Estimating the number of species in a stochastic abundance model // *Biometrics*. 2002. V. 58. P. 531–539.
- Coskun Ö.K., Özen V., Wankel S.D., Orsi W.D. Quantifying population-specific growth in benthic bacterial communities under low oxygen using H₂¹⁸O // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 1546–1559.
- Deming J.W., Somers L.K., Straube W.L., Swartz D.G., Macdonell M.T. Isolation of an obligately barophilic bacterium and description of a new genus, *Colwellia* gen. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 1988. V. 10. P. 152–160.
- Deming J.W., Junge K. *Colwellia* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, 2015. P. 1–12.
- Du Z.J., Wang Z.J., Zhao J.X., Chen G.J. *Woeseia oceani* gen. nov., sp. nov., a chemoheterotrophic member of the order *Chromatiales*, and proposal of *Woeseiaceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 107–112.
- Dyksma S., Pjevac P., Ovanesov K., Musmann M. Evidence for H₂ consumption by uncultured *Desulfobacterales* in coastal sediments // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 450–461.
- Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. V. 2. P. 1–7.
- Garcia R., La Clair J.J., Müller R. Future directions of marine myxobacterial natural product discovery inferred from metagenomics // *Mar. Drugs*. 2018. V. 16. Art. 303.
- Gohl D.M., Vangay P., Garbe J., MacLean A., Hauge A., Becker A., Gould T.J., Clayton J.B., Johnson T.J., Hunter R., Knights D., Beckman K.B. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. P. 942–949.
- Gorrasi S., Pesciaroli C., Barghini P., Pasqualetti M., Fenice M. Structure and diversity of the bacterial community of an Arctic estuarine system (Kandalaksha Bay) subject to intense tidal currents // *J. Mar. Systems*. 2019. V. 196. P. 77–85.
- Hinger I., Pelikan C., Mußmann M. Role of the ubiquitous bacterial family *Woeseiaceae* for N₂O production in marine sediments // *Geophys. Res. Abstr.* 2019. V. 21. P. 1.
- 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.
- Inagaki F., Takai K., Nealson K.H., Horikoshi K. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -*Proteobacteria* isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 1477–1482.
- Jantharadej K., Limpiyakorn T., Kongprajug A., Mongkolsuk S., Sirikanchana K., Suwannasilp B.B. Microbial community compositions and sulfate-reducing bacterial profiles in malodorous urban canal sediments // *Arch. Microbiol.* 2021. V. 203. P. 1981–1993.
- Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Metagenomic data of the microbial community of the chemocline layer of the meromictic subarctic Lake Bolshie Hruslomeny, North European Russia // *Data Brief*. 2019. V. 23. Art. 103800.
- Kajale S., Jani K., Sharma A. Contribution of archaea and bacteria in sustaining climate change by oxidizing ammonia and sulfur in an Arctic Fjord // *Genomics*. 2021. V. 113. P. 1272–1276.
- Kallmeyer J., Pockalny R., Adhikari R.R., Smith D.C., D'Hondt S. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2012. V. 109. P. 16213–16216.
- Kinsman-Costello L.E., Sheik C.S., Sheldon N.D., Allen Burton G., Costello D.M., Marcus D., Uyl P.A.D., Dick G.J. Groundwater shapes sediment biogeochemistry and microbial diversity in a submerged Great Lake sinkhole // *Geobiology*. 2017. V. 15. P. 225–239.
- Kleindienst S., Ramette A., Amann R., Knittel K. Distribution and in situ abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. P. 2689–2710.
- Knittel K., Boetius A., Lemke A., Eilers H., Lochte K., Pfannkuche O., Linke P., Amann R. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon) // *Geomicrobiol J.* 2003. V. 20. P. 269–294.
- Könneke M., Bernhard A.E., De La Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // *Nature*. 2005. V. 437. P. 543–546.
- Kravchishina M.D., Lisitsyn A.P., Klyuvitkin A.A., Novigatsky A.N., Politova N.V., Shevchenko V.P. Suspended particulate matter as a main source and proxy of the sedimentation processes // *Handbook of Environmental Chemistry*. Springer Verlag, 2018. P. 13–48.
- Labrenz M., Sintes E., Toetzke F., Zumsteg A., Herndl G.J., Seidler M., Jürgens K. Relevance of a crenarchaeotal sub-cluster related to *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* to ammonia oxidation in the suboxic zone of the central Baltic Sea // *ISME J.* 2010. V. 4. P. 1496–1508.
- LaRowe D.E., Arndt S., Bradley J.A., Estes E.R., Hoarfrost A., Lang S.Q., Lloyd K.G., Mahmoudi N., Orsi W.D., Shah Walter S.R., Steen A.D., Zhao R. The fate of organic carbon in marine sediments – New insights from recent data and analysis // *Earth Sci. Rev.* 2020a. V. 204. Art. 103146.
- LaRowe D.E., Arndt S., Bradley J.A., Burwicz E., Dale A.W., Amend J.P. Organic carbon and microbial activity in marine sediments on a global scale throughout the Quaternary // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2020b. V. 286. P. 227–247.
- Li H., Yu Y., Luo W., Zeng Y., Chen B. Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean // *Extremophiles*. 2009. V. 13. P. 233–246.
- Li M., Fang A., Yu X., Zhang K., He Z., Wang C., Peng Y., Xiao F., Yang T., Zhang W., Zheng X., Zhong Q., Liu X., Yan Q. Microbially-driven sulfur cycling microbial communities in different mangrove sediments // *Chemosphere*. 2021. V. 273. Art. 128597.

- Lisitsyn A.P., Demina L.L. Introduction // Handbook of Environmental Chemistry. Springer Verlag, 2018. P. 1–11.
- Liu J., Liu X., Wang M., Qiao Y., Zheng Y., Zhang X.H. Bacterial and archaeal communities in sediments of the North Chinese Marginal Seas // Microbial Ecol. 2015. V. 70. P. 105–117.
- Methé B.A., Nelson K.E., Deming J.W., Momen B., Melamud E., Zhang X., Moulton J., Madupu R., Nelson W.C., Dodson R.J., Brinkac L.M., Daugherty S.C., Durkin A.S., Deboy R.T., Kolonay J.F., Sullivan S.A., Zhou L., Davidsen T.M., Wu M., Huston A.L., Lewis M., Weaver B., Weidman J.F., Khouri H., Utterback T.R., Feldblyum T.V., Fraser C.M. The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 10913–10918.
- Middelburg J.J. A simple rate model for organic matter decomposition in marine sediments // Geochim. Cosmochim. Acta. 1989. V. 53. P. 1577–1581.
- Mino S., Kudo H., Arai T., Sawabe T., Takai K., Nakagawa S. *Sulfurovum aggregans* sp. nov., a hydrogenoxidizing, thio-sulfate-reducing chemolithoautotroph within the *Epsilon-proteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney, and an emended description of the genus *Sulfurovum* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 3195–3201.
- Mohr K.I., Garcia R.O., Gerth K., Irschik H., Müller R. *Sandaracinus amyolyticus* gen. nov., sp. nov., a starch-degrading soil myxobacterium, and description of *Sandaracinaceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1191–1198.
- Mori K., Yamaguchi K., Hanada S. *Sulfurovum denitrificans* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing epsilonproteobacterium isolated from a hydrothermal field // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 2183–2187.
- Mußmann M., Pjevac P., Krüger K., Dykma S. Genomic repertoire of the *Woeseiaceae*/JTB255, cosmopolitan and abundant core members of microbial communities in marine sediments // ISME J. 2017. V. 11. P. 1276–1281.
- Niemann H., Elvert M., Hovland M., Orcutt B., Judd A., Suck I., Gutt J., Joye S., Damm E., Finster K., Boetius A. Methane emission and consumption at a North Sea gas seep (Tommeliten area) // Biogeosci. 2005. V. 2. P. 335–351.
- Pantuyulin A.N. Hydrological system of the White Sea // Oceanology. 2003. V. 43. P. S1–S14.
- Park S.J., Kim J.G., Jung M.Y., Kim S.J., Cha I.T., Ghai R., Martín-Cuadrado A.B., Rodríguez-Valera F., Rhee S.K. Draft genome sequence of an ammonia-oxidizing archaeon, “*Candidatus Nitrosopumilus sediminis*” AR2, from Svalbard in the arctic circle // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 6946–6947.
- Pesciaroli C., Rodelas B., Juárez-Jiménez B., Barghini P., Fenice M. Bacterial community structure of a coastal area in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia: possible relation to tidal hydrodynamics // Ann. Microbiol. 2015a. V. 65. P. 443–453.
- Pesciaroli C., Barghini P., Cerfolli F., Bellisario B., Fenice M. Relationship between phylogenetic and nutritional diversity in Arctic (Kandalaksha Bay) seawater planktonic bacteria // Ann. Microbiol. 2015b. V. 65. P. 2405–2414.
- Petro C., Jochum L.M., Schreiber L., Marshall I.P.G., Schramm A., Kjeldsen K.U. Single-cell amplified genomes of two uncultivated members of the deltaproteobacterial SEEP-SRB1 clade, isolated from marine sediment // Mar. Genomics. 2019. V. 46. P. 66–69.
- Qin W., Heal K.R., Ramdasi R., Kobelt J.N., Martens-Habben W., Bertagnolli A.D., Amin S.A., Walker C.B., Urakawa H., Könneke M., Devol A.H., Moffett J.W., Armbrust E.V., Jensen G.J., Ingalls A.E., Stahl D.A. *Nitrosopumilus maritimus* gen. nov., sp. nov., *Nitrosopumilus cobalaminigenes* sp. nov., *Nitrosopumilus oxycliniae* sp. nov., and *Nitrosopumilus ureiphilus* sp. nov., four marine ammoniaoxidizing archaea of the phylum *Thaumarchaeota* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 5067–5079.
- Ravenschlag K., Sahm K., Pernthaler J., Amann R. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 3982–3989.
- Sato Y., Wippler J., Wentrup C., Dubilier N., Kleiner M. High-quality draft genome sequences of two *Deltaproteobacterial* Endosymbionts, Delta1a and Delta1b, from the uncultured Sva0081 clade, assembled from metagenomes of the gutless marine worm *Olavius algarvensis* // Microbiol. Resour. Announc. 2020. V. 9. P. e00276-20.
- Savvichev A.S., Babenko V.V., Lunina O.N., Letarova M.A., Boldyreva D.I., Veslopolova E.F., Demidenko N.A., Kokryatskaya N.M., Krasnova E.D., Gaisin V.A., Kostryukova E.S., Gorlenko V.M., Letarov A.V. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake, Trekhtzvetnoe // Environ. Microbiol. 2018. V. 20. P. 3784–3797.
- Shannon C.E. A mathematical theory of communication // Bell Syst. Techn. J. 1948. V. 27. P. 379–423.
- Shao M., Zhang T., Fang H.H.P. Autotrophic denitrification and its effect on metal speciation during marine sediment remediation // Water Res. 2009. V. 43. P. 2961–2968.
- Schippers A., Neretin L.N., Kallmeyer J., Ferdelman T.G., Cragg B.A., John Parkes R., Jørgensen B.B. Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria // Nature. 2005. V. 433. P. 861–864.
- Skennerton C.T., Chourey K., Iyer R., Hettich R.L., Tyson G.W., Orphan V.J. Methane-fueled syntrophy through extracellular electron transfer: Uncovering the genomic traits conserved within diverse bacterial partners of anaerobic methanotrophic archaea // MBio. 2017. V. 8. P. e00530-17.
- Sorokin D.Y., Tourova T.P., Bezoudnova E.Y., Pol A., Muzyer G. Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. – a moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing *Gammaproteobacterium* from hypersaline lakes // Arch. Microbiol. 2007. V. 187. P. 441–450.
- Stevenson M.A., Faust J.C., Andrade L.L., Freitas F.S., Gray N.D., Tait K., Hendry K.R., Hilton R.G., Henley S.F., Tessin A., Leary P., Papadaki S., Ford A., März C., Abbott G.D. Transformation of organic matter in a Barents Sea sediment profile: Coupled geochemical and microbiological processes: Sediment organic matter transformation // Philosoph. Trans. R. Soc. A: Math. Phys. Engin. Sci. 2020. V. 378. Art. 20200223.
- Sun M.Y., Dafforn K.A., Johnston E.L., Brown M.V. Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients // Environ. Microbiol. 2013. V. 15. P. 2517–2531.

Sun Q.L., Zhang J., Wang M.X., Cao L., Du Z.F., Sun Y.Y., Liu S.Q., Li C.L., Sun L. High-throughput sequencing reveals a potentially novel *Sulfurovum* species dominating the microbial communities of the seawater–sediment interface of a deep-sea cold seep in South China sea // *Microorganisms*. 2020. V. 8. P. 687.

Teske A., Durbin A., Ziervogel K., Cox C., Arnosti C. Microbial community composition and function in permanently cold seawater and sediments from an Arctic fjord of Svalbard // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 2008–2018.

Tian F., Yu Y., Chen B., Li H., Yao Y.F., Guo X.K. Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as re-

vealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis // *Polar Biol.* 2009. V. 32. P. 93–103.

Vigneron A., Alsop E.B., Cruaud P., Philibert G., King B., Baksmaty L., Lavallée D., Lomans B.P., Kyrpidis N.C., Head I.M., Tsesmetzis N. Comparative metagenomics of hydrocarbon and methane seeps of the Gulf of Mexico // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 16015.

Yamamoto M., Nakagawa S., Shimamura S., Takai K., Horikoshi K. Molecular characterization of inorganic sulfur-compound metabolism in the deep-sea epsilonproteobacterium *Sulfurovum* sp. NBC37-1 // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. P. 1144–1153.

Phylogenetic Diversity of Prokaryotic Communities of the Upper Sediment Layers of the Kandalaksha Gulf, White Sea

D. V. Badmadashiev^{1, *}, A. R. Stroeva^{1, 2}, A. A. Klyukina²,
E. N. Poludetkina³, and E. A. Bonch-Osmolovskaya^{1, 2}

¹ *Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

² *Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

³ *Geological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

*e-mail: dbadmadashiev@gmail.com

Received May 7, 2023; revised June 30, 2023; accepted July 4, 2023

Abstract—Microbial communities of the sediments of the Kandalaksha Gulf (White Sea) remain insufficiently studied. While the data on the rates of some microbial processes are available, very little is known of the microorganisms inhabiting these sediments. In the present work, high-throughput sequencing of variable regions of the 16S rRNA genes was used to characterize the microbial communities of 47 Kandalaksha Gulf sediment samples, collected at 10 cm below from the bottom surface. *Pseudomonadota* and *Desulfobacterota* were the most abundant phyla, which together comprised about a half of all prokaryotes. Determination of the dominant genus-level taxon proved impossible. The most represented chemoorganotrophic microorganisms were uncultured *Sandaracinaceae* (up to 10.8%) and *Woeseia* (up to 7.5%). Sulfate-reducing bacteria were important community components in the studied upper sediment layers, with uncultured groups SEEP-SRB1 (up to 7.0%) and Sva0081 (up to 5.9%) among the most abundant. In some samples, the genera *Sulfurovum* (up to 15.5%) and *Thiohalophilus* (up to 7.0%), involved in the oxidation of sulfur compounds, were important components of the community. Among the archaeal ASVs, the genus *Nitrosopumilus*, oxidizing ammonium to nitrite, exhibited the highest relative abundance (up to 6.9% of the total number of prokaryotes). Numerous sequences identified as the 16S rRNA gene fragments of chloroplasts were found in the samples, indicating that the rate of organic matter delivery to the upper sediment layers exceeded the rate of its degradation.

Keywords: microbial communities, biodiversity, 16S rRNA gene, bottom sediments, Kandalaksha Gulf, White Sea, arctic seas

СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КАК ИНДИКАТОР
СОСТОЯНИЯ ВОДОЕМОВ, РАСПОЛОЖЕННЫХ НА МОРСКОМ
ПОБЕРЕЖЬЕ (НА ПРИМЕРЕ ЗАЛИВА КАНДА,
КАНДАЛАКШСКИЙ ЗАЛИВ БЕЛОГО МОРЯ)© 2023 г. А. С. Саввичев^a, *, Н. А. Демиденко^c, В. В. Кадников^b,
В. В. Беленкова^a, И. И. Русанов^a, В. М. Горленко^a^a Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия^b Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия^c Институт океанологии им. П.П. Шишова РАН, Москва, 117997 Россия

*e-mail: savvichev@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2023 г.

После доработки 05.07.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Залив (губа) Канда относится к водоемам, образовавшимся в результате строительства железнодорожной дамбы (1916 г.) и последовавшей изоляции морской лагуны от основного бассейна Канда-лакшского залива Белого моря. В результате сокращения влияния приливо-отливных течений, перемешивающих водную толщу морской лагуны, изменился гидрологический режим водоема. Сокращение водообмена привело к появлению придонных застойных вод, лишенных кислорода, а также сероводородного заражения. При этом в южной части акватории залива Канда сохранилось пресное озеро. В различных акваториях залива Канда проведены исследования состава микробного сообщества придонного водного слоя. Показано, что в придонной воде залива Канда меняется кислородный режим, возрастает концентрация сероводорода и метана, активизируются процессы сульфатредукции и метаноокисления. Заметно меняется состав микробного сообщества, уменьшается численность истинно морских и пресноводных микроорганизмов, развиваются бактерии и археи, доминирующие в микробных сообществах аноксигенных вод меромиктических водоемов. Среди общего разнообразия микроорганизмов выявлены индикаторные виды, увеличивающие свое обилие. К таким видам относятся археи из родов *Methanoregula* и *Methanosaeta* (филум *Halobacterota*). Индикаторами застойных морских вод оказались микроорганизмы цикла серы. Это аноксигенные фототрофные бактерии класса *Chlorobia* (*Chlorobium phaeovibrioides*, *Pelodictyon phaeoclathratiforme*), это *Chloroflexi* рода *Chloronema*, несерные пурпурные бактерии, близкие к роду *Rhodoferrax*, бесцветные серные бактерии семейства *Beggiatoaceae*, а также тионовые бактерии рода *Thiobacillus*. Археи рода *Nitrosopumilus* (филум *Crenarchaeota*), а также бактерии рода *Woeseia* могут считаться “анти-индикаторными” микроорганизмами, поскольку они обнаруживаются только в водах открытого моря. Мы полагаем, что при устойчивом обмене вод через морскую дамбу состав микробного сообщества вод залива Канда не будет существенно меняться и будет подвержен только сезонным и межгодовым колебаниям. При негативном развитии событий можно дать прогноз превращения залива Канда в стратифицированный водоем с аноксигенным придонным водным слоем и сообществом микроорганизмов, сходным с меромиктическими водоемами.

Ключевые слова: микробные сообщества, микробные процессы, губа Канда, меромиктические водоемы, водообмен, гидрологический режим, стратификация, сероводородное заражение

DOI: 10.31857/S0026365623600323, **EDN:** VTBBKB

Освоение морского побережья вследствие строительства насыпей, дамб, плотин, приливных электростанций и т.д. неизбежно приводит к изоляции заливов. Изолированным водоемом является залив Канда. Залив Канда — это искусственный водоем, поскольку с 1916 г. акватория со сложной береговой линией была отделена от Кандалакшского залива Белого моря дамбой, возведенной при

строительстве железной дороги (Семенов, 1988). В залив впадает река Канда и множество ручьев. Участок железной дороги, пересекающий залив Канда, строился с сентября 1915 по ноябрь 1916 г. На морском мелководье была возведена фильтрационная дамба. В основу конструкции закладывались крупные валуны, далее по мере наращивания дамбы использовались более мелкие валуны

и камни. В результате вода в приливы и отливы могла проходить сквозь тело дамбы. Для прохода мелких судов и рыбы была оставлена протока, через которую был построен однопролетный мост. Во время Второй мировой войны – в 1942 г., протока, соединяющая губу с морем, была засыпана. Это было связано с тем, что немецкая авиация в первую очередь бомбила мосты. В результате связь водных масс залива Канда с морем стала слабой, только при фильтрации через тело плотины. В 1972 г. в теле дамбы был построен рыбоход – водопропускное сооружение. Водообмен с морем немного увеличился, и в водоем снова смогли заходить морские и проходные рыбы. Антропогенные преобразования новообразованного водоема отразились на изменении гидрологического и гидрохимического режимов. По данным института СеврыбНИИпроект (г. Петрозаводск) в 1981–1982 гг. в заливе Канда существовала выраженная стратификация вод с пресным поверхностным слоем и заполненными солоноватой водой глубоководными застойными зонами со значительной концентрацией растворенного сероводорода (Иванов и соавт., 1983). Фильтрующая железнодорожная дамба находится в 700 м от границ водно-болотного угодья международного значения “Кандалакшский залив” и границ Кандалакшского заповедника. В связи с этим необходим регулярный мониторинг за изменениями, происходящими в заливе Канда.

Состав микробных сообществ водной толщи и донных осадков как пресных, так и связанных с морем водоемов зависит от гидрологического режима этих водоемов. Регулярное перемешивание водной толщи за счет ветровых, приливо-отливных, сезонных процессов приводит к притоку кислородсодержащих вод и, как следствие, формированию кислородзависимого микробного сообщества. Напротив, сокращение водообмена приводит к исчерпанию кислорода и появлению аноксичных зон, в которых значительно меняется состав микробных сообществ. Установлено, что если до верхней границы аноксичной зоны водной толщи достигает свет, то в составе микробного сообщества преобладают аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ). В отсутствие света активизируется процесс микробного хемосинтеза (Горленко, 1974; Van Gemerden, Mas, 1995; Overmann, 1997; Rogozin et al., 2009; Gulati et al., 2017). Также известно, что микробное сообщество аноксичных вод коренным образом отличается от микробного сообщества кислородсодержащей водной толщи (Pjevac et al., 2015; Tassi et al., 2018).

Практическая значимость исследования микробных сообществ и микробных процессов в водоемах, отделенных от основного морского бассейна, связана, прежде всего, с необходимостью прогноза негативных последствий сероводородного заражения в искусственно замкнутых мор-

ских акваториях, а также с нарастающей актуальностью прогноза реакции морских экосистем на появление придонной аноксичной зоны – мирового тренда, наблюдаемого по всему Мировому океану (Velinsky, Fogel, 1999; Middelburg, Levin, 2009; Zhang et al., 2010; Savvichev et al., 2017). На примере губы Канда предлагается показать, как меняется состав микробных сообществ и в целом вся экосистема морского залива при его частичной или полной изоляции от моря.

Целью настоящего исследования было получение данных о гидрохимическом состоянии, составе микробных сообществ придонной воды, интенсивности микробных процессов циклов углерода и серы в разных акваториях залива Канда и сравнению состава сообществ с микробными сообществами открытой части Белого моря, примыкающей к заливу Канда и к пресному озеру бассейна залива Канда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика объекта исследования. Залив (губа) Канда расположен в западной части Кандалакшского залива Белого моря, имеет длинную, извилистую форму. Акватории залива Канда различаются по гидрологическому режиму и имеют разную соленость. Залив Канда относится к внутренним морским водам Российской Федерации.

Основная идея и схема проведения исследований. Для проведения исследований было выбрано 5 станций, расположенных в различных акваториях Кандалакшского залива. Две станции отражают ситуацию до искусственной изоляции залива Канда. Это пресная часть залива (St. 5), находящаяся выше зоны смешивания речных и морских вод, а также морская акватория Кандалакшского залива (St. 7), находящаяся вне залива Канда. Еще одна станция взята вне залива Канда (St. 8). Это мезомиктическое озеро Трехцветное, которое, благодаря естественным процессам поднятия суши, уже как 200 лет отделилось от морского залива (Krasnova et al., 2015). В озере Трехцветное произошли процессы формирования глубоко аноксичного водного слоя. Ситуация в водной толще этого водоема является негативным прогнозом полной изоляции залива Канда. И, наконец, две станции (St. 4 и St. 6) располагаются непосредственно в изолированной части залива Канда и в разной степени испытывают влияние морских вод, втекающих в залив во время приливов (рис. 1). В придонном водном слое на каждой станции имеется уникальное микробное сообщество, приспособленное к соответствующим условиям обитания.

В статье представлены данные, полученные при исследовании материала, отобранного исключительно в зимний сезон. Весной и летом для полярных водоемов характерны сезонные изме-

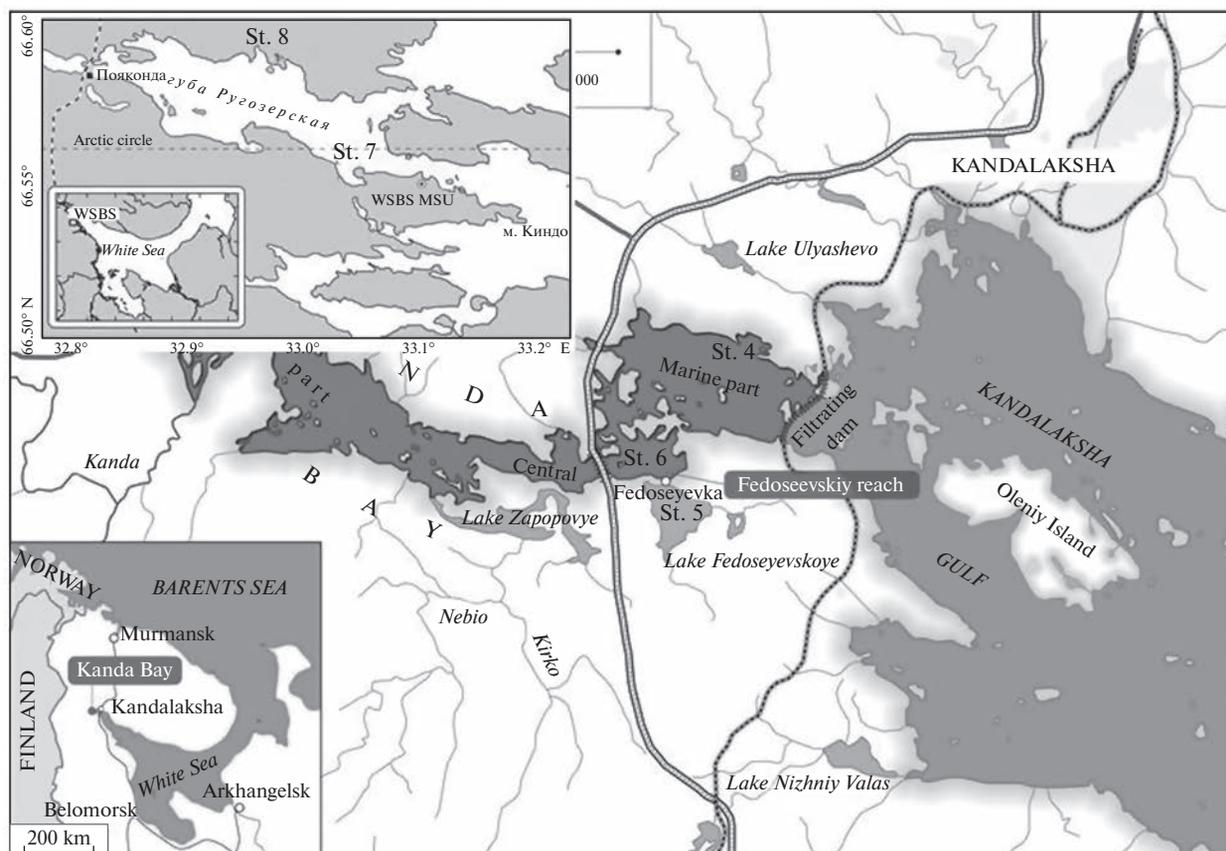


Рис. 1. Карта-схема губы Канда и прилегающей акватории Кандалакшского залива. Обозначения станций отбора проб: St. 4 – залив Канда “проточная”; St. 5 – “пресная”, оз. Федосеевское; St. 6 – залив Канда “сероводородная”, St. 7 – “морская”, Кандалакшский залив; St. 8 – “меромиктическая” оз. Трехцветное.

нения гидрологического режима, определяющего периоды интенсивного развития (“цветения”) фитопланктона. В свою очередь, цветение фитопланктона является мощным фактором, влияющим на состав микробного сообщества всей водной толщи. Таким образом, весной и летом микробное сообщество полярных водоемов изменчиво и нестабильно. Зимой, под слоем льда, активность фотосинтеза крайне низкая, и микробное сообщество придонного водного слоя и поверхностного слоя осадка развивается за счет органических веществ, синтезированных в течение летнего сезона. Длительная зимняя пауза фотосинтеза является причиной достаточно стабильного состояния микробного сообщества придонной воды и поверхностного осадка.

Отбор проб придонной воды в заливе Канда, Кандалакшском заливе и оз. Трехцветное проводили зимой 2015–2023 гг. Пробы отбирали через пробуренные во льду лунки. Температуру и содержание растворенного кислорода измеряли с помощью портативного электротермометра и оксиметра WTW© 340iA HANNA HI8314F (“Wen-soket”, RI, США). Общую соленость определяли с

помощью кондуктометра HANNA HI8733 (“Wen-soket”, RI, США). Пробы воды отбирали лимнологическим 1-литровым батометром, закрепленным на калиброванном тросе. Содержание метана в пробах определяли по методике фазово-равновесной дегазации. Концентрацию метана в газовой “head-space” фазе измеряли на газовом хроматографе Kristall-2000-M (“Хроматэк”, Россия), снабженном пламенно-ионизационным детектором. Для определения содержания сероводорода пробу воды при отборе фиксировали ацетатом цинка, и в фиксированных образцах сероводород определяли с использованием N,N-диметил-*n*-фенилендиамина. Для учета общей численности микроорганизмов (ОЧМ = microbial abundance; МА) пробы воды фиксировали раствором глутаральдегида, конечная концентрация которого в пробе составляла 2%. Фиксированные пробы фильтровали на черные поликарбонатные фильтры (“Миллипор”) с диаметром пор 0.2 мкм и окрашивали раствором акридинового оранжевого. Препараты просматривали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (“Carl Zeiss”, Германия) с системой визуализации Image

Scope Color (M) при увеличении $\times 1000$. Биомасса микроорганизмов (BM, мкг л⁻¹; влажный вес) была рассчитана исходя из объема клеток (кокков, палочек и нитей) и плотности клеток (1.0 мг мм⁻³). При проведении микроскопического учета одиночные клетки и клетки, собранные в агрегаты, учитывали отдельно. Агрегатом считалась группа клеток с общим очертанием, в которой зрительный пересчет отдельных клеток был затруднен или невозможен.

Интенсивности микробных процессов: темновой ассимиляции углекислоты (DCA), сульфатредукции (SR), автотрофного (гидрогенотрофного) образования метана (MGh) и окисления метана (MO) определяли радиоизотопным методом с использованием меченых соединений – NaH¹⁴CO₃, ¹⁴CH₄ и Na₂³⁵SO₄ (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006; Savvichev et al., 2021). Радиоактивности (¹⁴C и ³⁵S) продуктов микробных процессов измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике TRI-Carb TR2400 (“Packard”, США). Для расчетов интенсивности микробных процессов DCA, MGh, MO и SR использовали среднюю величину, полученную из двух повторностей для каждого образца.

Выделение метагеномной ДНК, ПЦР-амплификация и высокопроизводительное секвенирование фрагментов генов 16S рРНК. Свежеотобранные образцы воды (объемом 100–400 мл) пропускали через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтр гомогенизировали, растирая с жидким азотом, препарат метагеномной ДНК выделяли с помощью Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO Laboratories Inc.”, Carlsbad, США). Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦР с использованием праймеров PRK341F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') и PRK806R (5'-GGACTAGYVGGGTATCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР-фрагменты были баркодированы с помощью Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США) и очищены с использованием Agencourt AMPure beads (“Beckman Coulter”, Brea, CA, США). Концентрация полученных ПЦР продуктов была определена с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”). Затем ПЦР-фрагменты были смешаны в эквимольных количествах и секвенированы на Illumina MiSeq (2 \times 300 нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Полученные последовательности были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные чтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации. Таксономическая идентификация OTU была выполнена

по базе SILVA v.138 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016). Полученные последовательности были депонированы в базе данных NCBI Sequence Read Archive (SRA) в рамках проекта PRJNA986318.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химическая характеристика исследуемых образцов. Все 5 образцов придонной воды были отобраны в акваториях со сходной глубиной (7–17 м; табл. 1). Водные образцы содержали минимальное количество взвеси поверхностного осадка. Количество этой взвеси зависело от типа осадка. Донные осадки в местах отбора придонной воды различались по цвету и консистенции. Осадок St. 7 включал фракции алевролита и мелкого песка, на St. 5 поверхностный осадок состоял из рыхлых черных хлопьев, на St. 6 и St. 8 в составе осадка преобладал черный сероводородный вязкий пелит.

Поскольку отбор всех образцов проводили в зимнее время с поверхности льда, температура поверхностного слоя воды была около 0°C. Придонная вода имела разную температуру, от 1.0°C в открытой части Кандалакшского залива до 4.8°C в Федосеевском плесе и до 5.1°C в меромиктическом озере Трехцветное (табл. 1). Соленость воды также различалась, от 0.3‰ в пресном озере Федосеевское до типичной “беломорской” воды Кандалакшского залива (24.0‰). Придонная вода на St. 4 и St. 7 содержала растворенный кислород и имела положительные значения окислительно-восстановительного потенциала. В пресной придонной воде St. 5 кислород отсутствовал, содержание сероводорода было низким (не более 25 мкмоль), значение Eh (мВ) было близким к нулю. Придонная вода на St. 6 и St. 8 была восстановленной и содержала сероводород в концентрации 1.95 и 13.25 ммоль соответственно. Содержание растворенного метана в воде “морской” St. 7 было крайне низким (60–240 нмоль) и типичным для Беломорских вод (Саввичев и соавт., 2008). В придонной воде St. 4 залива Канда содержание метана увеличивалось до 2.4–5.8 мкмоль, а в сероводородной воде St. 6 и St. 8 содержание метана достигало 0.38–0.82 ммоль. Таким образом, содержание метана в пяти исследованных водных образцах различалось в 14000 раз. Изотопный состав углерода метана ($\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$) из придонного водного горизонта St. 6 = –79.2‰, что свидетельствует о его современном микробном генезисе.

Интенсивность микробных процессов в придонной воде пяти станций залива Канда. Во время подледной съемки активность фотосинтеза регистрировали только в узком подледном водном слое (до 1.5 мкмоль С л⁻¹ сут⁻¹). Достоверных значений активности фотосинтеза в нижележащих

Таблица 1. Основные физико-химические и биогеохимические характеристики образцов придонной воды пяти станций залива Канда и Кандалакшского залива

Станция	St. 4 “Проточная” (морское русло залива Канда)	St. 5 “Пресная” (Федосеевское озеро залива Канда)	St. 6 “Сероводородная” (Федосеевский плес залива Канда)	St. 7 “Морская” (Ермолинская губа Кандалакшского залива)	St. 8* “Аноксидная” (меромиктическое оз. Трехцветное)
Координаты	67°07'50" N 32°12'02" E	67°05'53" N 32°10'32" E	67°06'24" N 32°10'32" E	66°33'28" N 33°02'25" E	66°35'31" N 32°58'40" E
Глубина, м	14	17	14	10	7
Образец	Вода с серым алевриговым осадком	Вода с черным хлопьевидным осадком	Вода с черным сероводородным осадком	Вода со следами серого песка и алеврита	Вода с черным сероводородным осадком
T, °C придонная	2.5	2.4	4.8	1.0	5.1
Соленость, ‰	19	0.3	17	24	21.9
Еh, мВ	40	-10...+10	-295	220	-330
O ₂ , ммоль л ⁻¹	0.15	0	0	0.36	0
H ₂ S, ммоль л ⁻¹	0	до 0.025	1.1-1.95	0	7.5-13.25
CH ₄ , мкмоль л ⁻¹	2.4-5.8	82-106	300-380	0.06-0.24	600-820
MgH, мкмоль л ⁻¹ сут ⁻¹	0.8-1.0 × 10 ⁻³	0.035	0.06	0.1 × 10 ⁻³	0.11
DCA, мкмоль л ⁻¹ сут ⁻¹	0.11-0.41	1.3-2.5	8-14	0.01-0.03	28-38
SR, мкмоль S л ⁻¹ сут ⁻¹	1.2-3.5 × 10 ⁻³	1.5 × 10 ⁻³	до 3.0	0.2-0.5 × 10 ⁻³	16.8
MO, мкмоль л ⁻¹ сут ⁻¹	30-52 × 10 ⁻³	0.35-0.4	1.2-2.0	0.8-2.3 × 10 ⁻³	4.2-6.8
ОЧМ = MA, млн кл. мл ⁻¹ /B, мкг л ⁻¹	0.48/86	8.5/1520	4.0/616	0.22/46	22/4300*

* Savichev et al., 2018.

Таблица 2. Альфа-разнообразие в образцах придонной воды со станций 7, 5, 8, 4, 6 в акватории залива Канда и прилегающих морских и пресных водоемах

Образец	Archaea OTU %	Bacteria OTU %	Chao1	Shannon_e
St. 7. “Морская”	24.12	75.79	495.2	4.38
St. 5. “Пресная”	22.67	74.35	1095.3	5.78
St. 8. “Сероводородная вода” Из меромиктического озера	27.42	71.35	770.5	5.30
St. 4. Бухта Канда “Насыщенная кислородом вода”	34.53	62.95	972.4	5.49
St. 6. Бухта Канда “Сероводородная вода”	29.90	68.8	905.8	5.44

водных горизонтах при подледной съемке получено не было. Темновая ассимиляция углекислоты (ТАУ) является суммарным показателем, включающим как интенсивность гетеротрофного карбоксилирования, так и автотрофного потребления CO_2 при хемосинтезе. Низкая микробная активность ТАУ была отмечена в придонной воде “морской” станции (10–30 нмоль л^{-1} сут $^{-1}$). В воде залива Канда St. 4 активность ТАУ была заметно выше (110–410 нмоль л^{-1} сут $^{-1}$). Высокая активность ТАУ обнаружена в придонной воде “пресной” St. 5 (1.3–2.5 мкмоль л^{-1} сут $^{-1}$), а также в сероводородсодержащих образцах St. 6 и St. 8 (8–14 и 28–38 мкмоль л^{-1} сут $^{-1}$). Активность автотрофного (гидрогенотрофного) метаногенеза (MGh) в придонной воде на “морской” и “проточной” станциях была низкой и соответствовала пределу чувствительности используемого метода (0.1–1.0 нмоль CH_4 л^{-1} сут $^{-1}$). Заметно выше активность MGh была в пресном придонном водном слое St. 5 (ср. 35 нмоль CH_4 л^{-1} сут $^{-1}$). Наиболее высокая активность MGh показана в образцах St. 6 и 8 (60 и 110 нмоль CH_4 л^{-1} сут $^{-1}$ соответственно). Интенсивность окисления метана (МО) повторяла тенденцию содержания метана (от 0.8 нмоль CH_4 л^{-1} сут $^{-1}$ на St. 7 до 2.0 и 6.8 мкмоль л^{-1} сут $^{-1}$ на St. 6 и 8). Активность сульфатредукции (SR) была минимальной (на пределе чувствительности метода) в придонной воде St. 7 (0.2–0.5 нмоль S^{2-} л^{-1} сут $^{-1}$), низкой на St. 4 (1.2–3.5 нмоль S^{2-} л^{-1} сут $^{-1}$) и необычно высокой (для пресных вод) активностью (4.5 нмоль S л^{-1} сут $^{-1}$) в воде St. 5 с низким содержанием сульфат-иона 0.18 мкмоль. Высокая активность SR была, что было ожидаемо, в придонных водах St. 6 и St. 8 (3 и 16.8 мкмоль S л^{-1} сут $^{-1}$).

Общая численность (ОЧМ = МА) и биомасса микроорганизмов (В). Микроскопирование окрашенных препаратов на мембранных фильтрах пяти образцов придонной воды показало, что в воде St. 7 величина МА (microbial abundance) соответствовала значениям, обычным для Кандалакшского залива (ср. 220 тыс. кл. мл^{-1}). В воде на St. 4 залива Канда величина МА была несколько выше

(ср. 480 тыс. кл. мл^{-1}). Заметно выше численность бактерий в сероводородной воде St. 6 залива Канда (до 4 млн кл. мл^{-1}) и пресной воде St. 5 (8.5 млн кл. мл^{-1}). Наиболее высокая величина МА соответствовала St. 8 (22 млн кл. мл^{-1}).

Результаты высокопроизводительного секвенирования. В придонной воде пяти станций залива Канда и Кандалакшского залива методом высокопроизводительного секвенирования фрагмента гена 16S рРНК был исследован таксономический состав микроорганизмов придонного водного слоя. Общее число идентифицированных фрагментов 16S rRNA, использованных для идентификации микробных сообществ, составило 132457. В результате проведенной кластеризации идентифицированы 1971 бактериальных и 871 архейных OTU с 97% идентичностью. Археи составили от 22.67 до 34.53% от всех 16S rRNA сиквенсов (табл. 2). Они были представлены 9 филумами, которые были определены с помощью программы SILVA и GTDB базы данных: *Aenigmarchaeota*, *Asgardarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Halobacteriota*, *Iainarchaeota*, *Micrarchaeota*, *Nanoarchaeota* и *Thermoplasmata*. Бактерии были представлены 21 филумом: *Acetothermia*, *Acidobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Caldatibacteriota*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Desulfobacterota*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadota*, *Latescibacterota*, *Myxococcota*, *Nitrospirota*, *Patescibacteria*, *Planctomycetota*, *Proteobacteria*, SAR324_clade (Marine_group_B), *Spirochaetota*, *Thermotogota*, *Verrucomicrobiota*, *Zixibacteria*.

Индекс Chao1 показывает, что самое низкое видовое богатство приходится на микробное сообщество олиготрофных морских вод St. 7, а наиболее высокое – на микробное сообщество мезотрофных пресных вод St. 5. Видовое богатство придонных вод залива Канда (St. 4 и St. 6) ближе к высокому. Индекс видового разнообразия Shannon_e оказался достаточно ровным, при этом самым низким для сообщества вод “морской” станции и наиболее высоким для вод “пресного” залива. Видовое разнообразие вод залива Канда высокое, близкое к максимальному среди полученных.

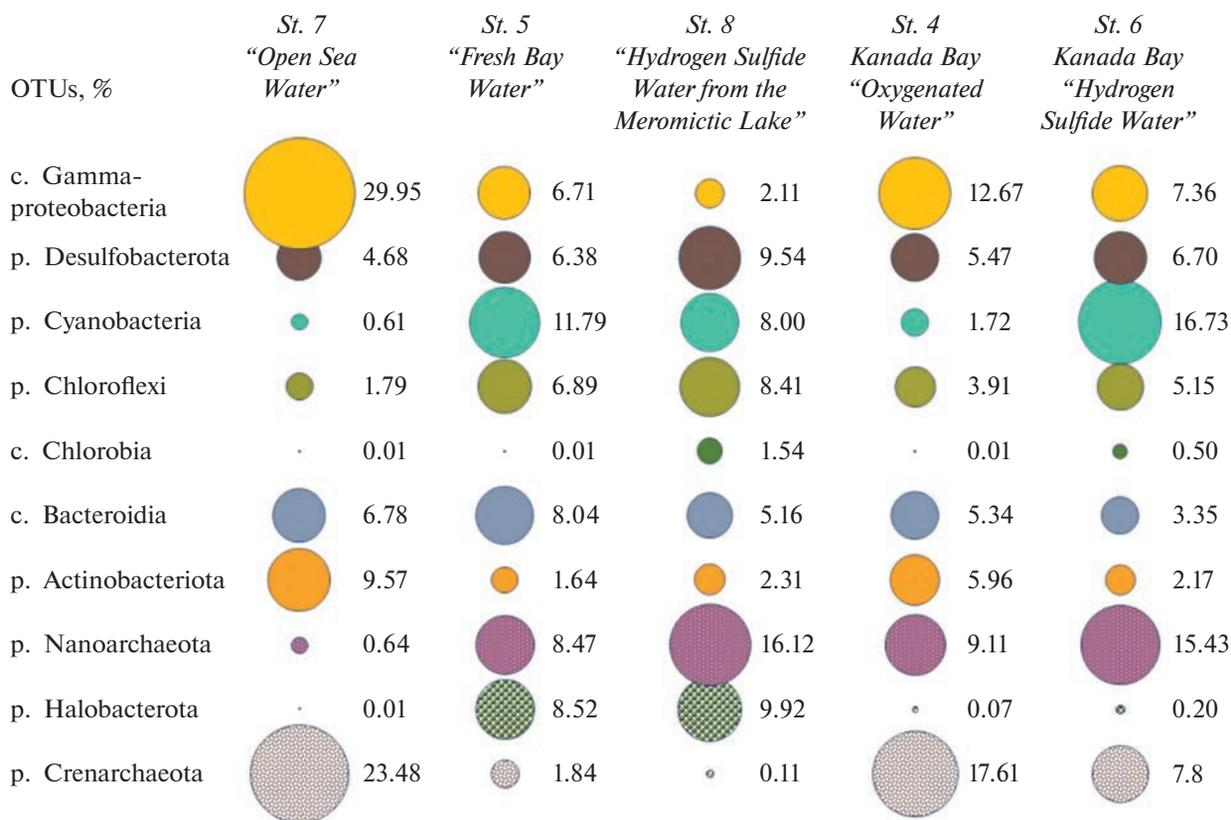


Рис. 2. Доля основных таксономических групп архей и бактерий в составе микробного сообщества в пяти образцах придонной воды залива Канда и прилегающих акваториях Кандалакшского залива. Обозначения станций – как на рис. 1.

Из 9 архейных и 21 бактериальных филумов было выбрано 10 таксонов, составляющих по долям OTU более 80% от всего микробного сообщества (рис. 2). 7 выбранных таксонов относятся к филумам, а 3 таксона являются классами. У выбранных нами таксонов наиболее велика разница между исследованными образцами в долях OTU. Поэтому выбранные таксоны могут считаться индикаторными.

Таксономический состав сообщества архей. Микробные сообщества придонной воды исследуемых водоемов, как это и следовало из физико-химических условий среды обитания, значительно отличались друг от друга (рис. 2). В насыщенной кислородом и предельно охлажденной морской воде St. 7 в сообществе архей явно доминировали некультивируемые археи рода *Nitrosopumilus*, OTU 23.48% (филум *Crenarchaeota*). Археи рода *Nitrosopumilus* – облигатные аэробы, способные к окислению аммония, содержащегося в морской воде в предельно низких концентрациях. Предполагается, что они способны к автотрофному росту. Представители этого рода распространены как в фотической зоне морей, так и поверхностной части донных отложений в морях всех регионов мира (Könneke et al., 2005; Park et al., 2012; Qin et al.,

2017). В пресных (St. 5) и особенно в сероводородсодержащих (St. 8) водах археи *Nitrosopumilus* были представлены в минимальных долях. Присутствие и обилие *Nitrosopumilus* в образце из залива Канда явно указывает на близость St. 4 к открытой части моря. Заметное уменьшение *Nitrosopumilus* в образце St. 6 указывает на ее близость к аноксийным застойным водам.

В пресных (St. 5) и сероводородсодержащих (St. 8) водах встречены археи из родов *Methanoregula* и *Methanosaeta* (филум *Halobacterota*). Наиболее известный вид *Methanoregula boonei* выделен из пресного болота, основой его метаболизма является гидрогенотрофный метангенез (Bräuer et al., 2011). Археи рода *Methanosaeta* являются умеренно галотолерантными, широко распространены в морских водоемах и в процессе метаногенеза используют ацетат. Ацетокластический метаноген *Methanosaeta pelagica* был выделен из приливно-отливной полосы Токийского залива (Mori et al., 2012). В воде открытого моря (St. 7), а также в воде St. 4 из залива Канда метаногенные археи найдены в следовых количествах. В образце St. 6 метаногенных архей было чуть больше (OTU 0.2%).

В лишенной кислорода воде пресного залива (St. 5) найдены некультивируемые археи рода *Woeseearchaealis* (OTU 8.47%). В сероводородных водах (St. 8) их обилие достигало 16.12%. Некультивируемые археи рода *Woeseearchaealis* (филум *Nanoarchaeota*) обитают в пресных и слабоминерализованных водоемах мезотрофного и евтрофного типа. Они являются гетеротрофами и предпочитают микроаэрофильные условия (Liu et al., 2018). В морской воде St. 7 археи филума *Nanoarchaeota* встречаются в минимальном количестве (OTU 0.64%). Археи рода *Woeseearchaealis* были найдены в образце St. 4 залива Канда (OTU 9.11%). Придонная вода на St. 4 испытывает дефицит растворенного кислорода (0.15 ммоль; табл. 1), что способствует развитию микроаэрофильных архей. В исследуемых водах залива Канда (St. 6) их обилие достигало 15.43%, что указывает на близость микробного сообщества St. 6 с сообществом сероводородных вод St. 8.

Необходимо отметить, что доля архей в микробном сообществе распределялась следующим образом: (OTU %) 24.12 (“Морская”) – 22.67 (“Пресная”) – 27.42 (“Сероводородная”) – 34.53 (“Канда St. 4”) – 28.4 (“Канда St. 6”). Близкие численные показатели долевого содержания суммы архей в микробных сообществах исследованных нами разнообразных водных местообитаниях свидетельствуют о ненадежности использования такого интегрального индикационного инструмента.

Таксономический состав сообщества бактерий. Бактерии отряда *Actinomariales* (филум *Actinobacteriota*) являются космополитами морских вод. Эти бактерии имеют ультрамалые размеры, а также способность к фотогетеротрофному метаболизму (Ghai et al., 2013). В наших образцах бактерии *Actinomariales* встречаются в морской воде станций St. 7 и St. 4 залива Канда (OTU 9.57 и 5.96%). В пресной и сероводородной воде, а также в воде St. 6 залива Кан их было заметно меньше.

Бактерии класса *Bacteroidia* во всех исследованных водных образцах найдены в близких долях (OTU 5.16% в сероводородных водах и OTU 8.04% в пресных водах). Известно, что бактерии этого класса широко распространены в самых разных местах обитания, от морских и пресных вод и почвы до желудочно-кишечного тракта и экскрементов животных. Вероятно, наличие бактерий класса *Bacteroidia* является наименее значимым показателем для диагностики микробных сообществ прибрежных морских водоемов.

Наличие бактерий класса *Chlorobia* (зеленые серные бактерии) четко и надежно указывают на наличие процессов аноксигенного фотосинтеза, протекающих с потребления сероводорода. В наших образцах *Chlorobia* были найдены (в очень малом количестве) в образцах St. 8 и St. 6. В лет-

нее время аноксигенные фототрофные бактерии населяют зону хемоклина водной толщи стратифицированных водоемов и осуществляют активный фотосинтез. В зимний сезон в покрытых льдом водоемах при отсутствии света в слое хемоклина *Chlorobia* оседают в придонный водный слой и на поверхность осадка.

В воде “морской” St. 7, а также “пресной” St. 5 найдены аэробные (микроаэрофильные) сероокисляющие бактерии родов *Sulfurimonas* и *Sulfurovum*, филум *Campilobacterota*. Представители рода *Sulfurimonas* – типичные градиентные морские бактерии, микроаэрофилы. Они способны окислять элементарную серу, сульфид, другие восстановленные соединения серы в процессе кислородного, а некоторые виды в процессе нитратного дыхания (Han, Pernger, 2015). Известные культивируемые представители рода *Sulfurovum* являются хемолитавтотрофными бактериями, окисляющими серу и тиосульфат и использующими кислород, а также нитрат в качестве акцептора электрона (Mori et al., 2018). Большинство представителей этого рода найдены в образцах воды и осадков, отобранных из морских гидротермальных источников. Однако бактерии рода *Sulfurovum* найдены также и в воде и осадках Арктических морей (Sun et al., 2020). Незначительные количества бактерий этих родов обнаружены в образцах залива Канда St. 8 и St. 6.

Бактерии рода *Chloroflexi* найдены в составе микробных сообществ водных образцов с дефицитом кислорода или его отсутствием (St. 5 OTU 6.89%, St. 8 OTU 8.41%). В морской воде этих бактерий было заметно меньше (St. 7 OTU 1.79%). Большая часть *Chloroflexi* была представлена гетеротрофными некультивируемыми бактериями из класса *Anaerolineae*, род SBR1031. Принято считать, что эти бактерии являются анаэробными синтрофами, мутуалистически связанными с метаногенными археями (Narihito et al., 2012). Доля этих малоизученных бактерий в составе микробного сообщества St. 4 была невелика (OTU 3.91%), но весьма значительна в составе микробного сообщества St. 6 (OTU 10.5%). Примечательно, что в образцах St. 8 и St. 6 (следовые количества) найдены *Chloroflexi* рода *Chloronema*. Это крупные, нитчатые зеленые серные бактерии с газовыми вакуолями, осуществляющие аноксигенный фотосинтез и ведущие, как правило, бентосный образ жизни (Dubinina, Gorlenko, 1975). Эти хорошо морфологически различимые бактерии могут служить хорошим маркером микробных сообществ с развитым циклом серы. В то же время отметим, что *Chloronema* sp. ранее находили только в пресных стратифицированных водоемах (Gich et al., 2001).

Цианобактерии обитают в фотической зоне пресных и морских водоемов, где существуют за счет оксигенного фотосинтеза. Придонный слой водоемов (если до него не доходит свет) является

исключительно местом накопления, но не обитания цианобактерий. Обилие цианобактерий является показателем продуктивности фотической зоны водоемов и зависит, в первую очередь, от содержания биогенных элементов. “Морская” St. 7 по показателю обилия цианобактерий (OTU 0.61%) оказалась явно олиготрофной, а “пресная” St. 5 (OTU 11.79%) и “сероводородная” St. 8 (OTU 8.0%) – евтрофными. В состав сообщества цианобактерий входили представители семейств *Nostocaceae*, *Cyanobiaceae*, *Synechococcaceae*. Исследуемые воды залива Канда (St. 4) были скорее олиготрофными, а St. 6 – явно евтрофными (OTU 16.73%).

Сульфатредуцирующие бактерии филума *Desulfobacterota* найдены во всех образцах, включая придонную воду пресного залива St. 5. Большинство представителей филума *Desulfobacterota* в образцах относились к классам *Desulfobacteria* и *Desulfobulbia*. В сероводородных водах St. 8 и пресной воде St. 5 преобладали некультивируемые сульфатредукторы рода *Desulfatiglans*. В придонной воде морской St. 7 найдены некультивируемые сульфатредукторы семейства *Desulfocapsaceae*, рода *Desulfosarcina*, а также *Desulfosarcinaceae*, g:SEEP-SRB1, образующие ассоциации с археями ANME-1 (Kleindienst et al., 2012). Бактерии филума *Desulfobacterota* продуцируют сероводород за счет восстановления элементной серы, сульфита, а также диспропорционирования тиосульфата (Murphy et al., 2021). При этом бактерии не нуждаются в органических субстратах и развиваются как хемолитоавтотрофы. Некоторые бактерии филума *Thermodesulfobacteriota* вступают в синтрофные отношения с микроорганизмами, использующими сероводород. В исследуемых образцах губы Канда (St. 4 и St. 6) найдены все вышеуказанные таксоны сульфатредукторов, однако явно доминирующих родов среди них не было.

В образце морской воды St. 7 в составе класса *Alphaproteobacteria* найдены некультивируемые бактерии семейства *Hypomicrobiaceae*, большинство которых являются олиготрофами. В придонной воде пресного залива (St. 5) найдены нитчатые бесцветные серные бактерии семейства *Beggiatoaceae*. Бактерии этой группы не склонны к планктонному способу жизни. Наиболее вероятно, что эти крупные бактерии находились на поверхности мелких частиц поверхностного слоя донного осадка. находка бактерий семейства *Beggiatoaceae* указывает на наличие активных микробных процессов цикла серы, протекающих в отсутствие света (Salman et al., 2013).

Обилие бактерий класса *Gammaproteobacteria* в исследуемых образцах оказалось наиболее ярким признаком, отличающим образец воды открытого моря (St. 7) от остальных образцов. Доля *Gammaproteobacteria* в этом образце составила 29.95%.

Наиболее многочисленными находками в образцах морской станции (St. 7) были представители рода *Woeseia* (класс *Gammaproteobacteria*). Вероятно, единственным культивируемым видом этого рода является *Woeseia oceani*, выделенным из приливо-отливной полосы Желтого моря (Du et al., 2016). Бактерии рода *Woeseia* являются морскими космополитами. Они найдены в водах и осадках прибрежных акваторий многих морей. При этом их трофическая роль остается малоизученной. В сероводородных водах St. 8 преобладали бактерии рода *Rhodoferrax* (сем. *Comamonadaceae*). *Rhodoferrax* относятся к несерным пурпурным бактериям, способны к аноксигенному фотосинтезу, но при этом могут развиваться и в отсутствие света. Помимо образца St. 8 *Rhodoferrax* найдены в сероводородных водах St. 6 залива Канда. В этих же образцах (St. 8, St. 6) в малых количествах найдены пурпурные серные бактерии семейства *Chromatiaceae* (генетически близкие к пресным и морским видам *Thiocapsa roseopersicina*, *Thiocapsa imhoffii*, *Thiodictyon bacillosum*). В образцах St. 5, St. 8, а также St. 4 и St. 6 залива Канда найдены бактерии наиболее близкие к роду *Thiobacillus*. Культивируемые представители этого рода являются классическими участниками окислительного звена цикла серы. В образцах St. 5, St. 6 и St. 8 найдены бактерии, близкие к классическим метанотрофам из родов *Methylocystis* и *Methylocapsa*. В образцах St. 5, St. 6 и St. 8 также найдены бактерии близкие к роду *Methylotenera*. Бактерии этого рода выделены из осадков пресных водоемов, а также почв и рисовых чеков. Культивируемые *Methylotenera* способны к росту на метиламине, как единственному источнику энергии, углерода и азота (Kalyuzhnaia et al., 2006). Крайне интересно, что в образце St. 7 “Морская” все найденные метанотрофы оказались близкими к бактериям рода *Methyloceanibacter*, обитающих в осадках северных морей и способных к окислению широкого спектра одноуглеродных соединений (Vekeman et al., 2016). Как и ожидалось, детектируемые метанотрофы пресной St. 5 оказались близки к нитчатых гамма-протеобактериям, родственными *Crenothrix* sp. По мнению ряда исследователей, это главные потребители метана в стратифицированных озерах (Osvold et al., 2017).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что по своим гидрологическим и гидрохимическим параметрам придонная вода акватории залива Канда, искусственно изолированного от основного морского бассейна, является смесью пресных (речных и озерных) и морских вод (табл. 1). Это доказывается, прежде всего, показателем солености. С другой стороны, придонная вода изолированного водоема приобретает свойства, отсут-

ствующие как в исходно пресных водах, так и в водах открытого моря. Это дефицит кислорода (St. 4), а также наличие сероводорода (St. 6). Помимо этого, в придонных водах залива Канда меняется окислительно-восстановительная обстановка, и появляется растворенный метан. Объективным показателем является изменение показателей интенсивности ключевых микробных процессов. В придонной воде залива Канда интенсивность ассимиляции углекислоты, сульфатредукции, гидрогенотрофного метаногенеза и метаноокисления заметно выше, чем в открытом море (табл. 1). Все вышеназванные изменения гидрохимического и биогеохимического состояния придонных вод залива Канда указывают на приобретение новых качеств, присущих стратифицированным водоемам с аноксическим, сероводородсодержащим придонным слоем. Водоемы такого типа известны на побережье Белого моря (Краснова, 2021).

Аноксические зоны стратифицированных водоемов, как реликтовые экосистемы, на протяжении многих лет привлекали внимание микробиологов (Overmann, 1997; Garcia-Gil et al., 1999; Camacho et al., 2001; Gorlenko, Kuznezov, 1972; Gorlenko, 1978; Jørgensen et al., 1979; Savvichev et al., 2021). Стабильная аноксическая зона водной толщи существует в меромиктическом озере Могильное на острове Кильдин, Фрамварен фиорде в южной Норвегии, Черном море (Dyrssen et al., 1996; Иванов и соавт., 2001; Strelkov, 2014). Менее стабильная анаэробная обстановка характерна для глубоководных впадин Каспийского моря (Иванов и соавт., 2013). Многочисленные стратифицированные водоемы небольшого размера известны на побережье Кандалакшского залива Белого моря (marine-derived lakes). Они уникальны по происхождению, т.к. образуются путем отделения от моря из-за быстрого поднятия суши (около 40 см за последние столетия) (Krasnova et al., 2012). По мере отдаления от моря происходит ослабление промывного режима, что ведет к накоплению значительного количества осадков, активизации анаэробных микробных процессов, в первую очередь процесса сульфатредукции и, в конечном итоге, распространению сероводорода в толще мнимомимниона (Losyuk, Kokryatskaya, 2015). Сульфатредуцирующие бактерии не ограничивают перечень анаэробных микроорганизмов, участвующих в трансформации органических соединений. В анаэробных условиях образование метана обеспечивают метаногенные археи, участвующие, наряду с сульфатредуцирующими бактериями, в терминальной фазе разложения органического вещества (Иванов и соавт., 2012).

Проведенные исследования показали, что среди богатого микробного сообщества придонных вод прибрежных морских водоемов можно выделить микроорганизмы, являющиеся индикаторами изменений, приводящих к возникновению анок-

сических зон. Это археи из родов *Methanoregula* и *Methanosaeta* (филум *Halobacterota*). Археи рода *Nitrosopumilus* (филум *Crenarchaeota*) также могут считаться индикаторными (точнее анти-индикаторными) микроорганизмами, поскольку они обнаруживаются только в богатых кислородами водах открытого моря. Прекрасными индикаторами устойчивых морских вод оказались микроорганизмы участники цикла серы. Известно, что микроорганизмы цикла серы явно доминируют в хемоклине меромиктических водоемов. Биогеохимический смысл их деятельности получил название “сульфуреты”. В водах залива Канда их было мало, но их индикаторный потенциал очевиден, поскольку в воде открытого моря (St. 7) эти микроорганизмы отсутствовали. Это аноксигенные фототрофные бактерии класса *Chlorobia* (соленоводные *Chlorobium phaeovibrioides*, пресноводные *Pelodictyon phaeoclathratiforme*). Это *Chloroflexi* рода *Chloronema*, также существующие за счет аноксигенного фотосинтеза. Они найдены в малых количествах в образцах St. 8 и St. 6. Индикаторными организмами изолированных вод залива Канда оказались также несерные пурпурные бактерии, близкие к роду *Rhodospirillum rubrum*. Они также найдены в малых количествах в образцах St. 8 и St. 6. В группу индикаторных таксонов бактерий, окисляющих восстановленные соединения серы, попали нитчатые бесцветные серные бактерии семейства *Beggiatoaceae*, а также тионовые бактерии рода *Thiobacillus*. Оказалось, что бактерии восстановительного звена цикла серы имеют более слабый индикаторный потенциал. Сульфатредуцирующие бактерии филума *Desulfobacterota* найдены во всех исследуемых водоемах. В воде St. 6 и St. 8 доля бактерий филума *Desulfobacterota* была немного выше, чем в воде других водоемов. Вероятно, что наиболее эффективными анти-индикаторами оказались бактерии рода *Woeseia*. Они явно доминировали в воде St. 5 “Морская” и уступали свою лидирующую позицию в водах залива Канда.

Проведенные исследования показали, что по своим гидрологическим, гидрохимическим, биогеохимическим свойствам, а также по составу микробных сообществ, придонный водный слой акватории залива Канда заметно отличается от пресных вод Федосеевского озера и морских вод Кандалакшского залива. Микробные сообщества акватории залива Канда пополняются археями и бактериями, обитающими в меромиктических водоемах. В водах St. 4 изменения в составе микробного сообщества неявные, а в водах St. 6 они хорошо заметны. Можно предположить, что при позитивном развитии событий, а именно при устойчивом обмене вод через морскую дамбу, состав микробного сообщества придонных вод залива Канда не будет существенно меняться и, возможно, будет подвержен сезонным и межгодовым колебаниям. При негативном развитии событий можно

дать прогноз превращения залива Канда в стратифицированный водоем с устойчиво аноксийным придонным водным слоем и сообществом микроорганизмов, сходным с меромиктическими водоемами оз. Могильное, оз. Трехцветное, оз. Большие Хрусломены (Иванов и соавт., 2001; Lunina et al., 2005; Savvichev et al., 2018, 2021).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность Е.Д. Красновой, В.П. Шевченко, О.В. Калмацкой, А.Н. Харчевой, Н.М. Кокрятской, Г.Н. Лосюк, Д.А. Воронову, М.А. Летаровой, помогавших в разные годы и сезоны в проведении полевых исследований губы Канда.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского национального фонда (грант 23-24-00208; А.С. Саввичев, В.М. Горленко и В.В. Беленкова – полевые и лабораторные исследования 2023 года), а также в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (И.И. Русанов – радиоизотопные исследования).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горленко В.М. Окисление тиосульфата *Atoebobacter roseus* в темноте в микроаэрофильных условиях // Микробиология. 1974. Т. 43. С. 729–731.
- Иванов Н.О., Китаев В.П., Чеченков А.В // Сборник научных трудов / АН СССР, Зоол. Ин-т, Секция по Белому морю Ихтиол. Комиссия. Гл. ред. О.А. Скарлато. – Л.: ЗИН, 1983. С. 37–44.
- Иванов М.В., Русанов И.И., Пименов Н.В., Байрамов И.Т., Юсупов С.К., Саввичев А.С., Леин А.Ю., Сапожников В.В. Микробные процессы цикла углерода и серы в озере Могильном // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 675–686.
- Ivanov M.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Vairatov I.T., Yusupov S.K., Savvichev A.S., Lein A.Yu., Sapozhnikov V.V. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in Lake Mogil'noe // Microbiology (Moscow). 2001. V. 70. P. 583–593.
- Иванов М.В., Саввичев А.С., Ключиткин А.А., Чульцова А.Л., Захарова Е.Е., Русанов И.И., Леин А.Ю., Лисицын А.П. Возобновление сероводородного заражения глубоководных впадин Каспийского моря // ДАН. 2013. Т. 453. С. 76–81.
https://doi.org/10.7868/S0869565213230187
- Ivanov M.V., Savvichev A.S., Klyuvitkin A.A., Chul'tsova A.L., Zakharova E.E., Rusanov I.I., Lein A.Yu., Listsyn A.P. Resumption of hydrogen sulfide contamination of the water column of deep basins in the Caspian Sea // Doklady Earth Sci. 2013. V. 453. P. 1094–1099.
- Краснова Е.Д. Экология меромиктических озер России. 1. Прибрежные морские водоемы // Водные ресурсы. 2021. Т. 48. С. 322–333.
https://doi.org/10.31857/S0321059621030093
- Krasnova E.D. Ecology of meromictic lakes of Russia. Coastal marine waterbodies // Water Resour. 2021. V. 48. P. 427–438.
https://doi.org/10.1134/S009780782103009X
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Захарова Е.Е., Веслополова Е.Ф., Мицкевич И.Н., Кравчишина М.Д., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробные процессы циклов углерода и серы в Белом море // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 823–838.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Mitskevich I.N., Kravchishina M.D., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in the White Sea // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 734–750.
https://doi.org/10.1134/S002626170806012X
- Семенов В.Н. Систематика и экология морских бассейнов Севера на разных этапах изоляции. Апатиты: Изд-во ММБИ КФ АН СССР, 1988. 46 с.
- Bräuer S.L., Cadillo-Quiroz H., Ward R.J., Yavitt J.B., Zinder S.H. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 45–52.
https://doi.org/10.1099/ijs.0.021782–0
- Camacho A., Erez J., Chicote A., Florin M., Squires M.M., Lehmann C., Bahofen R. Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web // Aquat. Sci. 2001. V. 63. P. 91–106.
https://doi.org/10.1007/PL00001346
- Dubinina G.A., Gorlenko V.M. New filamentous photosynthetic green bacteria containing gas vacuoles // Microbiology (Moscow). 1975. V. 44. P. 511–517.
- Dyrssen D.W., Hall P.O.J., Haraldsson C., Chierici M., Skei J., Ostlund H.G. Time dependence of organic matter decay and mixing processes in Framvaren, a permanently anoxic fiord in south Norway // Aquatic Geochem. 1996. V. 2. P. 111–129.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461
- Garcia-Gil L.J., Vicente E., Camacho A., Borrego C.M., Vila X., Cristina X.P., Rodriguez-Gonzalez J. Vertical distribution of photosynthetic sulphur bacteria linked to saline gradients in Lake “El Tobar” (Cuenca, Spain) // Aquat. Microb. Ecol. 1999. V. 20. P. 299–303.
- Ghai R., Mizuno C.M., Picazo A., Camacho A., Rodriguez-Valera F. Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine *Actinobacteria* // Sci. Rep. 2013. V. 3. P. 1–8.
https://doi.org/10.1038/srep02471
- Gorlenko W.M., Kuznezov S.I. Über die photosynthesierenden Bakterien des Kononjer-Sees // Arch. Hydrobiol. 1972. V. 70. № 1. S. 1–13.
- Gorlenko V.M., Vainshtein M.B., Kachalkin V.I. Microbiological characteristic of Lake Mogilnoye // Arch. Hydrobiol. 1978. V. 81. P. 475–492.
- Gulati R.D., Zadereev T.S., Degermendzhi A.G. // Ecology of meromictic lakes / Eds. Gulati R.D., Zadereev T.S., Degermendzhi A.G. Springer International Publish, 2018.

- Ecol. Stud. V. 228. 405 p.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-49143-1>
- Han Y., Perner M. The globally widespread genus *Sulfurimonas*: versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 989.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00989>
- Jørgensen B.B., Kuenen J.G., Cohen Y. Microbial transformations of sulfur-compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai) // Limnol. Oceanogr. 1979. V. 24. P. 799–822.
- Kalyuzhnaya M.G., Bowerman S., Lara J.C., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. *Methylothermobacter mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family *Methylophilaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 2819–2823.
<https://doi.org/10.1099/ijse.0.64191-0>
- Kleindienst S., Ramette A., Amann R., Knittel K. Distribution and *in situ* abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 2689–2710.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02832.x>
- Könneke M., Bernhard A.E., De La Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // Nature. 2005. V. 437. P. 543–546.
<https://doi.org/10.1038/nature03911>
- Krasnova E.D., Kharcheva A.V., Milyutina I.A., Voronov D.A., Patsaeva S.V. Study of microbial communities in redox zone of meromictic lakes isolated from the White Sea using spectral and molecular methods // J. Marine Biol. Assoc. UK. 2015. V. 95. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1017/S0025315415000582>
- Liu X., Li M., Castelle C.J., Probst A.J., Zhou Z., Pan J., Liu Y., Banfield J.F., Gu J.D. Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread Woese archaeal lineages // Microbiome. 2018. V. 6. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0488-2>
- Losyuk G., Kokryatskaya N., Krasnova E. Formation of hydrogen sulfide in isolated basins at the Karelian of the White Sea coast // EARSeL eProc. 2015. V. 14. P. 49–54.
<https://doi.org/10.12760/02-2015-1-07>
- Lunina O.N., Gorlenko V.M., Solov'eva O.A., Akimov V.N., Rusanov I.I., Pimenov N.V. Seasonal changes in the structure of the anoxygenic phototrophic bacterial community in Lake Mogilnoe, a relict lake on Kil'din Island in the Barents Sea // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 588–596.
<https://doi.org/10.1007/s11021-005-0107-7>
- Magoc T., Salzberg S.L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Middelburg J.J., Levin L.A. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry // Biogeosciences. 2009. V. 6. P. 1273–1293.
<https://doi.org/10.5194/bg-6-1273-2009>
- Mori K., Iino T., Suzuki K., Yamaguchi K., Kamagata Y. Aceticlastic and NaCl-requiring methanogen “*Methanoseta pedagica*” sp. nov., isolated from marine tidal flat sediment // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 3416–3423.
<https://doi.org/10.1128/AEM.07484-11>
- Mori K., Yamaguchi K., Hanada S. *Sulfurovum denitrificans* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing epsilonproteobacterium isolated from a hydrothermal field // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 2183–2187.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002803>
- Murphy C.L., Biggerstaff J., Eichhorn A., Ewing E., Shahan R., Soriano D., Stewart S., VanMol K., Walker R., Walters P., Elshahed M.S., Youssef N.H. Genomic characterization of three novel *Desulfobacterota* classes expand the metabolic and phylogenetic diversity of the phylum // Environ. Microbiol. 2021. V. 23. P. 4326–4343.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15614>
- Narihiro T., Terada T., Ohashi A., Kamagata Y., Nakamura K., Sekiguchi Y. Quantitative detection of previously characterized syntrophic bacteria in anaerobic wastewater treatment systems by sequence-specific rRNA cleavage method // Water Res. 2012. V. 46. P. 2167–2175.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.034>
- Oswald K., Graf J.S., Littmann S., Tienken D., Brand A., Wehli B., Albertsen M., Daims H., Wagner M., Kuypers M.M., Schubert C.J., Milucka J. *Crenothrix* are major methane consumers in stratified lakes // ISME J. 2017. V. 11. P. 2124–2140.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.77>
- Overmann J. Mahoney Lake: a case study of the ecological significance of phototrophic sulphur bacteria // Adv. Microb. Ecol. 1997. V. 15. P. 251–288.
- Park S.J., Kim J.G., Jung M.Y., Kim S.J., Cha I.T., Ghai R., Martín-Cuadrado A.B., Rodríguez-Valera F., Rhee S.K. Draft genome sequence of an ammonia-oxidizing archaeon, “*Candidatus Nitrosopumilus sediminis*” AR2, from Svalbard in the arctic circle // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 6946–6947.
<https://doi.org/10.1128/JB.01869-12>
- Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *In situ* activity studies in thermal environments // Meth. Microbiol. 2006. V. 35. P. 29–53.
- Pjevac P., Korlevic M., Berg J.S., Bura-Nakic E., Ciglenecki I., Amann R., Orlic S. Community shift from phototrophic to chemotrophic sulfide oxidation following anoxic holomixis in a stratified seawater lake // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 298–308.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02435-14>
- Qin W., Heal K.R., Ramdasi R., Kobel J.N., Martens-Habben W., Bertagnoll A.D., Amin S.A., Walker C.B., Urakawa H., Konneke M., Devol A.H., Moffett J.W., Armbrust E.V., Jensen G.J., Ingalls A.E., Stahl D.A. *Nitrosopumilus maritimus* gen. nov., sp. nov., *Nitrosopumilus cobalaminigenes* sp. nov., *Nitrosopumilus oxycliniae* sp. nov., and *Nitrosopumilus ureiphilus* sp. nov., four marine ammonia-oxidizing archaea of the phylum *Thaumarchaeota* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 5067–5079.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002416>
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // Peer. J. 2016. V. 4. P. 1–22.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Rogozin D.Y., Zykov V.V., Chernetsky M.Y., Degermendzhy A.G., Gulati R.D. Effect of winter conditions on distributions of anoxic phototrophic bacteria in two meromictic lakes in Siberia, Russia // Aquat. Ecol. 2009. V. 43. P. 661–672.
<https://doi.org/10.1007/s10452-009-9270-7>

- Salman V., Bailey J.V., Teske A. Phylogenetic and morphologic complexity of giant sulphur bacteria // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 104. P. 169–186.
<https://doi.org/10.1007/s10482-013-9952-y>
- Savvichev A.S., Demidenko N.A., Krasnova E.D., Kalmatskaya O.V., Kharcheva A.N., Ivanov M.V. Microbial processes in the Kanda Bay, a meromictic water body artificially separated from the White Sea // *Doklady Biol. Sci.* 2017. V. 474. P. 135–139.
<https://doi.org/10.1134/S0012496617030103>
- Savvichev A.S., Babenko V.V., Lunina O.N., Letarova M.A., Boldyreva D.I., Veslopolova E.F., Demidenko N.A., Kokryatskaya N.M., Krasnova E.D., Gaisin V.A., Kostryukova E.S., Gorlenko V.M., Letarov A.V. Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake, Trekhtzvetnoe // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 3784–3797.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14384>
- 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 of the carbon and sulfur cycles and the relevant microorganisms in the water column of the meromictic lake Bol'shie Khruslomeny Lake at the White Sea coast // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 1945. P. 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01945>
- Strelkov P., Shunatova N., Fokin M., Usov N., Fedyuk M., Malavenda S., Lubina O., Poloskin A., Korsun S. Marine Lake Mogilnoe (Kildin Island, the Barents Sea): one hundred years of solitude // *Polar Biol.* 2014. V. 37. P. 297–310.
<https://doi.org/10.1007/s00300-013-1431-4>
- Sun Q.L., Zhang J., Wang M.X., Cao L., Du Z.F., Sun Y.Y., Liu S.Q., Li C.L., Sun L. High-throughput sequencing reveals a potentially novel *Sulfurovum* species dominating the microbial communities of the seawater–sediment interface of a deep-sea cold seep in South China sea // *Microorganisms*. 2020. V. 8. P. 687.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050687>
- Tassi F., Fazi S., Rossetti S., Pratesi P., Ceccotti M., Cabassi J., Capecchiacci Fr., Venturi St., Vaselli O. The biogeochemical vertical structure renders a meromictic volcanic lake a trap for geogenic CO₂ (Lake Averno, Italy) // *PLoS One*. 2018. V. 13. P. 1–26.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193914>
- Van Gemerden H., Mas J. Ecology of phototrophic sulfur bacteria // *Anoxygenic photosynthetic bacteria* / Eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. New York: Kluwer Academic, 1995. P. 49–85.
- Vekeman B., Kerckhof F.M., Cremers G., Vos P., Vandamme P., Boon N., Camp H.J.M., Heylen K. New *Methyloceanibacter* diversity from North Sea sediments includes methanotroph containing solely the soluble methane monooxygenase // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. P. 4523–4536.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13485>
- Velinsky D.J., Fogel M.L. Cycling of dissolved and particulate nitrogen and carbon in the Framvaren Fjord, Norway: stable isotopic variations // *Mar. Chem.* 1999. V. 67. P. 161–180.
- Zhang J., Gilbert D., Gooday A., Levin L., Naqvi S.W.A., Middelburg J.J., Scranton M., Ekau W., Peña A., Dewitte B., Oguz T., Monteiro P.M.S., Urban E., Rabalais N.N., Ittekkot V., Kemp W.M., Ulloa O., Elmgren R., Escobar-Brion E., Van der Plas A.K. Natural and human-induced hypoxia and consequences for coastal areas: synthesis and future development // *Biogeosci.* 2010. V. 7. P. 1443–1467.
<https://doi.org/10.5194/bg-7-1443-2010>

Microbial Community Composition as an Indicator of the State of Basins Located at the Sea Coast (Exemplified by the Kanda Bay, Kandalaksha Gulf, White Sea)

A. S. Savvichev^{1, *}, N. A. Demidenko³, V. V. Kadnikov², V. V. Belenkova¹,
I. I. Rusanov¹, and V. M. Gorlenko¹

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

² Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

³ Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: savvichev@mail.ru

Received June 22, 2023; revised July 5, 2023; accepted July 5, 2023

Abstract—Formation of the Kanda Bay resulted from construction of a railway dam (1916) and subsequent isolation of the sea lagoon from the main basin of the Kandalaksha Gulf, White Sea. Decreased action of tidal flows, which mix the water column of the lagoon, altered the hydrological regime of the basin. Decreased water exchange resulted in formation of oxygen-depleted near-bottom water and to sulfide contamination. A freshwater lake was, however, preserved in the southern part of the Kanda Bay. The composition of microbial communities was studied for the near-bottom water horizons at different sides of the Kanda Bay. The oxygen regime in this layer was found to change, with increasing concentrations of sulfide and methane and active processes of sulfate reduction and methane oxidation. The composition of the microbial community changed noticeably, with lower abundance of true marine and freshwater microorganisms and development of bacteria and archaea predominant in microbial communities of anoxic water in meromictic basins. Among the microbial diversity, indicator species with increased abundance were revealed. These are archaea of the genera

Methanoregula and *Methanosaeta* (phylum *Halobacterota*). The sulfur cycle microorganisms, which were the indicators of stagnant marine water, included anoxygenic phototrophic bacteria of the class *Chlorobia*, (*Chlorobium phaeovibrioides*, *Pelodictyon phaeoclathratiforme*), *Chloroflexi* of the genus *Chloronema*, nonsulfur purple bacteria related to the genus *Rhodoferrax*, colorless sulfur bacteria of the family *Beggiatoaceae*, and sulfur oxidizers of the genus *Thiobacillus*. Archaea of the genus *Nitrosopumilus* (phylum *Crenarchaeota*) and bacteria of the genus *Woeseia* may be considered opposites to the indicator microorganisms, since they were found only in the open sea water. In our opinion, stable water exchange through the dam will result in the stable composition of the Kanda Bay microbial community, with only seasonal variations and year-to-year fluctuations. The negative scenario supports prediction of conversion of the Kanda Bay into a stratified basin with anoxic near-bottom water and the microbial community similar to that found in meromictic lakes.

Keywords: Microbial communities, microbial processes, Kanda Bay, meromictic basins, water exchange, hydrological regime, stratification, sulfide contamination

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКОВ И ЛИХЕНОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ НА РОСТ *IN VITRO* КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2023 г. Т. А. Панкратов^а*, Р. Е. Щербатов^б, А. А. Дельцов^б

^а Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^б Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА
имени К.И. Скрябина, Москва, 109472 Россия

*e-mail: tpankratov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 05.07.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Исследована активность этанольных экстрактов лишайников (ЭЛ) и культур лихенофильных (эндобионтных) грибов лишайников (ЭГЛ), а также их этанольных экстрактов в отношении тест-культур *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*, *Paenibacillus* sp., *Candida parapsilosis*. Выявлена избирательная активность ЭЛ и ЭГЛ в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей. Большая часть экстрактов лишайников и культур грибов не были активны в отношении грамотрицательных бактерий. Экстракты *Cladonia rangiferina* были неактивны в отношении всех тестируемых культур. Выявлен и подтвержден ранее описанный эффект локуса на активность метаболитов одного вида лишайников. Методом агаровых блоков выявлена избирательная активность 23 из 61 проанализированного штамма грибов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, 8 – в отношении дрожжей. Этанольные экстракты шести культур были способны угнетать рост *St. aureus*, *M. luteus*, *Paenibacillus* sp. и *E. coli*. Штамм NM10F28209 из лишайника *Stereocaulon paschale* проявлял наибольшую ингибирующую активность в отношении *Ca. parapsilosis* и *Y. lipolytica* и выбран для приоритетной разработки фунгицидного препарата.

Ключевые слова: биоциды, лишайники, эндобионты лишайников, этанольные экстракты

DOI: 10.31857/S002636562360027X, **EDN:** BPNRES

Проблема применения антибиотиков в здравоохранении и ветеринарии становится все более актуальной на фоне увеличения частоты встречаемости резистентных к традиционно используемым антибиотикам штаммов микроорганизмов. Эта проблема носит общемировой характер. В 2019 г. в мире зарегистрировано 4.95 млн смертей, связанных с антибиотикорезистентными бактериями (АРБ). Шесть патогенов-лидеров по смертности, связанной с резистентностью (*Escherichia coli*, затем *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*), были ответственны за 929 тысяч смертей, связанных с АРБ (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). По прогнозам Всемирной организации здравоохранения смертность от инфекций, связанных антибиотикорезистентными микроорганизмами, может достигнуть к 2050 г. 10 млн человек (de Kraker et al., 2016).

В этой связи поиск новых биоцидных препаратов, преодолевающих резистентность патогенных микроорганизмов, становится все более актуальным. В методиках, применяемых для оценки биоцидности препаратов, классическими тест-объектами являются *Staphylococcus aureus* (в том числе, метициллин-резистентные), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* (Ефименко и соавт., 2018; Демьянкова и соавт., 2021). Для решения задач, которые связаны с поиском биоцидных препаратов, выбор тест-культур может быть определен не только их ролью в клинической практике, но и с учетом перспектив использования на пищевом производстве, в ветеринарии и сельском хозяйстве. В этом случае спектр используемых тест-объектов может меняться и включать, в том числе, штаммы, выделенные из природных сред.

В последние десятилетия внимание биотехнологов и медиков привлекают лишайники как источни-

Таблица 1. Список образцов лишайников

№ образца	Вид лишайника	Место сбора
EK1	<i>Cladonia coniocraea</i> (Flörke) Sprengel	Самарская обл., Ясная поляна
EK2	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	Самарская обл., Моховое болото
EK3	<i>Cetraria islandica</i> (L.) Acharius s.l.	Самарская обл., Рачейская тайга
EK4	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	Самарская обл., Моховое болото
EK5	<i>Cladonia furcata</i> (Hudson) Schrader	Самарская обл., Рачейская тайга
EK6	<i>Pseudoevernia furfuracea</i> (L.) Zopf R. Murto	Самарская обл., Рачейская тайга
EK7	<i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.	Оренбургская обл., Бузулукский бор
EK8	<i>Ramalina franea</i> (L.) Ach.	Крым, пещера Горшенина
EK9	<i>Cladonia stellaris</i> (Opiz) Pouzar et Vězda	Самарская обл., Рачейская тайга
EK10	<i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach.	Крым, плато Чатыр-Даг
EK11	<i>Anaptychia ciliaris</i> (L.) Körb.	Самарская обл., Ясная поляна
EK12	<i>Hypogymnia physodes</i> (L.) Nyl.	Самарская обл., Кинельский р-он
EK13	<i>Cladonia monomorpha</i> Aptroot, Sipman & Herk	Самарская обл., Малоусинский сосняк
SIV-1	<i>Parmelia</i> sp. Ach.	ЯНАО, Приуральский р-он
SIV-2	<i>Cladonia gracilis</i> (L.) Willd.	
SIV-3	<i>Cladonia</i> sp. P. Browne	
SIV-4	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	
SIV-5	<i>Usnea</i> sp. Dill. ex Adans.	
NM1	<i>Flavocetraria cucullata</i> (Bellardi) Kärnefelt et A. Thell	г. Нарьян-Мар, Ненецкий автономный округ
NM2	<i>Cetraria islandica</i> subsp. <i>crispiformis</i> (Räsänen) Kärnefelt	
NM3	<i>Flavocetraria nivalis</i> (L.) Kärnefelt et A. Thell	
NM4	<i>Peltigera aptosa</i> (L.) Willd.	
NM5	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	
NM6	<i>Peltigera malacea</i> (Ach.) Funck	
NM7	<i>Cladonia uncialis</i> (L.) Weber ex F.H. Wigg.	
NM8	<i>Cladonia stellaris</i> (L.) Ach.	
NM9	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	
NM10	<i>Stereocaulon paschale</i> (L.) Hoffm.	
CH1	<i>Sphaerophorus</i> sp. Pers.	Мурманская область, г. Апатиты
ALT1	<i>Cladonia stellaris</i> (Opiz) Pouzar et Vězda	Алтайский край, пос. Северка, оз. Петухово
ALT2	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	
ALT3	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	
ALT4	<i>Cladonia stellaris</i> (Opiz) Pouzar et Vězda	Алтайский край, пос. Ерназар
ALT5	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	
ALT9	<i>Cladonia stellaris</i> (Opiz) Pouzar et Vězda	Алтайский край, пос. Озерно-Кузнецово, оз. Кузнецово
ALT10	<i>Cladonia rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg.	
ALT11	<i>Cladonia arbuscula</i> (Wallr.) Rabenh.	

Биоцидную активность диагностировали по величине зоны ингибирования.

Культуральную жидкость тестировали, внося ее в лунки (50 мкл), как это описано ранее (Егоров, 1965).

Использованные тест-культуры. Для тестирования биоцидной активности метаболитов лишайников и грибов использовали культуры грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* RY1, *Micrococcus luteus* C01, *Enterococcus faecium* M3185, *Paenibacillus* sp. ALT11; грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* 481, *Salmonella typhimurium* TA 1535; дрожжей *Candida parapsilosis* 134.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование активности спиртовых экстрактов лишайников. Наиболее распространенным и нетоксичным растворителем для экстракции из растительного сырья является этанол. Наряду с ацетоном, этилацетатом, бензолом, хлороформом он широко используется для экстракции биологически активных молекул из растительного сырья. В данной работе мы провели оценку биоцидности этанольных экстрактов лишайников и лишайников грибов в отношении набора бактериальных тестовых культур и дрожжей *Ca. parapsilosis*.

Спиртовые экстракты EK1 *Cl. coniocraea*, EK4 *Cl. rangiferina*, EK5 *Cl. furcata*, EK6 *Ps. furfuracea*, EK7 *E. prunastri*, EK8 *R. franacea*, EK10 *C. islandica*, EK11 *An. ciliaris*, EK13 *Cl. monomorpha*, NM4 *P. aph-tosa*, NM5 *Cl. rangiferina*, NM6 *P. malacea*, ALT3 и ALT10 *Cl. rangiferina* не проявляли бактерицидную и фунгицидную активности. Все экстракты не угнетали рост дрожжей *Ca. parapsilosis*.

Экстракты из остальных исследованных лишайников проявляли бактерицидную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий избирательно (табл. 2).

Большая часть экстрактов лишайников (далее ЭЛ) угнетали рост грамположительных бактерий, однако их активность зависела от места отбора образца лишайника, а также от вида. Так, например, ЭЛ *Cl. arbuscula*, собранного на болоте в Самарской области, не подавлял рост *M. luteus* и *E. faecium*, в отличие от образцов того же вида, собранных в г. Нарьян-Маре и на Алтае (табл. 2). При этом ЭЛ всех представителей рода *Cladonia* (кроме уже упомянутой *Cl. rangiferina*, а также NM2 *C. islandica* subsp. *crispiformis*), независимо от региона сбора образцов, подавляли рост *S. aureus* ATCC 6538 и почти все (за исключением *Cl. stellaris* EK9, Самарская обл.) ингибировали рост *Paenibacillus* sp. ALT11. Большая часть проанализированных ЭЛ проявляла ингибирующую активность в отношении *E. faecium* (кроме EK2 *Cl. arbuscula* и EK3 *C. islandica*). Только ЭЛ NM1 *Fl. cucullata*, NM2

C. islandica subsp. *crispiformis* и NM3 *Fl. nivalis* ингибировали рост грамотрицательных бактерий *E. coli* и *Sm. typhimurium*, при этом максимальной активностью обладал ЭЛ из NM1 *Fl. cucullata* (25 мм).

Оценка активности грибов методом агаровых блоков и методом цилиндров. Был проанализирован 61 штамм грибов, выделенных из различных видов лишайников, собранных в территориально удаленных локациях. Культуральные жидкости всех исследованных штаммов не обладали ингибирующей активностью в отношении тест-культур.

Метод агаровых блоков позволил выявить избирательную активность 23 штаммов грибов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а 8 из них — в отношении дрожжей (табл. 3). Если в отношении бактерий грибы проявляли заметную или достаточно высокую активность, то в отношении дрожжей ингибирующий эффект был слабым, за исключением одного штамма, NM10F28209, выделенного из лишайника *Stereocaulon paschale* (г. Нарьян-Мар) и обладающего высокой фунгицидной активностью. Только 4 штамма грибов были антагонистами *Paenibacillus* sp. ALT11. Наиболее чувствительными к ингибирующему воздействию грибов оказались культуры *E. coli* K12 и *S. aureus* ATCC 6538.

Определение активности этанольных экстрактов биомассы грибов. Этанольные экстракты оказались слабо активными в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, и совсем не проявляли ингибирующей активности в отношении дрожжей. Только несколько экстрактов (табл. 4) ингибировали рост *E. coli* K12, *S. aureus* ATCC 6538, *M. luteus* C01 и *Paenibacillus* sp. ALT11. Рост остальных тест-культур не подавлялся.

ОБСУЖДЕНИЕ

На данный момент вторичные метаболиты лишайников хорошо изучены (Huneck, Yoshimura, 2012; Xu, 2016). Накоплены данные о бактерицидных и фунгицидных эффектах экстрактов из лишайников разных видов (Molnár, Farkas, 2010). Однако, как правило, исследования образцов лишайников проводили без учета их географической локализации. В этой работе анализ активности ЭЛ показал, что в целом, независимо от географической локализации, лишайники одного вида сохраняют ингибирующую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Только некоторые образцы различаются профилем бактерицидности. В частности, экстракт лишайника *Cl. arbuscula*, собранного на болоте в Самарской области, обладает меньшей ингибирующей активностью, чем экстракты из этого же вида, если образцы получены из более засушливых местобитаний. Однако эта закономерность не просле-

Таблица 2. Определение эффекта ингибирования роста тест-культур этанольными экстрактами лишайников

Образец лишайника	Величина зоны ингибирования роста, мм						
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> RY1	<i>M. luteus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>E. faecium</i>	<i>Sm. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
EK2 <i>Cl. arbuscula</i>	10 ± 0.2	0	0	10 ± 0.2	0	0	0
EK3 <i>Cl. islandica</i>	0	0	0	8 ± 0.2	0	0	0
EK9 <i>Cl. stellaris</i>	8.5 ± 0.3	8 ± 0.2	10 ± 0.2	0	8.5 ± 0.2	0	0
EK12 <i>H. physodes</i>	13.5 ± 0.2	13 ± 0.2	11 ± 0.2	11 ± 0.2	10 ± 0.2	0	0
SIV-1 <i>Parmelia</i> sp.	16 ± 0.3	15 ± 0.3	14 ± 0.3	9 ± 0.2	12 ± 0.2	0	0
SIV-2 <i>Cl. gracilis</i>	19 ± 0.2	23 ± 0.2	18 ± 0.2	10 ± 0.2	15 ± 0.3	0	0
SIV-3 <i>Cladonia</i> sp.	15 ± 0.3	20 ± 0.3	14 ± 0.3	10 ± 0.2	20 ± 0.3	0	0
SIV-4 <i>Cl. rangiferina</i>	12 ± 0.2	11.5 ± 0.15	16 ± 0.3	8 ± 0.2	11 ± 0.3	0	0
SIV-5 <i>Usnea</i> sp.	8 ± 0.2	8 ± 0.2	11 ± 0.2	0	9 ± 0.2	0	0
CH1 <i>Spherophorus</i> sp.	9 ± 0.2	12 ± 0.2	22 ± 0.3	8.5 ± 0.2	13 ± 0.2	0	0
NM1 <i>Fl. cucullata</i>	25 ± 0.3	24 ± 0.3	30 ± 0.3	16 ± 0.2	14 ± 0.2	0	25 ± 0.3
NM2 <i>C. islandica</i> subsp. <i>crispiformis</i>	0	9 ± 0.2	12 ± 0.2	8 ± 0.2	7 ± 0.2	0	17 ± 0.2
NM3 <i>Fl. nivalis</i>	15 ± 0.2	16 ± 0.2	17 ± 0.2	11 ± 0.3	15 ± 0.3	0	17 ± 0.2
NM7 <i>Cl. uncialis</i>	22 ± 0.3	18 ± 0.3	16 ± 0.3	9 ± 0.2	12 ± 0.2	0	0
NM8 <i>Cl. stellaris</i>	23 ± 0.3	20 ± 0.3	18 ± 0.2	12 ± 0.3	17 ± 0.2	0	0
NM9 <i>Cl. arbuscula</i>	25 ± 0.2	22 ± 0.3	20 ± 0.2	11 ± 0.2	22 ± 0.3	0	0
NM10 <i>S. paschale</i>	12 ± 0.2	14 ± 0.2	14 ± 0.2	10 ± 0.2	17 ± 0.3	0	0
ALT1 <i>Cl. stellaris</i>	7 ± 0.2	НД	16 ± 0.2	10 ± 0.2	26 ± 0.4	0	0
ALT2 <i>Cl. arbuscula</i>	13 ± 0.2	НД	14 ± 0.2	14 ± 0.3	21 ± 0.2	0	0
ALT3 <i>Cl. rangiferina</i>	0	НД	0	0	0	0	0
ALT4 <i>Cl. stellaris</i>	11 ± 0.3	НД	10 ± 0.2	10 ± 0.3	21 ± 0.3	0	0
ALT5 <i>Cl. arbuscula</i>	21 ± 0.3	НД	16 ± 0.3	13 ± 0.3	26 ± 0.25	0	0
ALT9 <i>Cl. stellaris</i>	16 ± 0.2	НД	14 ± 0.3	12 ± 0.2	24 ± 0.25	0	0
ALT10 <i>Cl. rangiferina</i>	0	НД	0	0	0	0	0
ALT11 <i>Cl. arbuscula</i>	12 ± 0.2	НД	14 ± 0.2	14 ± 0.2	22 ± 0.3	0	0

Примечание. НД – данные отсутствуют.

живается во ношении *Cl. stellaris*. Экстракты из этого лишайника демонстрируют близкие значения величин ингибирования. Этот результат слабо согласуется с ранее полученными данными (Корчиков и соавт., 2021).

Грамположительные бактерии ингибируются этанольными экстрактами большинства изученных видов лишайников. Этот результат хорошо согласуется с данными, полученными ранее (Oh et al., 2018). В то же время только ЭЛ трех видов ингибировали грамотрицательные бактерии. Shrestha и соавт. (2014) исследовали 34 вида лишайников и также не обнаружили активности метанольно-ацетоновых экстрактов против *E. coli*. Этому феномену в литературе не уделяется достаточного внимания,

хотя он интересен для понимания механизмов селекции бактерий в лишайниковые симбиозы. Известно, что в лишайниках доминируют грамотрицательные бактерии (Noh et al., 2020; Noh et al., 2021b), приспособленные к выживанию и активному функционированию в кислой среде (pH 4–5), при дефиците влаги и минеральных солей.

Этанольные экстракты лишайников, содержащие, главным образом, растворимые в полярных растворителях лишайниковые кислоты, угнетают рост бактерий, но не дрожжей, в то время как среди грибов, выделенных из лишайников, присутствуют штаммы, обладающие фунгицидной активностью. Это противоречие может быть устранено, если предположить, что фунгицидные метаболиты лишайни-

Таблица 3. Результаты тестирования ингибирующей активности грибных изолятов методом агаровых блоков

Номер штамма	Источник выделения	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>M. luteus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Sm. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Ca. parapsilosis</i>
1037CtrNIG01	<i>Cetraria nigricans</i>	0	0	0	0	0	0	+
1037CtrNIG54	<i>Cetraria nigricans</i>	+	0	0	+	0	0	0
1037CtrNIG55	<i>Cetraria nigricans</i>	0	0	0	+	0	0	0
1037FlcNIV60	<i>Flavocetraria nivalis</i>	+	0	0	0	0	0	0
ANFlcSP-08	<i>Flavocetraria nivalis</i>	0	0	+	0	0	0	0
BP6-01STR	<i>Flavocetraria nivalis</i>	12 ± 0.2	0	13 ± 0.2	0	0	0	+
CtIDL11	<i>Cetrariella delisei</i>	0	0	0	20 ± 0.2	0	0	0
CtIDL12	<i>Cetrariella delisei</i>	+	0	0	24 ± 0.2	0	0	0
CtrNig01	<i>Cetraria nigricans</i>	0	0	0	+	0	0	0
CtrNig02	<i>Cetraria nigricans</i>	0	0	0	15 ± 0.2	0	0	0
EG3-02	<i>Cladonia arbuscula</i> ssp. <i>arbuscula</i>	0	0	0	0	0	0	+
NM10F28209	<i>Stereocaulon paschale</i>	0	0	0	0	0	0	16 ± 0.2
NM10F28211	<i>Stereocaulon paschale</i>	0	0	0	0	0	0	+
NM5F17203	<i>Cladonia rangiferina</i>	14 ± 0.2	11 ± 0.2	0	+	0	0	0
NM5F17206	<i>Cladonia rangiferina</i>	+	0	0	+	0	0	0
NM9F24307	<i>Cladonia arbuscula</i>	18 ± 0.2	0	0	26 ± 0.2	0	0	0
PsphPub01	<i>Pseudephebe pubescens</i>	32 ± 0.3	0	0	25 ± 0.2	0	0	0
T2CtIDL08	<i>Cetrariella delisei</i>	+	0	0	0	0	0	0
T2CtrDL11	<i>Cetrariella delisei</i>	0	0	0	0	0	0	+
T3CtrNIG04	<i>Cetraria nigricans</i>	32 ± 0.3	0	0	0	0	0	+
T6PsphPUB01	<i>Pseudephebe pubescens</i>	+	18 ± 0.3	+	0	0	0	0
T6PsphPUB02	<i>Pseudephebe pubescens</i>	0	0	0	0	0	0	+
T6PsphPUB251101	<i>Pseudephebe pubescens</i>	0	16 ± 0.2	+	0	0	0	+

Примечание. “+” – Наблюдается “гало” лизиса клеток. Диаметр агаровых блоков 6 мм. Величина зон ингибирования роста дана в миллиметрах с учетом диаметра агарового блока. Жирным шрифтом выделены значения диаметра зон ингибирования более 15 мм.

ков не растворяются в полярных растворителях, или активность комменсальных грибов в здоровых, активно растущих талломах подавлена. По всей видимости, сами микобионты не выделяют фунгицидных соединений, способных растворяться в этаноле. Еще одним интересным и статистически достоверным результатом является отсутствие у этанольных экстрактов *Cl. rangiferina* антибактериальной активности. В то же время, существуют данные о том, что экстракция ацетоном выявляла в лишайниках этого вида антибактериальные соединения (Kosanić et al., 2018)

Отсутствие антибактериальной активности у 38 штаммов эндофитных грибов, выделенных из лишайников, можно попытаться объяснить их комменсализмом. В условиях совместного роста комменсальные грибы остаются физиологически и экологически нейтральными по отношению к

другим членам симбиоза, что исключает выработку ими бактерицидных или фунгицидных соединений. Скрининг такой активности может быть методической основой для выявления в лишайниковом симбиозе грибов с разными экологическими стратегиями. Несмотря на то, что бактерицидная активность грибов в мире активно изучается (Ершова и соавт., 2003; Silva et al., 2022), данных о бактерицидной активности эндофитных грибов из лишайников найти не удалось. Поэтому данная работа является в значительной степени пионерской.

Интересно, что те штаммы грибов, которые проявляли антибактериальную активность, также, как и экстракты из лишайников, подавляли рост в основном грамположительных бактерий и *E. coli*, которая является симбионтом кишечника человека и животных. Вместе с тем, эти же экс-

Таблица 4. Влияние этанольных экстрактов лишенобионтных грибов на рост тест-культур (зона ингибирования, мм)

Номер штамма	Источник выделения	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>M. luteus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Sm. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Ca. parapsilosis</i>
T1UmbPR01	<i>Umbilicaria proboscidea</i>	12 ± 0.2	0	18 ± 0.2	18 ± 0.2	0	0	0
T1UmbPR02	<i>Umbilicaria proboscidea</i>	12 ± 0.2	0	0	18 ± 0.2	0	0	0
T6PspHUB251101	<i>Pseudephebe pubescens</i>	18 ± 0.2	16 ± 0.2	0	0	0	0	0
T6PspHUB01	<i>Pseudephebe pubescens</i>	10 ± 0.2	16 ± 0.2	10 ± 0.2	0	0	0	0
T2CtIDL12	<i>Cetrariella delisei</i>	10 ± 0.2	12 ± 0.2	8 ± 0.1	8 ± 0.1	0	0	0

Примечание. Определение активности проведено диско-диффузионным методом.

тракты не подавляли рост патогенов *Sm. typhimurium* и *P. aeruginosa*. Это возможно объяснить как спецификой биоцидов, продуцируемых грибами, так и различием в величинах минимальных ингибирующих концентраций этих соединений для разных бактериальных культур.

Полученные из лишайников грибные изоляты, способные к подавлению роста клинически значимых бактерий *E. coli*, *S. aureus*, а также дрожжей *Ca. parapsilosis*, будут в дальнейшем исследованы, идентифицированы и использованы как продуценты биоцидных препаратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят к.б.н. Е.С. Корчикова и к.б.н. О.С. Самылину за сбор и предоставление образцов лишайников, а также к.б.н. А.В. Мелехина за идентификацию некоторых видов лишайников.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Демьянкова М.В., Садыкова В.С., Глухова А.А., Ефименко Т.А., Бойкова Ю.В., Малкина Н.Д., Кормилицина В.Г., Шараченко С.О., Сумарукова И.Г., Васильева Б.Ф., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П., Габриелян Н.И., Ефре-

менкова О.В. Подход к поиску продуцентов антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость микроорганизмов // Антибиотики и химиотерапия. 2021. Т. 66. № 7–8. С. 4–12.

<https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-7-8-4-12>

Егоров Н.С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: Высшая школа, 1965. 212 с.

Ериова Е.Ю., Тихонова О.В., Лурье Л.М., Ефременкова О.В., Комзолкина О.В., Дудник Ю.В. Антимикробная активность штаммов *Laetiporus sulphureus* в условиях глубокого культивирования // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48. № 1. С. 18–22.

Ефименко Т.А., Ефременкова О.В., Сумарукова И.Г., Васильева Б.Ф., Демкина Е.В., Эль-Регистан Г.И., Петрова М.А. Бактерии, выделенные из вечной мерзлоты Антарктики – эффективные продуценты антибиотиков // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 573–580.

<https://doi.org/10.1134/S0026365618050087>

Ефименко Т.А., Ефременкова О.В., Сумарукова И.Г., Васильева Б.Ф., Демкина Е.В., Эль-Регистан Г.И., Петрова М.А. Bacteria isolated from Antarctic permafrost are efficient antibiotic producers // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87 P. 692–698.

<https://doi.org/10.1134/S0026261718050089>

Качалкин А.В., Глушак А.М., Панкратов Т.А. Дрожжевое население лишайников полуострова Киндо // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 762–769.

<https://doi.org/10.7868/S0026365617060076>

Kachalkin A.V., Glushakova A.M., Pankratov T.A. Yeast population of the Kindo peninsula lichens // Microbiology (Moscow). 2017. T. 86. C. 786–792.

<https://doi.org/10.1134/S0026261717060078>

Корчиков Е.С., Зеленская Е.А., Халикова Л.В., Турченко П.С. Влияние экологических условий на накопление вторичных метаболитов лишайников рода *Cladonia* и семейства *Parmeliaceae* // Самарский научный вестник. 2021. Т. 10. № 3. С. 58–63.

<https://doi.org/10.17816/snv2021103108>

Определитель лишайников России. Вып. 6. Алектори-евые, Пармелиевые, Стереокаулоновые. СПб., 1996. 203 с.

Цуриков А.Г., Корчиков Е.С. Определитель лишайников Самарской области. Ч. 1. Листоватые, кустистые и

- слизистые виды: учеб. пособие. Самара: Изд-во Самарского ун-та, 2018. 128 с.
- Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet*. 2022. V. 399 (10325). P. 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Huneck S., Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. 493 p.
- Kosanić M., Ristić S., Stanojković T., Manojlović N., Ranković B. Extracts of five *Cladonia* lichens as sources of biologically active compounds // *Farmacia*. 2018. V. 66. P. 644–651. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2018.4.13>
- de Kraker M.E., Stewardson A.J., Harbarth S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? // *PLoS Med*. 2016. V. 13. Art. e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
- Molnára K., Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review // *Z. Naturforsch. C J. Biosci*. 2010. V. 65. P. 157–173. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-401>
- Nikolaev Y.A., Tutel'yan A.V., Loiko N.G., Buck J., Sidorenko S.V., Lazareva I., Gostev V., Manzen'yuk O.Y., Shemyakin I.G., Abramovich R.A., Huwylar J., El'-Registan G.I. The use of 4-hexylresorcinol as antibiotic adjuvant // *PLoS One*. 2020. V. 15. Art. e0239147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239147>
- Noh H.-J., Lee Y.M., Park C.H., Lee H.K., Cho J.-C., Hong S.G. Microbiome in *Cladonia squamosa* is vertically stratified according to microclimatic conditions // *Front. Microbiol*. 2020. V. 11. Art. 268. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00268>
- Noh J.-I., Mun S.-K., Lim E.H., Kim H., Chang D.-J., Hur J.-S., Yee S.-T. Induction of apoptosis in MDA-MB-231 cells treated with the methanol extract of lichen *Physcobia hokkaidensis* // *J. Fungi*. 2021a. V. 7. Art. 188. <https://doi.org/10.3390/jof7030188>
- Noh H.-J., Park Y., Hong S.G., Lee Y.M. Diversity and physiological characteristics of Antarctic lichens-associated bacteria // *Microorganisms*. 2021b. V. 9. Art. 607. Doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030607>
- Oh J.M., Kim Y.J., Gang H.S., Han J., Ha H.H., Kim H. Antimicrobial activity of divaricatic acid isolated from the lichen *Evernia mesomorpha* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Molecules*. 2018. V. 23. Art. 3068. <https://doi.org/10.3390/molecules23123068>
- Silva D.P.D., Cardoso M.S., Macedo A.J. Endophytic fungi as a source of antibacterial compounds – a focus on gram-negative bacteria // *Antibiotics*. 2022. V. 11. Art. 1509. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111509>
- Shrestha G., Raphael J., Leavitt S.D., Clair L.L. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens // *Pharm. Biol*. 2014. V. 52. P. 1262–1266. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.889175>
- Xu M., Heidmarsson S., Olafsdottir E.S., Buonfiglio R., Kogej T., Omarsdottir S. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential // *Phytomedicine*. 2016. V. 23. P. 441–459. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.012>

Effect of the Extracts from Lichens and Lichenophilic Fungi on *in vitro* Growth of Clinically Significant Microorganisms

T. A. Pankratov^{1, *}, R. E. Shcherbatov², and A. A. Del'tsov²

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

² Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472 Russia

*e-mail: tpankratov@gmail.com

Received May 30, 2023; revised July 5, 2023; accepted July 5, 2023

Abstract—Activity of the ethanol extracts from lichens (LE), of the cultures of lichenophilic (endobiotic) fungi (LFE), and of ethanol extracts from these cultures was tested using the following test organisms: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*, *Paenibacillus* sp., and *Candida parapsilosis*. Selective activity of LE and LFE against yeasts and gram-positive and gram-negative bacteria was revealed. The extracts from *Cladonia rangiferina* exhibited no activity against any of the tested cultures. The previously reported locus effect on activity of metabolites of one lichen species was confirmed. Agar block technique was used to detect selective activity of 23 out of 61 analyzed fungal strains against gram-positive and gram-negative bacteria, and of 8 strains, against yeasts. Ethanol extracts of six cultures were shown to suppress growth of *St. aureus*, *M. luteus*, *Paenibacillus* sp., and *E. coli*. Strain NM10F28209 from the lichen *Stereocaulon paschale*, which exhibited inhibitory activity against *Ca. parapsilosis* was selected for priority development of an antifungal preparation.

Keywords: biocidal agents, lichens, lichen endobionts, ethanol extracts

ОСМОЛИТЫ И ЛИПИДЫ КОНИДИЙ КСЕРОГАЛОФИЛЬНОГО МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS PENICILLIOIDES*

© 2023 г. О. А. Данилова^а, *, Е. А. Януцевич^а, А. Б. Антропова^б, В. М. Терёшина^а

^а Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^б Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

*e-mail: noitcelfer@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2023 г.

После доработки 17.07.2023 г.

Принята к публикации 18.07.2023 г.

Исследование состава липидов и осмолитов конидий ксерогалофила *Aspergillus penicilloides*, выращенного на средах с высоким содержанием NaCl и глицерина, важно для понимания функций этих соединений в адаптации экстремофила. В конидиях гриба, полученных на среде с глицерином, наблюдалось до 15% от сухой массы углеводов и полиолов цитозоля (УиП) и преобладание глицерина в их составе (60% от суммы), тогда как на среде с NaCl доля глицерина на превышала 20%, а количество УиП составляло 10%. На обеих средах доля (20%) и количество (2.5%) трегалозы было одинаково, т.е. на долю полиолов приходилось около 80%, однако их состав различался, что указывает на возможную синергию между трегалозой и полиолами в адаптации. Для обоих вариантов конидий характерно низкое содержание как мембранных, так и запасных липидов, представленных, в основном триацилглицеринами. В составе мембранных липидов конидий гриба, независимо от состава среды, доминируют фосфатидилхолины и стерины, что свидетельствует о высокой стабилизации и консервативности липидного бислоя. Постоянство состава мембранных и запасных липидов и их низкое количество, высокий уровень УиП и существенные различия в их составе указывают на ключевую роль осмолитов в адаптации конидий гриба к различным условиям среды.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, ксерофилия, галофилия, трегалоза, глицерин, мембранные липиды

DOI: 10.31857/S0026365623600402, EDN: BWOGDU

Исследование спор экстремофильных грибов представляет большой интерес в связи с эволюцией и особенностями выживания в экстремальных условиях. Споры — ключевая структура в жизненном цикле гриба, так как она обеспечивает сохранение жизни во времени и пространстве, ее можно рассматривать как надежный сейф для грибного генома (Osharov, May, 2001). Споры грибов способны находиться в разных типах покоя (экзогенном и эндогенном) и могут быть как средством переживания неблагоприятных условий, так и средством распространения (Sussman, Halvorson, 1966). Споры в большей степени, чем мицелий защищены от неблагоприятных воздействий внешней среды благодаря низкому уровню метаболических процессов и высокому содержанию осмолитов. Осмолиты — низкомолекулярные соединения, защищающие макромолекулы и мембраны клетки (Yancey, 2005). У грибов осмолиты представлены, в основном, трегалозой и полиолами. Споры грибов содержат большое количество трегалозы, сравнимое с ее уровнем в мицелии мезофильных грибов в условиях

теплового шока (ТШ) (Терёшина, 2005). Трегалоза является многофункциональным соединением: выполняет транспортную, запасную, протекторную, антиоксидантную функции (Elbein et al., 2003; Iturriaga et al., 2009; Tapia, Koshland, 2014; Argüelles et al., 2017; Kahraman et al., 2019; Kosar et al., 2019). В отличие от других осмолитов, ее протекторное действие распространяется не только на макромолекулы клетки, но и на мембраны. У галофильных и ксерофильных грибов основным осмопротектором является глицерин (Prista et al., 2005; Kogej et al., 2007; Zajc et al., 2014; Stevenson et al., 2017; Danilova et al., 2022).

Ранее нами было показано, что у ксерогалофильного гриба *Aspergillus penicilloides*, выращенного на средах с высоким содержанием NaCl или глицерина, в мицелии накапливалось большое количество глицерина, но доля других полиолов — маннита, арабита и эритрита была значительно выше на среде с солью (Danilova et al., 2022). На примере многих грибов показано также, что в условиях ТШ в мицелии грибов накапливается

большое количество трегалозы (Elbein et al., 2003; Терёшина, 2005; Crowe, 2007). Однако у *A. penicillioides* под влиянием ТШ наблюдалось лишь небольшое повышение уровня трегалозы до 1% от сухой массы (около 20% от суммы), что отличается от реакции мезофильных грибов на ТШ. Исходя из этого мы предположили, что глицерин также может выполнять протекторную функцию, что может подтвердить исследование осмолитного состава спор.

Ранее нами было высказано предположение о взаимосвязи состава мембранных липидов и осмолитов при адаптации к стрессорным факторам (Ianutsevich et al., 2023). Споры грибов представляют собой структуры переживания, обладающие большой устойчивостью к неблагоприятным факторам (Феофилова и соавт., 2012), тем не менее недавно были получены новые данные о том, что споры, прикрепленные к спорофорам не являются покоящимися, так как в них может происходить процесс транскрипции (Wang et al., 2021). Это обеспечивает присутствие в спорах мРНК, продукты которых будут способствовать лучшей адаптации грибов в процессе прорастания. В спорах грибов, по сравнению с мицелием, мембранный аппарат редуцирован и представлен немногочисленными митохондриями с небольшим количеством крист и липидными везикулами (Barrera, 1986; Kozlova, 2006). Ранее было показано, что в мембранных липидах спор грибов доминируют ФХ и стерины, а в запасных — ТАГ (Терешина и соавт., 2002; Kozlova et al., 2019), однако данных о составе липидов в спорах ксерофильных грибов практически нет. Поэтому исследование химического состава конидий ксерогалофильного гриба *A. penicillioides* может дать дополнительную информацию о функциях полиолов, трегалозы и мембранных липидов.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании состава мембранных и запасных липидов, а также углеводов и полиолов цитозоля в конидиях *A. penicillioides*, выращенных на средах с высоким содержанием NaCl или глицерина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Микромицет *Aspergillus penicillioides* Speg. ВКМ F-4838 (*Aspergillaceae*, *Eurotiales*, *Eurotiomycetidae*, *Eurotiomycetes*, *Pezizomycotina*, *Ascomycota*) выделен из культуры клещей домашней пыли рода *Dermatophagoides* (Petrova-Nikitina et al., 2005). Гриб поддерживали на скошенном агаре следующего состава (г/л): Мальтакс-10 (Финляндия) — 20; NaCl — 100; агар-агар — 20; вода — до 1 л. Выращивали в течение 7 сут при 30°C, хранили при температуре 4–8°C.

Получение конидий. Для получения конидий *A. penicillioides* выращивали в поверхностной культуре при оптимальной температуре 30°C в течение

10 сут на двух средах. Состав среды с высоким содержанием соли (г/л): Мальтакс-10 — 30; дрожжевой экстракт — 1; K₂HPO₄ — 1; NaCl — 117 (2 M); агар-агар — 20; вода — до 1 л. Состав среды с высоким содержанием глицерина (г/л): Мальтакс-10 — 30; дрожжевой экстракт — 1; K₂HPO₄ — 1; глицерин — 368 (4 M); NaCl — 35; агар-агар — 20; вода — до 1 л. Конидии смывали 10% раствором NaCl, остатки мицелия удаляли фильтрованием через капроновый фильтр, затем через бумажный фильтр на воронке Бюхнера, остаточную соль удаляли, промывая небольшим количеством дистиллированной воды. Все операции проводили при температуре 4°C. Фильтр с конидиями замораживали и лиофильно высушивали.

Анализ липидов, углеводов и полиолов. Определение количества липидов, углеводов и полиолов проводили как описано ранее (Ianutsevich et al., 2016). Вкратце, липиды экстрагировали по методу Николса с изопропанолом, дезактивирующим фосфолипазы, разделяли двумерной (полярные липиды) или одномерной (нейтральные липиды) тонкослойной хроматографией (ТСХ) и количественно определяли с использованием стандартных соединений методом денситометрии (программное обеспечение DENS). Для изучения состава жирных кислот полярные липиды выделяли методом одномерной ТСХ в системе для нейтральных липидов, элюировали смесью хлороформ–метанол (1 : 1), затем экстракт упаривали и проводили метанолиз 2.5% H₂SO₄ в метаноле в течение 2 ч при 70°C. Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом ГЖХ.

Растворимые в цитозоле углеводы и полиолы экстрагировали кипящей водой, удаляли белки и заряженные соединения, из лиофильно высушенного образца получали триметилсилильные производные и анализировали методом ГЖХ с внутренним стандартом.

Статистический анализ. Для каждого варианта эксперименты проводили трижды ($n = 3$). Для парного сравнения вариантов использовали апостериорный тест Tukey HSD. Статистический анализ проводили с помощью MS Office Excel. На графиках (*) представляет значимое различие ($P \leq 0.05$), каждая точка данных представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее проведенные исследования показали, что *A. penicillioides* является одновременно и ксеро-, и галофилом. При этом состав осмолитов цитозоля в мицелии гриба при выращивании на средах с высоким содержанием глицерина и NaCl существенно различался, тогда как состав мембранных липидов изменялся незначительно (Danilova et al., 2022). Поэтому в данном исследовании мы также

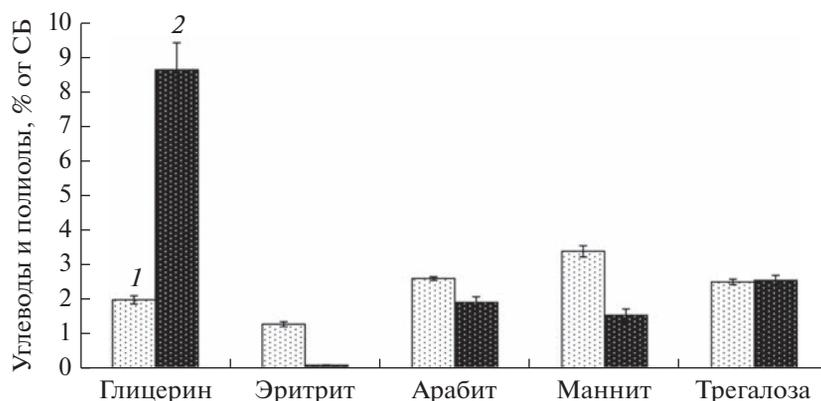


Рис. 1. Состав УиП конидий гриба, выращенных на средах с высоким содержанием NaCl (1) или глицерина (2).

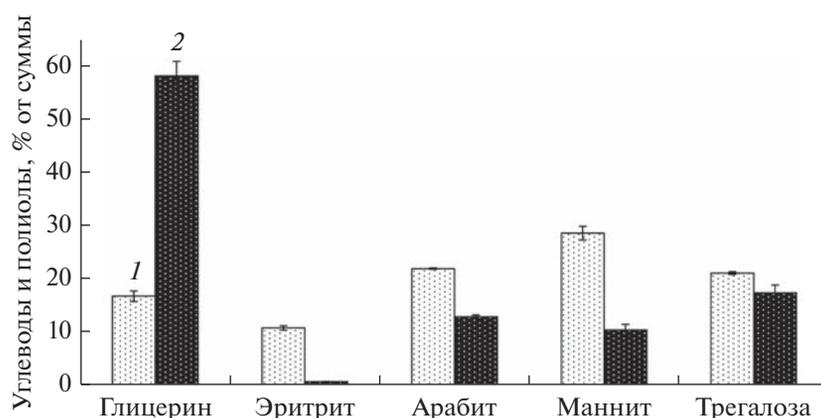


Рис. 2. Относительное содержание УиП конидий гриба, выращенных на средах с высоким содержанием NaCl (1) или глицерина (2).

анализировали состав липидов и осмолитов конидий, выращенных на двух средах с высоким содержанием глицерина и NaCl.

Состав углеводов и полиолов цитозоля в конидиях *A. penicillioides*. Углеводы и полиолы цитозоля (УиП) конидий, выращенных на среде с 2 М NaCl, составляли около 10% от сухой массы и были представлены трегалозой и рядом полиолов – глицерином, эритритом, арабитом и маннитом (рис. 1). Маннит составлял около 30% от суммы сахаров; арабит, трегалоза и глицерин – 20%, эритрит – 10% (рис. 2). Количество УиП спор гриба, выращенных на среде с 4.0 М глицерином, в полтора раза выше (15% от сухой массы), чем на среде с солью (рис. 1). Профиль УиП также существенно различался, так доминировал глицерин (60% от суммы), а доли арабита и маннита не превышали 10% (рис. 2). При этом на обеих средах количество и доля трегалозы (около 20% от суммы) практически не изменялись, а глюкоза присутствовала в следовом количестве.

Состав мембранных и запасных липидов в спорах *A. penicillioides*. Профиль мембранных липидов спор гриба, выращенных на средах с высоким содержанием глицерина и NaCl, слабо различается (рис. 3). Основными компонентами являются фосфатидилхолины (ФХ) и стерины, составляющие по 40% от суммы, в минорном количестве присутствуют фосфатидилэтаноламины (ФЭ), сфинголипиды (СЛ) и два неидентифицированных липида. Количество мембранных липидов в спорах было низкое: на среде с солью не превышало 0.35% от сухой массы, а на среде с глицерином – вдвое ниже (рис. 4).

Состав запасных липидов спор, выращенных на средах с высоким содержанием глицерина и NaCl, практически не различался (рис. 5). На обеих средах доминировали триацилглицерины (ТАГ) – 40–50% от суммы, диацилглицерины (ДАГ) и свободные жирные кислоты (СЖК) – по 20–25%. Обнаружены также эфиры стерина (около 8% от суммы) и неидентифицированный липид Y (около 2%). Нужно отметить низкое содержание липидов в спорах – не более 0.6% от сухой массы на среде с со-

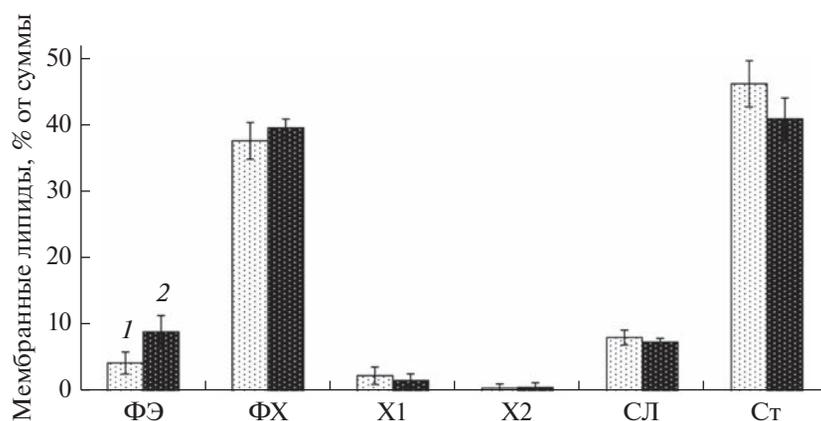


Рис. 3. Профиль мембранных липидов спор гриба, выращенных на средах с высоким содержанием NaCl (1) или глицерина (2). ФЭ – фосфатидилэтаноламины; ФХ – фосфатидилхолины; X1, X2 – неидентифицированные липиды; СЛ – сфинголипиды; Ст – стерины.

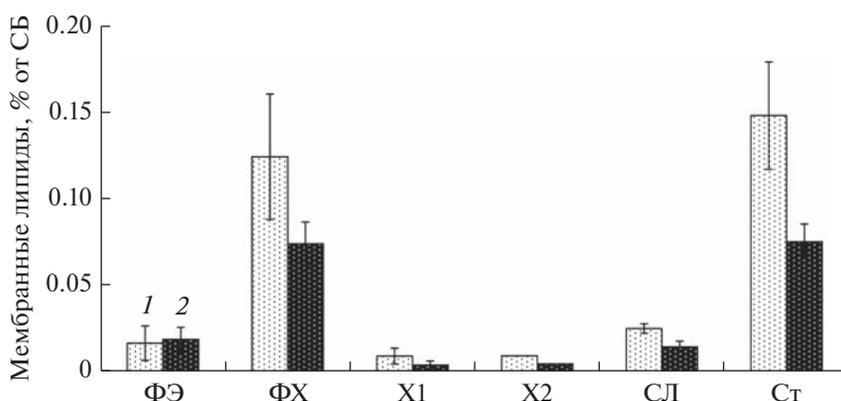


Рис. 4. Количество мембранных липидов спор гриба, выращенных на средах с высоким содержанием NaCl (1) или глицерина (2).

лью и в полтора раза ниже на среде с глицерином (рис. 6).

Основными жирными кислотами фосфолипидов были линолевая $C_{18:2}$ (39–42% от суммы), олеиновая $C_{18:1}$ (33–36%) и пальмитиновая $C_{16:0}$ (14–16%). Состав жирных кислот фосфолипидов спор, выращенных на средах с высоким содержанием глицерина или NaCl, мало различался, как и степень ненасыщенности фосфолипидов (1.1–1.15).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление состава конидий и мицелия ксерогалофильного гриба *A. penicilloides* показывает кардинальные различия как в составе мембранных липидов, так и в составе УиП. В мицелии гриба на обеих средах основными мембранными липидами были фосфатидные кислоты ФК и свободные стерины (Ст) (Danilova et al., 2022), тогда как в спорах гриба – ФХ и Ст. Нужно отметить, что в

мицелии гриба ФК составляют 40–50% от суммы, а ФХ являются минорным компонентом (5%), тогда как в конидиях доля ФХ составляет около 40%, а ФК отсутствует. В процессе роста мицелия гриба относительное содержание стерина на жидкой среде возросло на обеих средах и достигало 23% от суммы на среде с глицерином и 35% на среде с солью. В конидиях, выращенных на обеих средах, доля Ст составляла около 40%. Кроме того, в спорах отсутствовали такие фосфолипиды, как кардиолипины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозиты, лизо-ФХ, лизо-ФЭ, обнаруженные в мицелии. Количество мембранных липидов в конидиях не превышало 0.2–0.3% от сухой массы, тогда как в мицелии – на порядок больше.

Количество УиП в обоих образцах конидий достигало 10–15% от сухой массы. Учитывая малое количество запасных липидов (0.5–0.6% от сухой массы), очевидно, что именно углеводы служат энергетическим запасом клетки, используемым при прорастании спор. В мицелии гриба, выра-

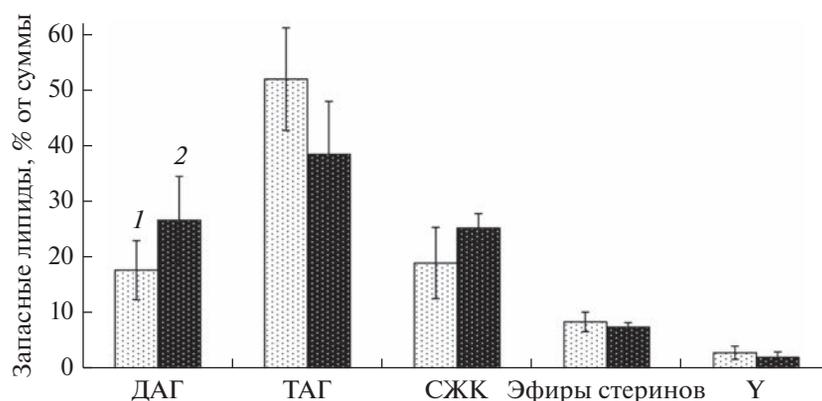


Рис. 5. Профиль запасных липидов спор гриба, выращенных на средах с высоким содержанием NaCl (1) или глицерина (2). ДАГ – диацилглицериды; ТАГ – триацилглицериды; СЖК – свободные жирные кислоты; Y – неидентифицированный липид.

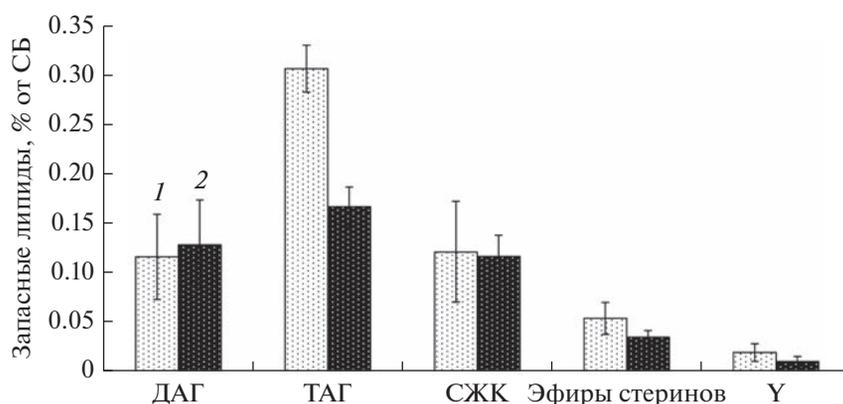


Рис. 6. Количество запасных липидов спор гриба, выращенных на средах с высоким содержанием NaCl (1) или глицерина (2).

щенного на обеих средах, наблюдалось доминирование глицерина, относительное содержание которого достигало 90% от суммы УиП в случае глицериновой среды и 70% – на среде с солью (Danilova et al., 2022). В спорах культур, выращенных на глицериновой среде, сохранялось доминирование глицерина (60%), тогда как на среде с солью не выявлено доминирования глицерина, так как глицерин, эритрит, арабит, маннит и трегалоза присутствовали в сравнимых долях (10–30%). На обеих средах в конидиях содержалось 2.5% трегалозы от сухой массы, что составляло около 20% от суммы, т.е. доля полиолов была одинакова и составляла 80%, но их состав различался в зависимости от среды выращивания.

Трегалоза является протектором макромолекул и мембран клетки (Elbein et al., 2003; Crowe, 2007; Iturriaga et al., 2009; Patel, Williamson, 2016; Rubio-Texeira et al., 2016; Glatz et al., 2016) и, как правило, накапливается в больших количествах в структурах переживания. Так в аскоспорах алкалофильного гриба *Sodiomyces alkalinus* количество

трегалозы достигало 8% от сухой массы (70% от суммы), в которых, кроме того, присутствовало около 15% запасных липидов (Kozlova et al., 2019). Трегалоза доминировала во всех видах покоящихся клеток *Blakeslea trispora* (Терешина et al., 2002).

У исследуемого гриба в конидиях преобладают полиолы, трегалоза составляет только 20% от суммы УиП и 2.5% от сухой массы. Ранее нами было показано, что в мицелии гриба в условиях ТШ также образовывалось небольшое количество трегалозы – не более 1% от сухой массы (Ianutsevich et al., 2023). Мы предположили, что это связано с тем, что глицерин может способствовать повышению термоустойчивости, так как является, как и трегалоза, универсальным антистрессорным протектором (Stevenson et al., 2017). Подобное предположение было сделано также на основании примера дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, у которых мутанты по биосинтезу глицерина (*hog1*, *gpd1gpd2* и *gpp1gpp2*) были термочувствительны (Siderius et al., 2000), однако механизм этого

взаимовоздействия неясен. Можно предположить, что выявленные различия в составе УиП в конидиях исследуемого гриба, связаны с адаптацией к окружающей среде и готовностью к прорастанию на разных средах – с высоким содержанием соли или глицерина.

Ранее нами было показано, что доля маннита, эритрита и арабита в мицелии гриба на среде с солью достигала 30% от суммы УиП, а на среде с глицерином около 1% (Danilova et al., 2022). В конидиях доминирование глицерина наблюдалось только на среде с высоким содержанием глицерина, тогда как на среде с солью все полиолы были представлены в сравнимых долях. Недавно было показано, что споры грибов, прикрепленные к спорофорам, не являются покоящимися, т.к. в них происходит процесс транскрипции, следствием которого является специфический набор мРНК в спорах, позволяющий адаптироваться к той среде, в которой происходило их созревание, чтобы ускорить будущий процесс прорастания (Wang et al., 2021). В исследованиях этих авторов впервые показано, что конидии, сформировавшиеся в различных условиях, содержат специфический набор мРНК, что обуславливает их фенотипическое разнообразие и увеличивает выживаемость в различных условиях окружающей среды. Различия в составе УиП конидий *A. penicilloides* демонстрируют, что конидии могут не только иметь разный состав мРНК, но и содержат те осмолиты, которые будут способствовать прорастанию в тех условиях, в которых происходило созревание конидий.

Соотношение мембранных и запасных липидов, в отличие от состава УиП, в конидиях гриба, выращенных на разных средах, практически не различалось. Однако обнаружены различия в количестве стериннов и ТАГ: на среде с солью их было значительно больше, что согласуется с повышенным содержанием этих компонентов в мицелии. Ранее установлено, что в мицелии гриба основными мембранными липидами являются небислойные ФК и стеринны, тогда как основной бислойный липид ФХ является минорным компонентом (Danilova et al., 2022). Количество мембранных липидов в спорах было значительно меньше, чем в мицелии, и доминируют в них другие липиды – ФХ и Ст, составляющие около 80% от суммы. Известно, что ФХ является основным бислойным липидом у грибов, способным самостоятельно образовывать липидный бислой (Hazel, 1995), а стеринны, будучи ригидными гидрофобными соединениями, способствуют стабилизации липидного бислоя, встраиваясь между ацильными цепями фосфолипидов (Mendoza de, Pilon, 2019). Фосфатидилхолины являются субстратом для фосфолипаз, что обеспечивает быстрое образование ФК, из которых образуются остальные фосфолипиды клетки (Белов и соавт., 1990). Кроме того, в спорах обнаружены сфинголипиды (около 8% от суммы), которые так-

же обладают стабилизирующим мембраны действием (Yu et al., 1986). По составу ацильных цепей фосфолипиды конидий не отличаются от фосфолипидов мицелия (Danilova et al., 2022), что характерно для спор, находящихся в состоянии экзогенного покоя (Терешина и соавт., 2002). В совокупности это показывает высокую стабильность мембран конидий исследуемого гриба. Нужно подчеркнуть, что не обнаружено различий по соотношению мембранных липидов в конидиях, выращенных на разных средах. Это указывает на консервативность состава мембран в конидиях. Напротив, в составе УиП конидий, выращенных на средах с высоким содержанием соли или глицерина, обнаружены значительные различия, что указывает на их ключевую роль в адаптации к окружающей среде.

Таким образом, исследование конидий ксерогалофила *A. penicilloides* показало стабильность состава мембранных и запасных липидов независимо от среды выращивания, в то время как состав УиП существенно различался, что указывает на ключевую роль осмолитов в адаптации гриба. Доминирование в составе мембранных липидов бислойного фосфолипида фосфатидилхолина и стериннов, а также присутствие сфинголипидов свидетельствует о высокой стабилизации липидного бислоя в конидиях гриба. В конидиях культур, выращенных на среде с глицерином, наблюдается его доминирование в составе УиП, тогда как на среде с солью глицерин, эритрит, арабит, маннит и трегалоза присутствуют в сравнимых долях. Общей закономерностью является одинаково низкое количество (2.5%) и доля (20%) трегалозы независимо от среды культивирования, что, возможно, связано с небольшим количеством мембранных липидов в конидиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белов А. П., Зинченко Г. А., Ефременко А. А. Изучение путей обмена жирными кислотами между фосфолипидами и триацилглицеринами у термотолерантных дрожжей *Candida rugosa* // Микробиология. 1990. V. 59. P. 976–981.

- Терешина В.М., Меморская А.С., Кочкина Г.А., Феофилова Е.П. Покоящиеся клетки в цикле развития *Blakeslea trispora*: отличия в липидном и углеводном составе // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 794–800.
- Tereshina V.M., Memorskaia A.S., Kochkina G.A., Feofilova E.P. Dormant cells in the developmental cycle of *Blakeslea trispora*: distinct patterns of the lipid and carbohydrate composition // Microbiology. 2002. V. 71. P. 684–689. <https://doi.org/10.1023/A:1021432007070>
- Терешина В.М. Термоустойчивость у грибов: роль белков теплового шока и трегалозы // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 293–304.
- Tereshina V.M. Thermotolerance in fungi: the role of heat shock proteins and trehalose // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 247–257. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0059-y>
- Феофилова Е.П., Иващечкин А.А., Алёхин А.И., Сергеева Я.Э. Споры грибов: покой, прорастание, химический состав (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. V. 48. P. 5–17.
- Feofilova E.P., Ivashchkin A.A., Alekhin A.I., Sergeeva Y.E. Fungal spores: dormancy, germination, chemical composition, and role in biotechnology (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 1–11. <https://doi.org/10.1134/S0003683812010048>
- Argüelles J.-C., Guirao-Abad J.P., Sánchez-Fresneda R. Trehalose: A crucial molecule in the physiology of fungi // Reference module in life sciences. Elsevier, 2017. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12084-9>
- Barrera C.R. Formation and germination of fungal arthroconidia // Crit. Rev. Microbiol. 1986. V. 12. P. 271–292. <https://doi.org/10.3109/10408418509104431>
- Crowe J.H. Trehalose as a “chemical chaperone”: fact and fantasy // Adv. Exp. Med. Biol. 2007. V. 594. P. 143–158. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39975-1_13
- Danilova O.A., Ianutsevich E.A., Bondarenko S.A., Antropova A.B., Tereshina V.M. Membrane lipids and osmolytes composition of xerohalophilic fungus *Aspergillus penicillioides* during growth on high NaCl and glycerol Media // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 503–513. <https://doi.org/10.1134/S0026261722601373>
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule // Glycobiology. 2003. V. 13. P. 17R–27R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Glatz A., Pilbat A., Németh G.L., Vince-Kontár K., Jósavay K., Hunya Á., Udvardy A., Gombos I., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vigh L., Török Z. Involvement of small heat shock proteins, trehalose, and lipids in the thermal stress management in *Schizosaccharomyces pombe* // Cell Stress Chaperones. 2016. V. 21. P. 327–338. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0662-4>
- Hazel J.R. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? // Annu. Rev. Physiol. 1995. V. 57. P. 19–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.000315>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Kotlova E.R., Tereshina V.M. Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // Microbiology (SGM). 2016. V. 162. P. 989–999. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000279>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Antropova A.B., Tereshina V.M. Acquired thermotolerance, membrane lipids and osmolytes profiles of xerohalophilic fungus *Aspergillus penicillioides* under heat shock // Fungal Biol. 2023. V. 127. P. 909–917. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.01.002>
- Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling // Int. J. Mol. Sci. 2009. V. 10. P. 3793–3810. <https://doi.org/10.3390/ijms10093793>
- Kahraman M., Sevim G., Bor M. The role of proline, glycinebetaine, and trehalose in stress-responsive gene expression // Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants / Ed. Hossain M. et al. Cham: Springer Int. Publishing, 2019. P. 241–256. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27423-8_11
- Kogej T., Stein M., Volkmann M., Gorbushina A.A., Galinski E.A., Gunde-Cimerman N. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization // Microbiology (SGM). 2007. V. 153. P. 4261–4273. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010751-0>
- Kosar F., Akram N.A., Sadiq M., Al-Qurainy F., Ashraf M. Trehalose: a key organic osmolyte effectively involved in plant abiotic stress tolerance // J. Plant Growth Regul. 2019. V. 38. P. 606–618. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9876-x>
- Kozlova M.V. Life cycle in a haloalkalitolerant ascomycete *Heleococcum alkalinum* Bilanenko et Ivanova // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2006. <https://doi.org/10.13140/2.1.2702.8800>
- Kozlova M.V., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Kamzolkina O.V., Tereshina V.M. Lipids and soluble carbohydrates in the mycelium and ascocata of alkaliphilic fungus *Sodiomyces alkalinus* // Extremophiles. 2019. V. 23. P. 487–494. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01100-z>
- Mendoza D. de, Pilon M. Control of membrane lipid homeostasis by lipid-bilayer associated sensors: a mechanism conserved from bacteria to humans // Prog. Lipid Res. 2019. V. 76. P. 100996. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.100996>
- Oshero N., May G.S. The molecular mechanisms of conidial germination // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 199. P. 153–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x>
- Patel T.K., Williamson J.D. Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 486–497. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.006>
- Petrova-Nikitina A.D., Antropova A.B., Mokeeva V.L., Chekunova L.N., Bilanenko E.N., Bulgakova T.A., Zheltikova T.M. To the study of biocenotic relationships between house dust mites (Acariformes: *Pyroglyphidae*) and mould fungi // Acarina. 2005. V. 13. P. 75–84.
- Prista C., Loureiro-Dias M.C., Montiel V., García R., Ramos J. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii* // FEMS Yeast Res. 2005. V. 5. P. 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.12.009>
- Rubio-Teixeira M., Zeebroeck G. Van, Thevelein J.M. Trehalose metabolism: enzymatic pathways and physiological functions // The Mycota: A Treatise on the Biology of Fungi with Emphasis on Systems for Fundamental and Applied Research / Ed. Hoffmeister D. Cham: Springer Interna-

tional Publishing, 2016. P. 191–277.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-27790-5_10

Siderius M., Wuytswinkel O. Van, Reijenga K.A., Kelders M., Mager W.H. The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 36. P. 1381–1390.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01955.x>

Stevenson A., Hamill P.G., Medina Á., Kminek G., Rummel J.D., Dijksterhuis J., Timson D.J., Magan N., Leong S.L.L., Halls-worth J.E. Glycerol enhances fungal germination at the water-activity limit for life // *Environ. Microbiol.* 2017. V. 19. P. 947–967.

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13530>

Sussman A.S., Halvorson H.O. Spores their dormancy and germination. New York: Harper & Row, 1966. 354 p.

Tapia H., Koshland D.E. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. P. 2758–2766.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.005>

Wang F., Sethiya P., Hu X., Guo S., Chen Y., Li A., Tan K., Wong K.H. Transcription in fungal conidia before dormancy produces phenotypically variable conidia that maximize survival in different environments // *Nat. Microbiol.* 2021. V. 6. P. 1066–1081.

<https://doi.org/10.1038/s41564-021-00922-y>

Yancey P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. P. 2819–2830.

<https://doi.org/10.1242/jeb.01730>

Yu R.K., Koerne, T.A.W., Scarsdale J.N., Prestegard J.H. Elucidation of glycolipid structure by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Chem. Phys. Lipids.* 1986. V. 42. P. 27–48.

[https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90041-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90041-1)

Zajc J., Kogej T., Galinski E.A., Ramos J., Gunde-Cimerman N. Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 247–256.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02702-13>

Osmolytes and Lipids of the Conidia of the Xerohalophilic Micromycete *Aspergillus penicillioides*

O. A. Danilova^{1, *}, E. A. Ianutsevich¹, A. B. Antropova², and V. M. Tereshina¹

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

² *Federal State Scientific Institution “Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera”, Moscow 105064 Russia*

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

Received July 13, 2023; revised July 17, 2023; accepted July 18, 2023

Abstract—Investigation of the lipid and osmolyte composition in conidia of the xerohalophile *Aspergillus penicillioides* grown on media with high concentrations of NaCl and glycerol is important for the understanding of the functions of these compounds in the adaptation of the extremophile. Conidia of the fungus grown on a medium with glycerol contained up to 15% of the dry mass of carbohydrates and polyols (CaP) of the cytosol, with predominance of glycerol (60% of the total) in their composition, while on a medium with salt, the proportion of glycerol did not exceed 20%, and the amount of CaP was 10%. On both media, the proportion (20%) and amount (2.5%) of trehalose were the same; the proportion of polyols was thus about 80%, although their composition was different, indicating a possible synergy between trehalose and polyols in adaptation. Both variants of conidia were characterized by a low content of both membrane and storage lipids, represented mainly by triacylglycerides. Phosphatidylcholines and sterols were the predominant membrane lipids of the fungal conidia, regardless of the composition of the medium, which indicated high stability and conservatism of the lipid bilayer. The constancy of the composition of membrane and storage lipids and their low content, the high level of CaP, and significant differences in their composition indicate the key role of osmolytes in the adaptation of fungal conidia to various environmental conditions.

Keywords: filamentous fungi, xerophilia, halophilia, trehalose, glycerol

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ СПОСОБНОСТИ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА
РОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ У РИЗОБИЙ© 2023 г. Ал. Х. Баймиев^а *, А. А. Владимирова^а, Р. Т. Матниязов^а, А. М. Лавина^а,
К. Ю. Филяева^а, Е. С. Акимова^а, Ан. Х. Баймиев^а^а Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: baymiev@mail.ru

Поступила в редакцию 19.06.2023 г.

После доработки 06.07.2023 г.

Принята к публикации 07.07.2023 г.

Проведен скрининг 1019 штаммов ризобий *Rhizobium leguminosarum* и *Neorhizobium galegae* из коллекции симбиотических ризосферных микроорганизмов “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН, изолированных из клубеньков 20 видов бобовых растений, на способность подавлять рост родственных штаммов ризобий. Исследования показали, что подавление роста конкурирующих бактерий ризобиями довольно распространенное явление. В среднем, при выращивании на богатых средах около 10% штаммов ризобий выделяли в среду антибактериальные вещества. Отмечено, что когда на газон бактерий наносилась живая культура ризобий, процент подавления был выше. Также процент штаммов, синтезирующих антибактериальные вещества, в некоторой степени соотносится с уровнем генетического разнообразия популяции микросимбионтов бобового растения. Слабый сигнал нарушения синтеза белка обнаружен при исследовании механизма действия метаболитов 20 штаммов ризобий *R. leguminosarum* bv. *viciae* из клубеньков чины болотной и чины весенней. В остальных случаях характер антибактериального действия метаболитов бактерий с применением системы DualRep2 определить не удалось.

Ключевые слова: ризобии, подавление роста бактерий, антибактериальный механизм**DOI:** 10.31857/S0026365623600311, **EDN:** BSITVE

Ризобии или клубеньковые бактерии, вступающие в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, довольно хорошо изучены. Это связано как с фундаментальным интересом к проблеме взаимодействия растения и бактерий, находящихся в эволюционном процессе образования новой органеллы клеток – симбиосомы, так и с практическим. Поскольку фиксация атмосферного азота в соединения, способные усваиваться растением, в клубеньках происходит за счет “экологически чистой” энергии Солнца. Тем не менее, с точки зрения экологии симбиотических микроорганизмов, вопросы регуляции их численности, взаимодействия с микрофлорой ризосферы в процессах инициации формирования клубенька, происходящих в ризосфере и ризоплане растения-хозяина, остаются не до конца решенными.

Одни из таких вопросов – как происходит регуляция численности и состава ризосферных микроорганизмов на месте формирования инфекционной нити? Почему именно этот штамм в конечном итоге сформировал клубенек?

Некоторые ответы на эти вопросы были получены еще в 60-х гг. прошлого века с обнаружением у некоторых ризобий бактериоцинов – соедине-

ний различной природы, специфично подавляющих рост гомологичных бактерий. Способность синтезировать и выделять в окружающую среду бактериоцины позволяет штамму ризобий контролировать численность других бактерий и дает неоспоримые преимущества в конкурентной борьбе за возможность формировать клубенек. Эти соединения были условно разделены на малые, средние и большие бактериоцины на основе их предполагаемых размеров и характеристик диффузии (Schwingamer, Brockwell, 1978; Hirsch, 1979). Впоследствии оказалось, что малые бактериоцины представляют собой N-ацил-гомосеринлактоны (AHL) и относятся к сигналам чувства кворума ризобий (Fuqua et al., 1994). Крупные бактериоцины были идентифицированы как дефектные бактериофаги (Schwingamer et al., 1973). Наибольший интерес с практической точки зрения представляют средние, имеющие пептидную природу антибактериальные соединения, которые и называют сейчас бактериоцинами. К настоящему времени хорошо описаны два рибосомно синтезируемых и посттрансляционно модифицированных пептида (RiPP) – трифолитоксин (Triplett et al., 1987; Lethbridge et al., 2022) и фазолицин (Travin et al., 2019),

которые работают как узкоспецифичные антибиотики. Фазолизин — очень узкоспециализированный ингибитор трансляции, который блокирует работу рибосом лишь некоторых бактерий порядка *Rhizobiales* и представляет интерес не только как регулятор численности ризобий, но и как перспективная антибактериальная молекула.

До сих пор исследования синтеза ризобиями соединений, подавляющих или регулирующих численность постронной микрофлоры (по большей части родственной, вследствие конкуренции за формирование клубенька), имели частный характер и проводились на единичных штаммах. Практически нет данных о характере распространения явления и параметров синтеза антибактериальных соединений в природных популяциях ризобий, что крайне важно для исследования экологии сообществ симбиотических бактерий.

Целью данной работы являлось исследование распространенности и молекулярных механизмов способности к подавлению роста родственных бактерий у штаммов ризобий, вступающих в симбиоз с дикорастущими бобовыми растениями Южного Урала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись 1019 штаммов ризобий из коллекции “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН. Из них 769 штаммов относились к *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, 147 — к *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, 10 — к *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* и 93 — к *Neorhizobium galegae*. Штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* включали 31 штамм ризобий горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.), 15 штаммов ризобий горошка гороховидного (*V. pisiformis* L.), 78 штаммов ризобий горошка заборного (*V. sepium* L.), 33 штамма ризобий горошка мышинового (*V. cracca* L.), 168 штаммов ризобий чины весенней (*Lathyrus vernus* L. Bernh.), 77 штаммов ризобий чины бледноватой (*L. pallescens* (Vieb.) S. Koch), 48 штаммов ризобий чины болотной (*L. palustris* L.), 87 штаммов ризобий чины лесной (*L. sylvestris* L.), 64 штамма ризобий чины Литвинова (*L. litvinovii* Ijijn), 49 штаммов ризобий чины клубненоносной (*L. tuberosus* L.), 51 штамм ризобий чины гороховидной (*L. pisiformis* L.), 41 штамм ризобий чины луговой (*L. pratensis* L.), 27 штаммов ризобий чины Гмелина (*L. gmelinii* Fritsch). Штаммы *R. leguminosarum* bv. *trifolii* включали 52 штамма ризобий клевера лугового, 13 штаммов ризобий клевера люпиновидного, 15 штаммов ризобий клевера белого, 10 штаммов ризобий клевера среднего, 57 штаммов ризобий клевера розового. Штаммы *N. galegae* включали 93 штамма ризобий козлятника восточного (*Galega orientalis*). Штаммы *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* включали 10 штаммов ризобий фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*).

Культивирование. Для получения бактериального газона использовали штаммы клубеньковых бактерий из коллекции “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН: *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSy19, изолированный из клубеньков горошка лесного, и *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* PVu2 из клубеньков фасоли обыкновенной. На чашку Петри с агаризованной питательной средой ТУ (1% триптон, 0.1% дрожжевой экстракт, 0.1% CaCl₂) наносили 3 мл двухсуточной культуры бактерий, инкубированной в термостатируемом шейкере ES-20 (“BioSan”, Латвия) при 28°C. Чашку Петри покачивали до равномерного распределения жидкости, оставшуюся часть которой удаляли, используя дозатор со сменными стерильными наконечниками. После этого чашки Петри оставляли приоткрытыми для подсушивания посева в боксе микробиологической безопасности БМБ-II “Ламинар-С”-1,2. Далее бактерии инкубировали в термостате при 28°C в течение суток.

Для получения газона *E. coli* JW5503(ΔtolC) использовали ночную культуру рекомбинантного штамма, выращенную в питательной среде LB (Лурия-Бертани) с добавлением ампициллина (50 мкг/мл).

Анализ на продукцию антимикробных веществ.

Штаммы ризобий после криохранения высаживали на твердую питательную среду УМ. Далее наращивали бактериальную суспензию исследуемых штаммов в 4 мл питательной среды RM в 15 мл пробирках типа Falcon. Пробирки инкубировали в термостатируемом шейкере ES-20 (“BioSan”, Латвия) при 28°C в течение 2 сут. При необходимости получения большего объема бактериальной суспензии штаммы для подложки выращивали в стеклянных колбах объемом 100 мл. Для анализа продукции бактериями антимикробных соединений отбирали по 500 мкл суспензии и переносили в стерильные пробирки эппендорф. Затем осаждали бактерии при 3000 g в течение 5 мин в центрифуге MiniSpinPlus (“Eppendorf”, Германия). Далее на бактериальный газон наносили по 0.5 мкл непосредственно суспензии клеток и по 5 мкл надосадочной жидкости. Чашки помещали на сутки в термостат: 28°C для ризобияльного газона и 37°C для *E. coli*. По окончании инкубации проводили визуальную оценку зон подавления роста газона бактерий с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (“Bio-Rad”, США).

Определение механизма действия антибактериальной активности образцов проводили с использованием газона клеток *E. coli* JW5503(ΔtolC) с плазмидой pDualRep2 (рис. 1д, 1е). Вектор pDualRep2 содержит гены двух флуоресцентных белков: RFP (максимум испускания 584 нм) и Katushka2S (максимум испускания 635 нм). В случае если антибиотик действует на процесс синтеза белка — задержка работы рибосомы (например, RiPP пеп-

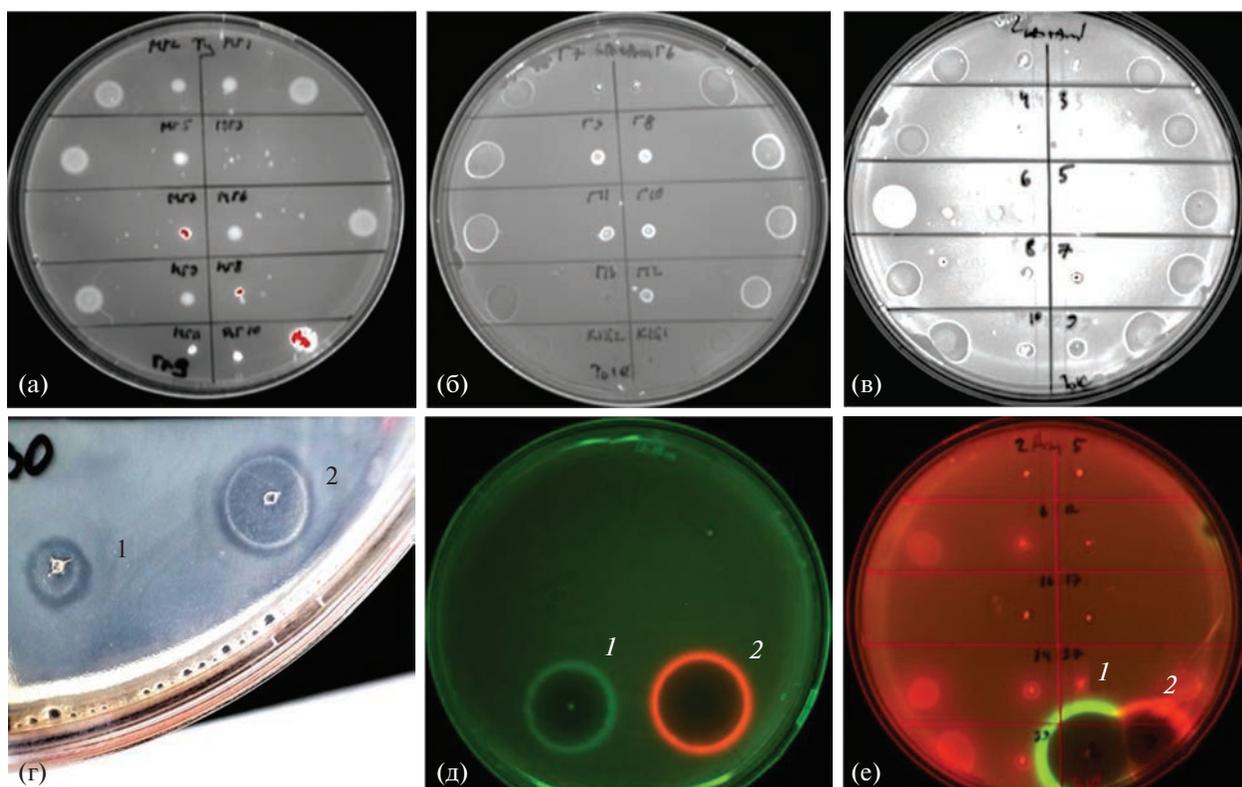


Рис. 1. Примеры подавления роста бактерий штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae*, изолированными из клубеньков чины болотной: а – на газоне клеток *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSyl9; б – на газоне клеток *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* PVu2; в – на газоне клеток *E. coli* JW5503(Δ tolC) (обычный свет); г – ореол подавления роста вокруг нанесенных живых бактерий (1) и культуральной жидкости (2); д, е – на газоне клеток *E. coli* JW5503(Δ tolC) с плазмидой pDualRep2 в гель-документирующей системе ChemiDoc MP. Контрольные антибиотики: левофлоксацин (1), эритромицин (2).

тиды, эритромицин), экспрессия дальне-красного белка *Katushka2S* возрастает. Экспрессия красного флуоресцентного белка RFP увеличивается в случае включения в клетке SOS-ответа на массовое повреждение ДНК (например, левофлоксацин) (Osterman et al., 2016). Антибактериальную активность веществ оценивали по размеру пятна подавления роста и, при наличии, по цвету ореола вокруг него на газоне клеток *E. coli* с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (“Bio-Rad”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В начале работы проводили подбор питательных сред и отработку методики культивирования ризобий с наибольшим выходом антибактериальных метаболитов, поскольку клубеньковые бактерии из коллекции “Симбионт” относятся к разным родам и различаются как скоростью деления клеток, так и прочими физиологическими параметрами. В качестве контроля использовали синтезирующий фазолицин штамм *Rhizobium* sp. Por5, любезно предоставленный для исследований профессором Martinez Romero (Travin et al., 2019).

Исследования показывают, что продукция бактериоцина у ризобий происходит спонтанно во время ранней и средней экспоненциальной фазы роста бактерий в жидкой культуре (Schwinghammer, 1975). Выработка фазолицина у штамма *Rhizobium* sp. Por5 наблюдалась нами при выращивании на следующих питательных средах: YM (1% маннитол, 0.01% NaCl, 0.05% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4$, 0.04% дрожжевой экстракт); RM (1% маннитол, 0.01% NaCl, 0.05% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4$, 0.1% дрожжевой экстракт; pH 6.8); C40 (2% сахара, 0.02% KH_2PO_4 , 0.08% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, FeCl₃ (следы), Na₂MoO₄ (следы), 0.04% дрожжевой экстракт); TY (1% триптон, 0.1% дрожжевой экстракт, 0.1% CaCl₂). Лучшие результаты (по величине пятна подавления) наблюдали при использовании среды RM.

При подборе бактерий для получения газона выяснилось, что не все штаммы ризобий из коллекции дают стабильно ровный слой клеток. На средах, дающих стабильную наработку фазолицина у *Rhizobium* sp. Por5, штаммы рода *Sinorhizobium* (*Ensifer*) формировали неравномерный слой клеток вследствие чрезмерной наработки полисахаридов, что сильно затрудняло анализ результа-

тов. Штаммы *Mezorhizobium*, характеризующиеся более медленным ростом на питательных средах и образующие колонии на чашках Петри на 5–6 сут культивирования, также не формировали равномерного газона. Таким образом, для получения бактериального газона были отобраны штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSyl9 и *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* PVu2, которые не подавляли рост других бактерий и стабильно наращивались в жидкой питательной среде YM в течение 2 сут (рис. 1а, 1б). В дальнейшую работу брали только штаммы ризобий из рода *Rhizobium*, собранные из клубеньков различных дикорастущих растений Южного Урала.

Так как на питательных средах YM, RM и C40 колонии ризобий ослизнились, для получения газона бактерий использовалась неуглеводная питательная среда TY. Бактерии *E. coli* для газона выращивали на богатой белковой среде LB.

Наиболее адекватные результаты ингибирования роста получались при нанесении на газон клеток 5 мкл супернатанта свежей ночной культуры ризобий. Изначально планировалось на газон бактерий наносить каплю культуральной среды и экстракта цитоплазмы разрушенных клеток каждого штамма ризобий. Однако последний вариант давал неоднозначные результаты при всех вариантах способов разрушения клеток (механические, ферментативные, криогенные) и способов фракционирования их содержимого (центрифугирование, высаливание, разделение спиртом и ацетоном и др.). Поэтому от него отказались в пользу точечного нанесения на газон 0.5 мкл культуры испытуемого штамма (рис. 1г).

В общей сложности было проанализировано 1019 штаммов ризобий из коллекции “Симбионт”. На газоне *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSyl9 из 1019 исследованных штаммов 113 (11.1%) показали подавление роста при воздействии среды, где они культивировались, и 142 (13.9%) – непосредственно живых ризобий; на газоне *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* PVu2 из 1019 штаммов 126 (12.4%) при воздействии среды и 252 (24.7%) – культуры ризобий; на газоне *E. coli* JW5503(Δ tolC) из 1019 штаммов 582 (57.1%) при воздействии среды и 249 (24.4%) – культуры ризобий (табл. 1).

Результаты исследования показывают, что подавление роста конкурирующих бактерий штаммами ризобий довольно распространенное явление. В среднем, при выращивании на богатых средах, более 10% штаммов ризобий нарабатывали и секретировали в среду вещества, подавляющие рост бактерий. Отмечено, что когда на газон наносилась живая культура ризобий, процент подавления в среднем был выше. Особенно это заметно у ризобий чины весенней, чины клубненосной и козлятника восточного. Однако в то же время у бактерий чины гороховидной наблюдается обратная картина. Это можно объяснить тем, что в некоторых случаях синтез антибактериальных со-

единений активируется в присутствии бактерий газона, хотя предварительные опыты на нескольких штаммах ризобий, в том числе на *Rhizobium* sp. Pop5, показали отсутствие усиления синтеза антибактериальных веществ при добавлении в культуру живых и мертвых бактерий *Rhizobium* и *E. coli*.

Процент штаммов, синтезирующих антибактериальные вещества, в некоторой степени коррелирует с их уровнем панмиктичности, выраженной в генетическом разнообразии бактерий в популяции (Баймиев и соавт., 2012). То есть, чем большее генетическое разнообразие показывают RAPD- и ПДРФ-профили изолятов из клубеньков растения, тем больше среди них штаммов, продуцирующих антибактериальные вещества. Вероятно, феномен связан с отбором “агрессивных” штаммов в условиях жесткой конкуренции между бактериями за формирование клубенька. В целом, штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* проявляют большую антибактериальную активность, чем *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. У штаммов *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* подавление роста газона ризобий не наблюдали, хотя штамм *Rhizobium* sp. Pop5, продуцирующий фазолицин, был выделен из клубеньков дикой фасоли, произрастающей в лесах Лос-Тукстлас (Мексика).

Механизм действия антибактериальной активности штаммов исследовали на газоне клеток *E. coli* JW5503(Δ tolC) с плазмидой pDualRep2. Штамм *E. coli* JW5503(Δ tolC) сверхчувствителен к антибиотикам, поскольку состоит из бактерий с удаленным геном *tolC* (Baba, Mori, 2008). TolC является основным порином системы эффлюкса, выводящим различные соединения из клетки через внешнюю мембрану. Поэтому на нем хорошо проявляется действие антибактериальных соединений в виде подавления роста газона. Метод добавления живых ризобий на газон *E. coli* оказался не очень эффективным вследствие более быстрого роста последних. Так как антибактериальные метаболиты ризобий не убивали, а только подавляли рост бактерий газона, то вместо темного пятна и цветного ореола, наблюдаемых при действии контрольных антибиотиков, наблюдали темные и цветные пятна (рис. 1е). При этом сигнала SOS-ответа при воздействии супернатантов и культур ризобий обнаружено не было. Слабый сигнал нарушения синтеза белка выявлен при исследовании метаболитов 20 штаммов ризобий *R. leguminosarum* bv. *viciae* из клубеньков чины болатной и чины весенней.

К сожалению, в остальных случаях характер антибактериального действия метаболитов бактерий с применением системы DualRep2 определить не удалось. Видимо, в большинстве случаев для подавления роста конкурирующих штаммов ризобий используют иные механизмы, нежели синтез бактериоцинов, подавляющих синтез белка или вызывающих нарушение метаболизма нуклеиновых

Таблица 1. Подавление роста клеток газона бактерий метаболитами и живыми культурами ризобий

Вид бактерий	Растение-хозяин (количество штаммов ризобий, взятых в анализ)	Штамм бактерий газона						
		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VSyl9		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> PVu2		<i>E. coli</i> JW5503(ΔtolC)		
		°	●	°	●	°	●	
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	bv. <i>viciae</i>	Горошек лесной (31)	1 (3.2%)	– (0%)	1 (3.2%)	– (0%)	– (0%)	21 (67.7%)
		Горошек гороховидный (15)	– (0%)	– (0%)	– (0%)	– (0%)	– (0%)	9 (60%)
		Горошек заборный (78)	10 (12.8%)	2 (2.6%)	10 (12.8%)	2 (2.6%)	16 (20.5%)	10 (12.8%)
		Мышиный горошек (33)	– (0%)	– (0%)	– (0%)	– (0%)	8 (24.2%)	23 (69.7%)
		Чина бледноватая (77)	11 (14.3%)	16 (20.8%)	18 (23.4%)	22 (28.6%)	5 (6.5%)	77 (100%)
		Чина болотная (48)	3 (6.2%)	3 (6.2%)	3 (6.2%)	2 (4.2%)	17 (35.4%)	32 (66.7%)
		Чина лесная (87)	9 (10.3%)	2 (2.3%)	22 (25.3%)	18 (20.7%)	15 (17.2%)	42 (48.3%)
		Чина Литвинова (64)	1 (1.6%)	16 (25%)	28 (43.7%)	20 (31.2%)	35 (54.7%)	59 (92.2%)
		Чина клубненосная (49)	17 (34.7%)	2 (4.1%)	38 (77.5%)	6 (12.2%)	10 (20.4%)	20 (40.8%)
		Чина гороховидная (51)	5 (9.8%)	34 (66.7%)	5 (9.8%)	18 (35.3%)	30 (58.8%)	48 (94.1%)
		Чина луговая (41)	3 (7.3%)	5 (12.2%)	3 (7.3%)	4 (9.7%)	6 (14.6%)	20 (48.8%)
		Чина весенняя (168)	52 (30.9%)	21 (12.5%)	92 (54.8%)	18 (10.7%)	52 (30.9%)	94 (55.9%)
	Чина Гмелина (27)	5 (18.5%)	3 (11.1%)	4 (14.8%)	1 (3.7%)	– (0%)	4 (14.8%)	
	bv. <i>trifolii</i>	Клевер луговой (52)	1 (1.9%)	– (0%)	2 (3.8%)	3 (5.8%)	10 (19.2%)	19 (36.5%)
		Клевер люпиновидный (13)	– (0%)	2 (15.4%)	– (0%)	– (0%)	3 (23.1%)	9 (69.2%)
Клевер белый (15)		2 (13.3%)	– (0%)	1 (6.7%)	– (0%)	12 (80%)	15 (100%)	
Клевер средний (10)		– (0%)	– (0%)	– (0%)	– (0%)	3 (30%)	8 (80%)	
Клевер розовый (57)		5 (8.8%)	3 (5.3%)	3 (5.3%)	6 (10.5%)	12 (21.0%)	29 (50.9%)	
bv. <i>phaseoli</i>	Фасоль обыкновенная (10)	– (0%)	– (0%)	– (0%)	– (0%)	2 (20%)	10 (100%)	
<i>Neorhizobium galegae</i>	Козлятник восточный (93)	17 (18.3%)	4 (4.3%)	22 (23.6%)	6 (6.4%)	13 (14.0%)	33 (35.5%)	

Примечание. ° – укол бактериями; ● – культуральная жидкость.

кислот. Такие как, например, включение чувства кворума через синтез AHL (Fuqua et al., 1994).

Вполне возможно, что штаммов ризобий, синтезирующих антибактериальные пептиды гораздо больше, чем обнаруживается с помощью системы DualRep2. К сожалению, уверенную детекцию включения синтеза флуоресцентных белков можно гарантировать только при хроматографической концентрации антибактериальных метаболитов в образце, даже у контрольного штамма *Rhizobium* sp. Pop5 (Travin et al., 2019).

Показано, что RiPP-пептиды попадают в клетки ризобий сразу двумя путями – через переносчики пептидов VasA и YejABEF, необходимые для установления симбиоза с бобовыми, что делает

затруднительным приобретение устойчивости к таким антибиотикам (Travin et al., 2023). Поэтому ризобиальные бактериоцины представляют интерес с практической точки зрения как агенты биоконтроля численности ризобактерий в почве и являются перспективными молекулами для создания новых антибиотиков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00193, <https://rscf.ru/project/22-24-00193/>.

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

- Баймиев А.Х., Иванова Е.С., Птицын К.Г., Белимов А.А., Сафронова В.И., Баймиев Ал.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых Южного Урала // Мол. генет. микробиол. вирусол. 2012. Т. 27. С. 29–34.
- Baimiev An.K., Ivanova E.S., Ptitsyn K.G., Belimov A.A., Safronova V.I., Baimiev Al.K. Genetic characterization of wild leguminous nodular bacteria living in the South Urals // Mol. Genet. Microbiol. Virol. 2012. V. 27. P. 33–39.
- Baba T., Mori H. The construction of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection in *Escherichia coli* K-12 // In Microbial Gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics / Methods in Molecular Biology: Humana Press, 2008. P. 171–181.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 269–275.
- Hirsch P.R. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 113. P. 219–228.
- Lethbridge B.J., Asenstorfer R.E., Bailey L.S., Breil B.T., Johnson J.V., Jones G.P., Rumjanek V., Sims J.J., Tate M.E., Triplett E.W. Post translational modifications of Trifolitoxin: a blue fluorescent peptide antibiotic // J. Antibiotics. 2022. V. 75. P. 125–135.
- Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2016. V. 60. P. 7481–7489.
- Schwinghamer E.A. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii* // J. Gen. Microbiol. 1975. V. 91. P. 403–413.
- Schwinghamer E.A., Brockwell J. Competitive advantage of bacteriocin and phage-producing strains of *Rhizobium trifolii* in mixed culture // Soil Biol. Biochem. 1978. V. 10. P. 383–387.
- Schwinghamer E.A., Pankhurst C.E., Whitfeld P.R. A phage-like bacteriocin of *Rhizobium trifolii* // Can. J. Microbiol. 1973. V. 19. P. 359–368.
- Travin D.Y., Jouan R., Vigouroux A., Inaba-Inoue S., Lachat J., Haq F., Timchenko T., Sutormin D., Dubiley S., Beis K., Moréra S., Severinov K., Mergaert P. Dual-uptake mode of the antibiotic phazolicin prevents resistance acquisition by gram-negative bacteria // mBio. 2023. V. 14. P. e00217–23.
- Travin D.Y., Watson Z.L., Metelev M., Ward F.R., Osterman I.A., Khven I.M., Khabibullina N.F., Serebryakova M., Mergaert P., Polikanov Y.S., Cate J.H.D., Severinov K. Structure of ribosome-bound azole-modified peptide phazolicin rationalizes its species-specific mode of bacterial translation inhibition // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 4563.
- Triplett E.W., Barta T.M. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover // Plant. Physiol. 1987. V. 85. P. 335–342.

Occurrence of the Ability to Suppress the Growth of Related Strains in Rhizobia

Al. Kh. Baymiev¹*, A. A. Vladimirova¹, R. T. Matniyazov¹, A. M. Lavina¹,
K. Yu. Filyaeva¹, E. S. Akimova¹, and An. Kh. Baymiev¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: baymiev@mail.ru

Received June 19, 2023; revised July 6, 2023; accepted July 7, 2023

Abstract—Screening of 1019 strains of rhizobia *Rhizobium leguminosarum* and *Neorhizobium galegae* from the “Symbiont” collection of symbiotic rhizospheric microorganisms of the Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, which have been isolated from root nodules of 20 leguminous species, for the ability to suppress the growth of related strains of rhizobia was carried out. Inhibition of the growth of competing bacteria by rhizobia was shown to be rather common. On average, when grown on rich media, ~10% of rhizobial strains released antibacterial substances into the medium. At the same time, when a live culture of rhizobia was applied to the lawn of bacteria, the percentage of suppression was higher. The percentage of strains synthesizing antibacterial substances correlated also, to some extent, with the level of genetic diversity of the population of legume microsymbionts. A weak signal of impaired protein synthesis was found in the study of the mechanism of action of metabolites of 20 strains of rhizobia *R. leguminosarum* bv. *viciae* from root nodules of *Lathyrus palustris* and *Lathyrus vernus*. In other cases, the nature of the antibacterial action of bacterial metabolites could not be determined using the DualRep2 system.

Keywords: rhizobia, bacterial growth suppression, antibacterial mechanism

ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИОЦИНА СУБТИЛОЗИНА П19 НА СПОРЫ *Bacillus anthracis*

© 2023 г. В. Д. Похиленко^а, *, В. Н. Герасимов^а, С. К. Жиглецова^а, Т. А. Калмантаев^а,
И. А. Чукина^а, Р. И. Миронова^а, А. Р. Гайтрафимова^а

^а Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора,
Оболенск, Московская обл., 142279 Россия

*e-mail: pokhilenko@obolensk.org

Поступила в редакцию 15.03.2023 г.

После доработки 31.05.2023 г.

Принята к публикации 20.06.2023 г.

Впервые показано повреждающее действие бактериоцина на интактные споры *Bacillus anthracis* с применением метода трансмиссионной электронной микроскопии. Выделенный из штамма *Bacillus subtilis* П19 новый бактериоцин – субтилозин П19 эффективно разрушал интактные споры *B. anthracis* в концентрациях 0.5–35 мкг/мл за 60 мин совместной инкубации. Совокупность полученных данных, в сочетании с анализом известных механизмов действия бактериоцинов, позволяют предположить, что в основе механизма инактивации спор, по-видимому, лежит множественное нарушение целостности внутренней и наружной мембран, окружающих кортекс покоящейся споры. Вероятно, также, что конфигурация молекулы субтилозина П19 позволяет ему проникать через внешние покровы и повреждать жизненно важные мембранные структуры кортекса спор. Субтилозин П19 может служить перспективной основой новых антимикробных препаратов природного происхождения.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, споры, бактериоцин, субтилозин П19, трансмиссионная электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0026365623600098, **EDN:** CYPVHR

Сибирская язва – смертельная болезнь млекопитающих, была и остается постоянной глобальной проблемой (Pilo, Frey, 2018; Онищенко и соавт., 2018). Вспышки этой болезни продолжают происходить по всему миру, и, даже при наличии вакцины, сибирская язва по-прежнему представляет собой серьезную опасность для людей и животных. Основной инфекционной формой *B. anthracis*, вызывающей сибирскую язву, являются споры. Структура и состав бактериальных спор обуславливают их высокую устойчивость к различного рода воздействиям (Nicholson et al., 2000). Традиционно споры инактивируют методом автоклавирования, позволяющим за счет повышенного давления пара достигать температуры в 120°C и выше, а также их обработкой высоко агрессивными химическими реагентами (Wood, Adrion, 2019). В качестве безопасной и эффективной альтернативы существующим технологиям обработки против бактериальных спор в течение последних нескольких десятилетий интенсивно исследовались бактериоцины – антимикробные пептиды (Egan et al., 2016; Romero-Rodríguez et al., 2023). Было

установлено, что два бактериоцина – низин и галодурацин активны в отношении прорастающих спор и не действуют на покоящиеся споры *B. anthracis* (Gut et al., 2011; Oman, van der Donk, 2009).

Ранее нами был выделен из растительного сырья страстоцвета (*Passiflora edulis*) штамм *Bacillus subtilis* П19 № В-8711, способный вырабатывать экзометаболит с антимикробным действием (Патент РФ, 2021; Похиленко и соавт., 2022). Антимикробным веществом оказался пептид с молекулярной массой 3401 Да, близкий по молекулярной массе к субтилозину А (3398.9 Да), впервые описанному Babasaki и соавт. (Babasaki et al., 1985). Подобраны условия биосинтеза при глубинном культивировании и выбраны способы выделения антимикробного пептида, далее именуемого как субтилозин П19.

Цель данной работы – оценка и определение повреждающего действия субтилозина П19 на споры *B. anthracis* с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и цитологического анализа.

Таблица 1. Определение спороцидной концентрации субтилозина П19 для штамма *B. anthracis* СТИ-1 после 60 мин экспозиции

КОЕ исходное, спор/мл	Количество проросших спор (КОЕ/мл) при разведении субтилозина П19*						
	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000	1 : 100000	1 : 1000000	1 : 10000000
10 ⁶	0	0	0	0	2 ± 1	6 ± 1	14 ± 2
10 ⁷	0	0	0	0	3 ± 1	20 ± 3	43 ± 3

* Исходная концентрация субтилозина П19 – 5.54 мг/мл.

В качестве продуцента бактериоцина субтилозина П19 использовали штамм *B. subtilis* П19 природного происхождения (депонирован в Государственной коллекции “ГКПМ-Оболенск”, № В-8711) (Патент РФ, 2021).

Синтез, накопление и выделение бактериоцина осуществляли, как нами описано ранее (Патент РФ, 2021; Похиленко и соавт., 2022).

Действие субтилозина П19 исследовали на спорах вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 (Государственная коллекция “ГКПМ-Оболенск”). Споры получали из вегетативных клеток путем выращивания на “голодном” LB-агаре в матрацах при температуре $33 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3–7 сут (Маринин и соавт., 2009). С поверхности агара их смывали стерильным физраствором. В суспензии общее количество сибиреязвенных спор с помощью стандарта мутности Л.И. Тарасевича довели до 1×10^7 – 1×10^8 спор/мл.

При исследовании спороцидного действия субтилозина П19 (5.54 мг/мл) к 270 мкл каждого его разведения в дистиллированной воде вносили по 30 мкл взвеси спор (10^7 и 10^8 спор/мл). После экспозиции в течение 60 мин при комнатной температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) все опытные образцы объемом по 100 мкл высевали на чашки с ГРМ агаром (Арт. 16416, “ФБУН ГНЦ ПМБ”, Оболенск, Россия) состава (г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки – 12.0 г; пептон сухой ферментативный – 12.0 г; натрия хлорид – 6.0 г; агар микробиологический – 10.0 г. В другом варианте определения спороцидного действия субтилозина П19 к 150 мкл взвеси спор (10^8 спор/мл) в физрастворе вносили по 150 мкл раствора бактериоцина в концентрации 0.07 мг/мл, перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре и полученной смесью объемом по 100 мкл засеивали чашки с ГРМ агаром. Во всех вариантах определения спороцидного действия в качестве контроля использовали пробы без бактериоцина. Чашки с посева-

ми инкубировали в течение 2 сут при 34°C . Наличие роста на чашках с посевами анализировали визуально с подсчетом КОЕ. Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях.

Для электронно-микроскопических исследований суспензию спор штамма СТИ-1 (10^8 спор/мл) в контрольных и опытных пробирках осаждали (13000 об./мин, 10 мин) на центрифуге MiniSpin (“Eppendorf”, Германия). Супернатанты отбрасывали, в контрольную пробирку добавляли 500 мкл физраствора, а в опытную – 500 мкл раствора субтилозина П19 с концентрацией около 6 мкг/мл. Пробы перемешивали, оставляли при комнатной температуре на 1 ч и осаждали в том же режиме. Супернатанты снова отбрасывали, осадки однократно промывали стерильной дистиллированной водой, аликвоты которых отбирали для посева на ГРМ-агар. Затем в опытную и контрольную пробирки в качестве фиксатора добавляли по 1 мл 8% глутарового альдегида (“Serva”, Германия) на 0.2 М Na-какодилатном буфере с pH 7.2 и оставляли на 12 ч в холодильнике. Последующие процедуры проводили, как описано ранее (Герасимов и соавт., 2021, 2022). Срезы фиксированных спор получали на ультрамикротоме Ultracut (“Reichert Jung”, Австрия) с последующим контрастированием уранилацетатом и цитратом свинца.

Исследование ультратонких срезов осуществляли в трансмиссионном электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit BioTWIN (“FEI Company” Голландия, Чехия) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от 10000 до 100000 раз. Съемку производили с помощью CCD камер Orius SC 200 W 120 kV и Orius SC 1000 W 200 kV (“Gatan”, США). Снимки обрабатывали с помощью программы Digitalmicrograph (“Gatan”, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Excel 2016 с определением стандартного отклонения (Платонов, 2000).

Таблица 2. Определение начала спороцидного действия субтилозина П19 на *B. anthracis* СТИ-1

КОЕ спор/мл	Наличие роста бацилл (КОЕ/мл) после экспозиции с бактериоцином*, мин						
	0	5	10	15	20	40	60
10 ⁷	Сплошной	143 ± 39	11 ± 3	1.3 ± 0.5	0	0	0

* Концентрация субтилозина П19 – 35 мкг/мл.

В табл. 1 приведены средние данные по КОЕ после 60 мин экспозиции интактных спор штамма *B. anthracis* СТИ-1 с различными концентрациями субтилозина П19. Из данных таблицы следует, что субтилозин П19 инактивирует сибиреязвенные споры штамма СТИ-1, и минимальная ингибирующая концентрация (МИК) субтилозина П19 при этом составляет 0.55 мкг/мл. В другом варианте опыта рост *B. anthracis* на ГРМ агаре прекращался, начиная с 5 мин экспозиции спор СТИ-1 с субтилозином П19 в концентрации 35 мкг/мл (табл. 2).

В опытных образцах спор, обработанных субтилозином П19 и предназначенных для электронно-микроскопических исследований, также отсутствовал рост штамма СТИ-1 на ГРМ агаре. В то же время контрольные пробы давали слитный рост.

На электронных микрофотографиях контрольных образцов у интактных спор *B. anthracis* четко просматриваются все структуры – стенки кора, кортекс и экзосориум, а в центральной части выявляются зародышевые цитоплазматические компартменты с ядерным аппаратом, эписомами и рибосомами (рис. 1а). На рис. 1б наблюдается картина полного лизиса спор от контакта с бактериоцином, что приводит к вытеканию цитоплазмы и нуклеоида. От спор остаются лишь их тени в виде остатков наружных покровов. По данным морфопопуляционного анализа более 99% спор получали необратимые изменения, приводившие к их гибели, что и подтвердили данные бактериологического исследования опытных и контрольных проб, приведенные выше.

Полученные результаты подтверждают имеющиеся сведения о том, что основным механизмом инактивации бактериоцинами бактериальных спор, также же, как и клеток, является нарушение целостности мембран (Egan et al., 2016; Romero-Rodríguez et al., 2023).

В литературе имеются данные об ингибирующем действии низина и галодурацина на споры и

клетки *B. anthracis*. После инкубации в течение 5 ч МИК составляла 0.42 и 0.68 мкг/мл соответственно (Gut et al., 2008; Oman, van der Donk, 2009). Однако оба этих бактериоцинов проявляют свой ингибирующий эффект только после инициации прорастания спор, поскольку они первично связываются с липидом II, который отсутствует на внешней оболочке покоящихся спор *B. anthracis* (Oman, van der Donk, 2009; Gut et al., 2011).

Таким образом, впервые с применением методов электронной микроскопии изучены особенности действия субтилозина П19 на покоящиеся споры *B. anthracis*. Совокупность полученных данных, в сочетании с анализом известных механизмов действия бактериоцинов, позволяют предположить, что в основе механизма инактивации спор, по-видимому, лежит множественное нарушение целостности внутренней и наружной мембран, окружающих кортекс покоящейся споры. Вероятно, также, что конфигурация молекулы субтилозина П19 позволяют ему проникать через внешние покровы и необратимо повреждать жизненно важные мембранные структуры спор возбудителя сибирской язвы с последующим вытеканием цитоплазмы. Более детальный механизм повреждающего действия субтилозина П19 на споры *B. anthracis* требует дальнейшего изучения. Активность субтилозина П19 в отношении возбудителя сибирской язвы делает его привлекательным в качестве основы спороцидного биопрепарата, а также как источника новых антимикробных препаратов природного происхождения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансировании из Федерального бюджета в рамках отраслевой НИР “Получение инкапсулированных препаратов для борьбы с бактериальными патогенами на основе штаммов, обладающих пробиотическими свойствами”. Регистрационный номер 121022000155-9. 01.2021–12.2025.

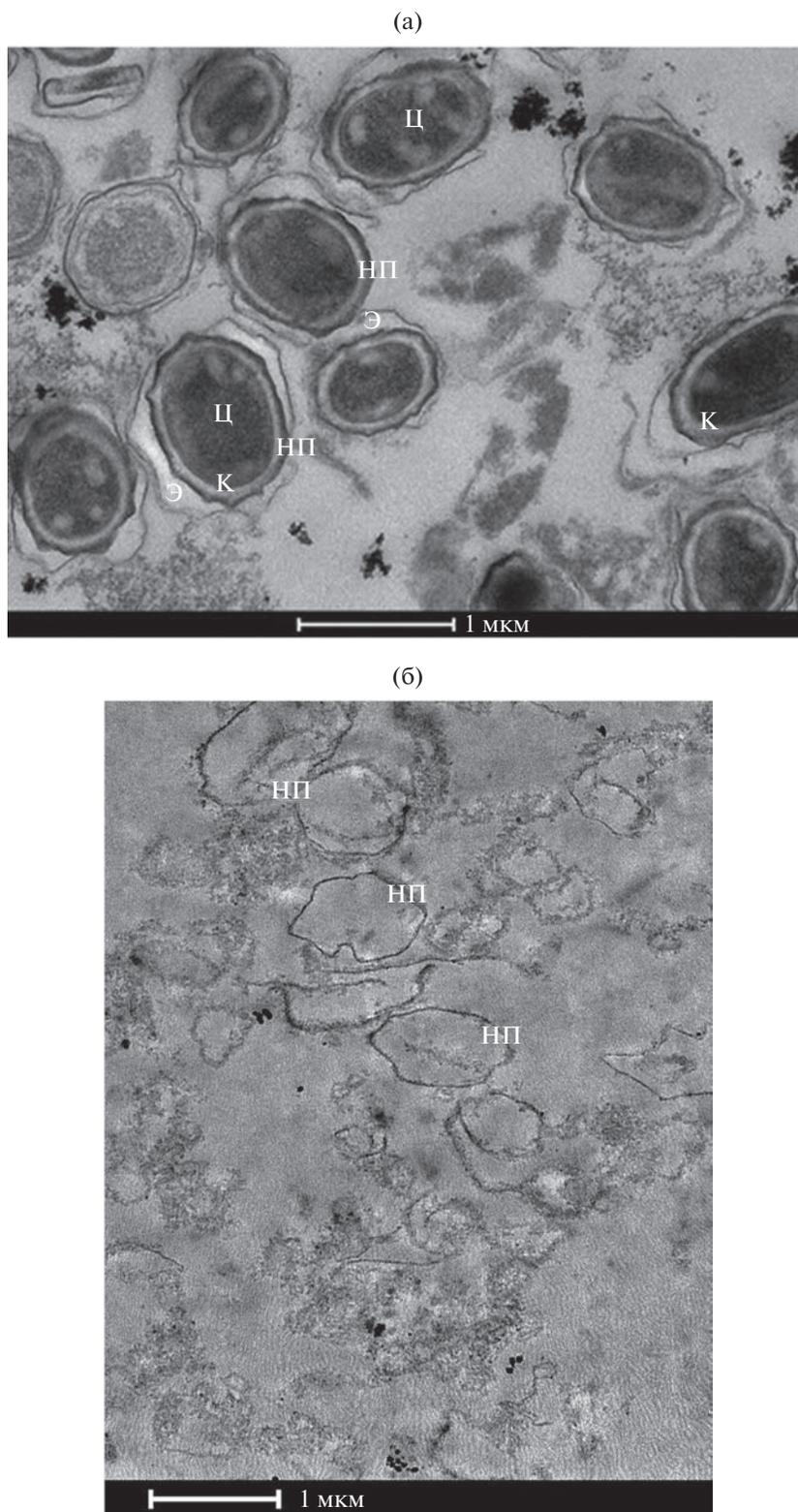


Рис. 1. Типичные трансмиссионные электронные микрофотографии: интактные споры *B. anthracis* СТИ-1 (а) и после контакта с бактериоцином П19 (3 мкг/мл) в течение 1 ч (б), $\times 30000$. Э – экзоспориум; НП – наружные покровы споры; Ц – цитоплазма с нуклеоидом; К – кортекс. Масштабная метка – 1 мкм.

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

- Герасимов В.Н., Маринина Н.Н., Щербатая О.С., Харсеева Г.Г. Возможности трансмиссионной электронной микроскопии в оценке качества клеток бактерий и микробной популяции // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67. № 4. С. 237–243.
- Gerasimov V.N., Marinina N.N., Kharseeva G.G., Shcherbataya O.S. The possibilities of transmission electron microscopy in assessing the quality of bacterial cells and microbial population // Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Moscow). 2022. V. 67. P. 237–243.
- Герасимов В.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С., Котов С.А., Чепусова А.В. Особенности ультраструктуры смешанных биопленок возбудителя дифтерии и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта человека // Клиническая лабораторная диагностика. 2021. Т. 66. № 10. С. 623–628.
- Gerasimov V.N., Kharseeva G.G., Sherbataya O.S., Kotov S.A., Chepusova A.V. Peculiarities of the ultrastructure of mixed biofilms of the causing agent of diphtheria and conditionally pathogenic microorganisms isolated from the human respiratory tract // Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Moscow). 2021. V. 66. P. 623–628.
- Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы / Под ред. Л.И. Маринина, И.А. Дятлова. М.: Гигиена, 2009. 304 с.
- Патент РФ. 2021. № 2758060.
- Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Изд-во РАМН, 2000. 52 с.
- Похиленко В.Д., Калмантаев Т.А., Дунайцев И.А., Детушев К.В., Кисличкина А.А., Мухина Т.Н., Чукина И.А. Выделение и характеристика бактериоцина штамма *Bacillus subtilis*, изолированного из пассифлоры // Бактериология. 2022. Т. 7. № 1. С. 9–17.
- Pokhilenko V.D., Kalmantaev T.A., Dunaysev I.A., Detushev K.V., Kislichkina A.A., Mukhina T.N., Chukina I.A. Isolation and characteristics of bacteriocin from *Bacillus subtilis* strain, isolated from passiflora // Bacteriology (Obolensk Moscow reg.). 2022. V. 7 (1). P. 9–17.
- Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты / Под ред. Г.Г. Онищенко, И.В. Дармова, С.В. Борисевича. Сергиев Посад, 2018. 592 с.
- Babasaki K., Takao T., Shimonishi Y., Kurahashi K. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis // J. Biochemistry. 1985. V. 98. P. 585–603.
- Egan K., Field D., Rea M.C., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 461.
- Gut I.M., Blanke S.R., van der Donk W.A. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin // ACS Chem. Biol. 2011. V. 6. P. 744–752.
- Gut I.M., Prouty A.M., Ballard J.D., van der Donk W.A., Blanke S.R. Inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by nisin // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. P. 4281–4288.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Stelow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. P. 548–572.
- Oman T.J., van der Donk W.A. Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin // ACS Chem. Biol. 2009. V. 4. P. 865–874.
- Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis* // Infect. Genet. Evol. 2018. V. 64. P. 115–125.
- Romero-Rodríguez A., Ruiz-Villafán B., Martínez-de la Peña C.F., Sánchez S. Targeting the impossible: a review of new strategies against endospores // Antibiotics. 2023. V. 12. Art. 248.
- Wood J.P., Adrion A.C. Review of decontamination techniques for the inactivation of *Bacillus anthracis* and other spore-forming bacteria associated with building or outdoor materials // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. P. 4045–4062.

Effect of the Bacteriocin Subtylostin P19 on *Bacillus Anthracis* Spores

V. D. Pokhilenko¹*, V. N. Gerasimov¹, S. K. Zhigletsova¹, T. A. Kalmantaev¹,
I. A. Chukina¹, R. I. Mironova¹, and A. R. Gajtrafimova¹

¹ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, 142279 Russia

*e-mail: pokhilenko@obolensk.org

Received March 15, 2023; revised May 31, 2023; accepted June 20, 2023

Abstract—This is the first report on electron microscopic investigation of the effect of bacteriocin on *Bacillus anthracis* dormant spores. The new bacteriocin, subtilosin P19, isolated from a natural *Bacillus subtilis* strain, effectively killed dormant *B. anthracis* spores at concentrations of 0.5–35 µg/mL after 60-min exposure. Our data, combined with analysis of the known mechanisms of the action of bacteriocins, suggest that the mechanism of spore inactivation was apparently based on multiple disruptions of the integrity of the inner and out-

er membranes surrounding the cortex of the resting spore. It is also likely that the molecular configuration of subtilisin P19 allows it to penetrate through the outer integuments and to damage the vital membrane structures of the anthrax spores. Subtilisin P19 can serve as a promising basis for new antimicrobial preparations of natural origin.

Keywords: *Bacillus anthracis*, spores, bacteriocin, subtilisin P19, transmission electron microscopy