

ISSN 0026-3656

Том 93, Номер 5

Сентябрь – Октябрь 2024



МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 93, Номер 5, 2024

ОБЗОРЫ

- Таксономия цианобактерий: эпоха перемен
А. В. Пиневиц, С. Г. Аверина 501

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Характеристика биологической активности и оценка экзогенных метаболитов
цианобактерии "*Anabaena*" sp. IPPAS B-2020
Ю. В. Батаева, М. А. Синетова, Е. А. Курашов, Ю. В. Крылова, Л. В. Коломбет,
Л. Н. Григорян 519
- Сравнительная геномика утилизации углеводов у бактерий семейства *Sphaerochaetaceae*:
эволюционное происхождение генов галактуронидазы и ненасыщенной
рамногалактуронил-гидролазы
О. Ю. Трошина, Д. Г. Наумов, В. И. Речкина, В. А. Щербакова 534
- Анаэробное окисление нефти микробными сообществами донных осадков района
естественного нефтепроявления (Средний Байкал, Большая Зеленовская)
О. Н. Павлова, С. В. Букин, О. Н. Изосимова, С. М. Черницына, В. Г. Иванов,
А. В. Хабеев, Т. В. Погодаева, И. С. Еловская, А. Г. Горшков, Т. И. Земская 548
- Дегградация коричной кислоты ризосферным штаммом *Achromobacter insolitus* LCU2
Е. В. Крючкова, Е. С. Морозова, В. С. Гринёв, Г. Л. Бурегин,
Н. Е. Гоголева, Ю. В. Гоголев 562
- Структурно-функциональные особенности анаэробного микробного сообщества,
возникающие при контакте с отходами из пенополистирола
Л. И. Ширинкина, Ю. В. Тактарова, М. А. Гладченко, А. Ю. Меркель, И. Б. Котова 572
- Особенности формирования биопленок микроорганизмами *Listeria*, *Salmonella*
и *Pseudomonas* при различных температурах и роль их синергического
взаимодействия при формировании биопленочного сообщества
Ю. К. Юшина, Е. В. Зайко, М. А. Грудистова, А. А. Семенова, А. А. Махова,
Д. С. Батаева, Е. В. Демкина, Ю. А. Николаев 588
- Нокаут-мутации в генах, кодирующих переносчики фосфата, нарушают адаптацию
Saccharomyces cerevisiae к потреблению этанола
Л. А. Ледова, Л. П. Рязанова, Т. В. Кулаковская 601
- Длительное выживание *Enterococcus faecium* в разных условиях стабилизации
и иммобилизации клеток
О. А. Галуза, Г. И. Эль-Регистан, Т. А. Канапацкий, Ю. А. Николаев 607
- Дрожжевая микрофлора молочных продуктов, реализуемых в России
А. Ю. Туаева, А. М. Пономарева, В. А. Лившиц, Е. С. Наумова 623
- Целлюлолитический потенциал новых штаммов почвенных стрептомицетов
Н. А. Боков, А. В. Бакулина, Е. А. Бессолицына, И. Г. Широких 635

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Влияние сдвига pH на обогащенное фосфат-аккумулирующими микроорганизмами сообщество в биореакторе последовательно-периодического действия

А. Г. Дорофеев, А. В. Пелевина, Е. В. Груздев, А. В. Марданов, Н. В. Пименов 645

Алкан монооксигеназа ALKB1 штамма *Rhodococcus qingshengii* X5 не обязательна для роста на алканах

К. В. Петриков, А. А. Режепова, И. Ю. Позднякова-Филатова 651

О роли диоксида углерода в регуляции адаптивной пролиферации бактерий

О. Е. Петрова, О. И. Парфирова, В. Н. Воробьев, В. Ю. Горшков 657

Использование бактериальной системы C-DAG для анализа способности амилоидов индуцировать агрегацию белка *in vitro*

Н. П. Трубицина, О. М. Землянко, Г. А. Журавлева, С. А. Бондарев 662

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

(по материалам IV Микробиологического Конгресса, Томск, 2023)

Твердофазный способ получения пробиотических кормовых добавок для сельскохозяйственных животных

Н. А. Ушакова, В. Г. Правдин, И. В. Правдин, Л. З. Кравцова, Е. С. Бродский, А. И. Амбарян 666

Продукция антимикробных соединений в клетках *Lactobacillus brevis*

Н. А. Сидорова, А. И. Савушкин 671

CONTENTS

Vol. 93, No. 5, 2024

REVIEWS

- Taxonomy of Cyanobacteria: the Era of Change
A. V. Pinevich, and S. G. Averina 501

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Characterization of Biological Activity and Evaluation of Exogenous Metabolites of Cyanobacteria “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020
Yu. V. Bataeva, M. A. Sinetova, E. A. Kurashov, Yu. V. Krylova, L. V. Kolombet, and L. N. Grigoryan 519
- Comparative Genomics of Carbohydrates Utilization in Bacteria of the Family *Sphaerochaetaceae*: Evolutionary Origin of the Genes Encoding Galacturonidase and Unsaturated Rhamnogalacturonyl Hydrolase
O. Yu. Troshina, D. G. Naumoff, V. I. Rechkina, and V. A. Shcherbakova 534
- Anaerobic Oxidation of Oil by Microbial Communities of Bottom Sediments of a Natural Oil Seepage Site (Bolshaya Zelenovskaya, Middle Baikal)
O. N. Pavlova, S. V. Bukin, O. N. Izosimova, S. M. Chernitsina, V. G. Ivanov, A. V. Khabuev, T. V. Pogodaeva, I. S. Elovskaya, A. G. Gorshkov, and T. I. Zemskaya 548
- Degradation of Cinnamic Acid by the Rhizospheric Strain *Achromobacter insolitus* LCU2
E. V. Kryuchkova, E. S. Morozova, V. S. Grinev, G. L. Burygin, N. E. Gogoleva, and Yu. V. Gogolev 562
- Structural and Functional Characteristics of the Microbial Community Emerging upon Its Contact with Extruded Polystyrene Waste
L. I. Shirinkina, Yu. V. Taktarova, M. A. Gladchenko, A. Yu. Merkel, and I. B. Kotova 572
- Patterns of Biofilm Formation by Members of *Listeria*, *Salmonella*, and *Pseudomonas* at Various Temperatures and the Role of Their Synergistic Interactions in the Formation of Biofilm Communities
Yu. K. Yushina, E. V. Zaiko, M. A. Grudistova, A. A. Semenova, A. A. Makhova, D. S. Bataeva, E. V. Demkina, and Yu. A. Nikolaev 588
- Knockout Mutations in the Genes Encoding Phosphate Transporters Impair Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Consumption
L. A. Ledova, L. P. Ryazanova, and T. V. Kulakovskaya 601
- Long-term Survival of *Enterococcus faecium* Under Varied Conditions of Cell Stabilization and Immobilization
O. A. Galuza, G. I. El'-Registan, T. A. Kanapatskiy, and Yu. A. Nikolaev 607
- Yeast Microflora of Dairy Products Sold in Russia
A. Yu. Tuaeva, A.M. Ponomareva, V.A. Livshits, and E.S. Naumova 623
- Cellulolytic Potential of New Strains of Soil Streptomycetes
N. A. Bokov, A. V. Bakulina, E. A. Bessolitsyna, I. G. Shirokikh 635

SHORT COMMUNICATIONS

Influence of pH Shift on the Community Enriched in Phosphate-Accumulating Microorganisms in a Sequential-Periodic Action Bioreactor <i>A. G. Dorofeev, A. V. Pelevina, E. V. Grouzdev, A. V. Mardanov, and N. V. Pimenov</i>	645
Alkane Monooxygenase AlkB1 of <i>Rhodococcus qingshengii</i> Strain X5 Does not Required for Growth on Alkanes <i>K. V. Petrikov, A. A. Rejepova, and I. Y. Pozdnyakova-Filatova</i>	651
The Role of Carbon Dioxide in the Regulation of Bacterial Adaptive Proliferation <i>O. E. Petrova, O. I. Parfirova, V. N. Vorob'ev, and V. Yu. Gorshkov</i>	657
Application of the Bacterial C-Dag System to Analyze the Ability of Amyloids to Seed Protein Aggregation <i>in vitro</i> <i>N. P. Trubitsina, O. M. Zemlyanko, G. A. Zhouravleva, and S. A. Bondarev</i>	662

SHORT COMMUNICATIONS

(...)

Solid-State Method of Production of Probiotic Feed Additives for Farm Animals <i>N. A. Ushakova, V. G. Pravdin, I. V. Pravdin, L. Z. Kravtsova, E. S. Brodsky, and A. V. Ambaryan</i>	666
Production of Antimicrobial Compounds in <i>Lactobacillus brevis</i> Cells <i>N. A. Sidorova, and A. I. Savushkin</i>	671

УДК 57.06

ТАКСОНОМИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ: ЭПОХА ПЕРЕМЕН

© 2024 г. А. В. Пиневи^а, * и С. Г. Аверина^а

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

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

Поступила в редакцию 27.03.2024 г.

После доработки 24.04.2024 г.

Принята к публикации 29.04.2024 г.

До середины 1970-х годов цианобактерий считали водорослями несмотря на то, что отсутствие клеточного ядра (по современным представлениям, один из признаков прокариотов) отличало их от остальных членов этой таксономической группы. Затем, когда бактерии были отождествлены с прокариотами, синезеленые водоросли были переквалифицированы в цианобактерий, и бактериологи начали изучать их культивируемые штаммы микробиологическими методами. Но, поскольку цианобактерии не подчинялись бактериальному кодексу (ICNB), разработка их таксономии, особенно в части номенклатуры, столкнулась с проблемами, которые оставались нерешенными до начала 2010-х годов. Происходящие перемены связаны с общим прогрессом таксономии прокариотов при взрывообразном накоплении данных секвенирования генов 16S рРНК, особенно у некультивируемых объектов. Достижения таксономии цианобактерий в области описания: I) на основе полифазного подхода опубликованы новые таксоны рангом от вида до порядка; II) опубликованы таксоны “темновых” цианобактерий с несколькими типами нефототрофного метаболизма; III) опубликованы таксоны цианобактерий с красно-смещенными хлорофиллами *d* и *f*. Достижения в области номенклатуры: IV) таксоны, валидно опубликованные согласно ботаническому кодексу (ICN), впредь считаются таковыми согласно прокариотному кодексу (ICNP); V) в ICNP введен ранг филы, и на основе валидной публикации типового рода *Cyanobacterium* gen. nov. по правилам ICN легитимировано название филы цианобактерий — *Cyanobacteriota*; VI) благодаря созданию параллельного кодекса SeqCode, согласно которому номенклатурным типом служит последовательность геномной ДНК, имена некультивируемых таксонов (*Candidatus*) могут приобрести номенклатурный статус. Достижения в области классификации: VII) реконструировано эволюционное древо окислительных фототрофов и их родственников; VIII) создана филогенетическая система порядков и семейств; IX) разрабатывается экогеномная классификация, основанная на анализе геномов и данных об их экологическом распространении. Предстоит решить задачу по ограничению таксономической избыточности цианобактерий и продолжить разработку концепции их вида.

Ключевые слова: молекулярная филогения, номенклатурный тип, полифазный подход, таксономия цианобактерий, фила, чистая культура, ICN, ICNP, SeqCode, *Vampirovibrionia*

DOI: 10.31857/S0026365624050019

ВВЕДЕНИЕ

Со второй половины 1970-х гг. синезеленых водорослей стали рассматривать как цианобактерии и изучать микробиологическими методами (Stanier, Cohen-Bazire, 1977). Однако разработке их таксономии мешало различие правил двух кодексов номенклатуры — ботанического и бактериального. Так что в данном плане эти прокариоты оказались в двойственном положении (Komárek, 2006). Маргинальный статус не соответствовал степени их изученности, тем более не отражал их исключительного места в мире прокариотов и биосфере

в целом — по распространению, численности, вкладу в глобальный метаболизм, функции виновника кислородной катастрофы и роли предка хлоропласта.

Проблемы таксономии цианобактерий, особенно в части номенклатуры, не находили решения вплоть до начала 2010-х годов. Ключевые перемены произошли на фоне общего прогресса таксономии прокариотов вследствие лавинообразного накопления данных 16S-филогении и результатов метагеномных исследований некультивируемых объектов.

Поскольку развитию таксономии цианобактерий посвящено множество публикаций, в том

числе обзорного плана, настоящий обзор сосредоточен только на наиболее релевантных сообщениях. Следует также отметить, что вопросы таксономии цианобактерий не часто рассматривались в свете общих проблем таксономии прокариотов, и предлагаемая статья актуализирует эту задачу.

QUID CYANOBACTERIUM EST

Циановые (греч. *kianeos* и лат. *cyaneus* синий), или синезеленые (blue-green) водоросли последовательно классифицировались как Мухофусеае K. Wallroth, 1833 / Фискохромасеае G. Rabenhorst, 1865 / Цианофусеае J. Sachs, 1874 / Шизофусеае F. Cohn, 1879 / Цианофита F. Steinecke, 1931. Хотя они всегда воспринимались как группа, отличающаяся от остальных объектов альгологии (Fritsch, 1945), решающее понимание этого отличия было достигнуто только в свете концепции, давшей ответ на классический вопрос микробиологии *что такое бактерия?* (лат. *quid est bacterium*): бактерия это прокариот и *vice versa* (Stanier, van Niel, 1962). С той поры циановых прокариотов стали интерпретировать как одну из групп бактерий.

Путь от циановых водорослей к цианобактериям. Во второй половине 1870-х годов Фердинанд Юлиус Кон (см. Dews, 2000) предложил рассматривать способ размножения циановых водорослей — дробление (дочерние особи образуются путем деления материнской клетки либо фрагментацией трихома) — как признак таксона высокого ранга. Поэтому он отнес их к классу Schizophyceae (S[c]hi.zo'phy.ce[a]e; греч. *shizo* дробиться; греч. *phycos* водоросль). Аналогичным образом, бесцветным морфологическим аналогом Schizophyceae он отвел класс Schizomyceae (S[c]hi.zo'my.ce[a]e; греч. *mykes* гриб). Рассматривая эти таксоны как сестринские, он объединил их в отдел Schizophyta (S[c]hi.zo'phy.ta; греч. *phyton* растение). Ближе к концу XIX в. эту концепцию приняли другие ведущие ботаники (De Bary, 1885; Fischer, 1897). В системе растений начала XX в. уже фигурировал класс Bacteriata (Schizophyta Cohn) с подклассами Bacteriomorpha Gobi (не фотосинтезирующие) и Cyanomorpha Gobi (Schizophyceae Cohn) (см. Гоби, 1916). Во второй подкласс также вошли бесцветные, или апохлоротические (лат. *apo-* отсутствие; греч. *chloros* зеленый; бесхлорофильные) циановые водоросли. По поводу последних высказывались эволюционные гипотезы: в частности, нитчатых бактерий *Beggiatoa* и *Leptothrix* считали бесцветными водорослями (Fischer, 1897). Однако лишь во второй половине XX в. исследователи из Пастеровского Института в Париже (Stanier et al., 1971) пришли к выводу, что циановые водоросли — не растения, а бактерии, образующие хлорофилл и выделяющие кислород как побочный продукт окисления воды.

История термина. Термин *синезеленые* [фото] бактерии и иерархический ряд — класс “Blue-green photobacteria” / отдел “Phototrophic prokaryotes” / царство *Procaryotae* были впервые использованы во вступительной статье к 8-му изданию Определителя бактерий Берги (Murray, 1974). Любопытно, что Роджер Эйт Стениер, обосновавший “цианобактериальную” концепцию синезеленых водорослей, некоторое время продолжал называть их не *цианобактериями* (cyanobacteria; Stanier, 1977), а *цианофитами* (cyanophytes). Ботаники решительно выступили против данной концепции и особенно против самого термина (см. Geitler, 1979). Задним числом можно предположить, что термин *синезеленые бактерии* (см. выше), по аналогии с терминами *пурпурные бактерии* (purple bacteria) и *зеленые бактерии* (green bacteria), не вызвал бы такой реакции. Так или иначе, сочетание специфического названия ботанического таксона (циано-) с обозначением микробиологических объектов (-бактерии) символично: оно отражает паритет и преемственность двух дисциплин в изучении этих микроорганизмов.

С изменением взгляда на значение клеточной организации для таксономии циановых водорослей/цианобактерий к их изучению были привлечены микробиологические методы, основанные на культивировании и физиолого-биохимическом, а позднее и молекулярно-генетическом анализе (Stanier, Cohen-Bazire, 1977). С начала 1980-х гг. бактериологи применяют к цианобактериям полифазный подход (см. ниже); альгологи следуют их примеру и все чаще используют термин *цианобактерии* вместо термина *синезеленые водоросли*, постепенно отказываясь от еще недавно популярного термина *цианопрокариоты* (см. Komárek et al., 2014).

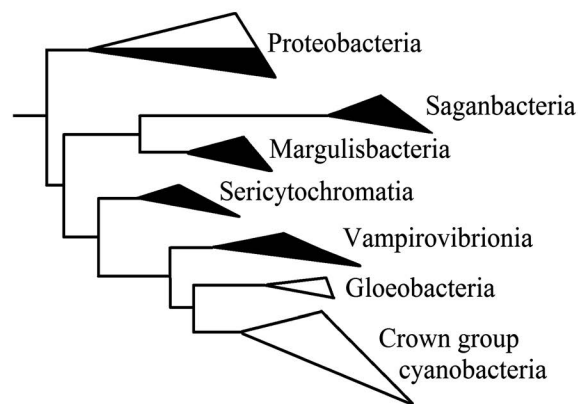


Рис. 1. Общая схема эволюционного древа цианобактерий и родственных филотипов, реконструированного с учетом сходства последовательностей гена 16S рРНК (Pinevich, Averina, 2021). Белые и черные треугольники, соответственно, фотосинтезирующие и не фотосинтезирующие филотипы.

Филогения цианобактерий. В конце 1970-х гг. было показано, что цианобактерии образуют один из крупных стволов домена *Bacteria* – филу *Cyanobacteria* (Bonen et al., 1979; Castenholz, 2001). По последним данным (см. Pinevich, Averina, 2021), близкими родственниками цианобактерий являются некультивируемые объекты – представители фил *Candidatus Sericytochromatia*, *Ca. Margulisbacteria* и *Ca. Saganbacteria* (рис. 1).

Согласно имеющимся данным, филу *Cyanobacteria* состоит из классов *Oxyphotobacteria* (фотосинтезирующие, “light”) и *Vampirovibrionia* (не фотосинтезирующие, “dark”), хотя в редких случаях вывод об их совместной кластеризации находит оппонентов (Garcia-Pichel et al., 2020). В классе *Oxyphotobacteria* имеются два подкласса. Один из них, или *группа кроны дерева* (crown group; Shih et al., 2017), содержит неархаичных цианобактерий; помимо них к нему относятся цианеллы (облигатные эндосимбионты протистов *Glaucocystophyceae*), а также хлоропласты *Chlorophyceae*, *Charophyceae* и зеленых растений. Это так называемые “первичные хлоропласты”, произошедшие от представителей самой ранней клады группы кроны дерева (в нее входит современный вид *Gloeomargarita lithophora*; Ponce-Toledo et al., 2016). К другому подклассу, *Gloeobacteria*, относятся архаичные цианобактерии (Rahmatpour et al., 2021); в отличие от остальных *Oxyphotobacteria* у них нет тилакоидов.

Темновые цианобактерии. В настоящее время способность к фототрофии обнаружена у представителей восьми бактериальных фил (*Acidobacteria*, *Bacteroidetes*–*Chlorobi*–*Fibrobacteres*, *Candidatus Eremiobacterota* (WPS-2), *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes* и *Proteobacteria*). При этом в одну и ту же филу наряду с фототрофными

(“световыми”) входят хемотрофные (“темновые”) представители (Cardona, 2015; Ward et al., 2019). До недавнего времени единственным исключением считались облигатно фототрофные цианобактерии, хотя с конца XIX в. нитчатых циановых водорослей и по морфологии почти не отличающихся от них бесцветных бактерий *Leptothrix* и *Beggiatoa* считали эволюционными родственниками. Такая точка зрения просуществовала до начала 1980-х гг. (см. Reichenbach, 1981), пока ее не опровергли данные молекулярно-филогенетического анализа (Reichenbach et al., 1986). В частности, оказалось, что *Leptothrix*, *Sphaerotilus* и *Vitreoscilla* относятся не к филе *Cyanobacteria*, а к классу *Betaproteobacteria* (Kämpfer, Spring, 2005; Spring, Kämpfer, 2005; Strohl, 2005a). В свою очередь, выяснилось, что *Beggiatoa* и *Leucothrix* принадлежат к классу *Gammaproteobacteria* (Bland, Brock, 2005; Strohl, 2005b). Наконец, было установлено, что *Herpetosiphon* (*Lewinella*) и *Saprospira* входят в филу *Bacteroidetes* (Lewin, 2011; Sly, Fegan, 2011).

Тем не менее допускалась возможность существования в филе *Cyanobacteria* не нитчатых, а одноклеточных нефотосинтезирующих представителей (Пиневиц, 1991). Таким объектом оказался хищный вибрион, которого сначала отнесли к роду *Bdellovibrio* (филу *Proteobacteria*) как новый вид *B. chlorellavorus* (Громов, Мамкаева, 1972). Позднее, поскольку механизм хищничества (эктопаразитизм) и жертва (*Chlorella* spp.) этой бактерии были другими, чем у типового вида *B. bacteriovorus* (Williams et al., 2005), ее переименовали в *Vampirovibrio chlorellavorus* (Громов, Мамкаева, 1980) и без 16S-идентификации отнесли к протеобактериям. Высушенный образец смешанной культуры *V. chlorellavorus* и *C.*

Таблица 1. Цианобактерии класса *Vampirovibrionia* (по: Pinevich, Averina, 2021)

Порядок, индекс филотипа	Вид	Размер генома	Тип метаболизма	Подвижность	Экологическая ниша
<i>Vampirovibrionales</i> , SM1D11	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i>	~3 Мб	Микроаэробное дыхание или брожение	Имеется	Хищнический эбибиоз с <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>C. kessleri</i> или <i>C. sorokiniana</i>
<i>Ca. Gastranaerophilales</i> , YS2	<i>Ca. Gastranaerophilus phascolarctosicola</i> , <i>Ca. G. termiticola</i>	~2 Мб	Брожение	Имеется или отсутствует	Кишечник млекопитающих или термитов
<i>Ca. Obscuribacterales</i> , mle1-12	<i>Ca. Obscuribacter phosphatis</i>	~5 Мб	Брожение или дыхание (аэробное или нитратное); диазотрофия	Отсутствует	Очистные сооружения; грунтовые воды
<i>Ca. Caenarcaniphilales</i> , ACD20	<i>Ca. Caenarcanum bioreactoricola</i>	~2 Мб	Брожение	Отсутствует	Анаэробные биореакторы

Описание

vulgaris 40 лет (!) хранился в коллекции ATCC, пока при выполнении Living Tree Project не выяснилось, что вампировибрион на самом деле относится к филе *Cyanobacteria* (Di Rienzi et al., 2013). Вид *V. chlorellavorus* стал типовым для нового класса *Vamprovibrionia*, содержащего порядки *Vamprovibrionales*, *Ca. Gastranaerophilales*, *Ca. Obscuribacterales* и *Ca. Caenarcaniphilales* (Pinevich, Averina, 2021; табл. 1).

Эволюция метаболизма цианобактерий. По-видимому, в основании древа *Cyanobacteria* находились объекты, осуществлявшие брожение (Matheus Carnevali et al., 2019). Позднее представители класса *Oxyphtobacteria* сменили тип метаболизма на дыхательный, используя *bc₁*-комплекс (хинол-цитохром *c*-оксидоредуктазу, или комплекс III) в качестве центрального звена ЭТЦ. Альтернативный сценарий, согласно которому общий предок *Cyanobacteria* и сестринских фил уже имел *bc₁*-комплекс, исходит из двух соображений. Во-первых, высокое сходство *bc₁*-комплекса бактерий и архей свидетельствует о том, что он использовался на заре эволюции биоэнергетики (Schütz et al., 2000). Во-вторых, при возникновении фотосинтетического аппарата более поздний модуль (реакционный центр/антенна) присоединился к ранее существовавшей ЭТЦ (Xiong, Bauer, 2002).

Как известно, факультативно аноксигенные цианобактерии обладают рудиментарной способностью окислять сульфид (Arieli et al., 1994), а поскольку основу глобальной эволюции дыхательного метаболизма составляла литотрофия (Thauer, 2007), есть предположение, что в современной биосфере могли сохраниться цианобактерии-хемосинтетики (Pinevich, Averina, 2021).

ИНСТРУМЕНТАРИЙ ТАКСОНОМИИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Таксономия (систематика) — это научная дисциплина, отображающая элементы разнообразия живых объектов с помощью таких инструментов, как *описание*, *номенклатура* и *классификация*. Практическим приложением таксономии служит *идентификация*.

Термины “таксономия” и “систематика” обычно считают синонимами; в данном случае использован первый из них. Реже встречаются другие трактовки обоих терминов, а также термина “классификация”. Например, таксономию определяют как теорию и практику классификации, а систематику — как изучение разнообразия организмов и всех форм их взаимоотношений, в том числе филогенетических (см. Prakash et al., 2007). Или: таксономия — это рабочая версия систематики (см. Dvořák et al., 2015) и т. д.

Общая характеристика признаков и методов, используемых при описании цианобактерий. Описание и классификация прокариотов не являются областью формального регулирования (в отличие от номенклатуры). Возможности описания и его верификации определяются уровнем развития методологии, причем оцениваются как стандартные, так и специфические признаки.

В настоящее время для описания прокариотов, в частности, цианобактерий, используется универсальный метод, названный *полифазным подходом* (см. Vandamme et al., 1996; Prakash et al., 2007). Изначально (Colwell, 1970) так были названы получение и анализ многоуровневой системы информации — от молекулярной до экологической. В случае цианобактерий полифазный подход своеобразен: среди фенотипических признаков ведущее место занимают морфологические и морфометрические (см. Anand et al., 2019); их чрезмерная детализация привела к избытку новых таксонов (см. ниже).

Морфология и ультраструктура. Природный спектр морфологических признаков цианобактерий сужается в культурах (Geitler, 1979), хотя это и не уникальная особенность данной группы. Тем не менее культивируемые штаммы воспроизводимо обнаруживают ряд дискретных признаков — на уровне особи, в агрегатах и колониях. У одноклеточных форм это размер и конфигурация, способ деления (бинарное или множественное), а также образование капсулы или чехла; для нитчатых — пропорции, размер и форма клеток (особенно концевых), сужение нити, тип ветвления, образование слизистого покрова или чехла, размножение фрагментацией или посредством гормониев, дифференциация акинет и/или гетероцист, формирование сложных талломов. Все эти признаки максимально использовались микробиологами в ранних классификационных системах, унаследованных от ботаников.

Одноклеточный морфотип, как и простой нитчатый (без истинного ветвления), являются признаками, приобретенными в ходе параллельной эволюции (Tuji et al., 2021), тогда как образование дифференцированных клеток прослеживается в когерентной группе *Nostocales* (ее внутренние филогенетические отношения до конца не ясны).

Важными ультраструктурными признаками служат агрегаты газовых везикул, а также наличие или архитектура ламеллярной системы (Hoffmann et al., 2005). Тилакоиды отсутствуют только у представителей порядка *Gloeobacterales* (Rahmatpour et al., 2021), а их параллельная укладка учитывается, в частности, в диагнозах ряда одноклеточных *Geminocystaceae* (Tuji et al., 2021; Polyakova et al., 2023) и нитчатых *Pseudanabaenaceae*

(Strunecký et al., 2023). Газовые везикулы штаммов *Pseudanabena* образуют характерные субполярные агрегаты (Guglielmi, Cohen-Bazire, 1984).

Метаболизм. У большинства цианобактерий основа метаболизма однотипна: это облигатная оксигенная фототрофия, сочетающаяся с облигатной автотрофией посредством использования цикла Кальвина. Редкие штаммы способны к факультативной аноксигенной фототрофии, а также фото- или хемогетеротрофии (Smith, 1982). Еще реже наблюдаются серное дыхание или брожение, осуществляемые за счет использования запасных полиглюкозидов (Oren, Shilo, 1979). Из-за специфики ботанического подхода эти и другие метаболические признаки непосредственно не используются в названиях цианобактерий, хотя специфические особенности пигментного аппарата, соответственно, фотосинтеза косвенно отражены в нескольких видовых эпитетах (см. ниже). Способность к диазотрофии также не акцентируется в номенклатуре, что может рассматриваться как еще один пример ботанического наследия.

Тем не менее спектр метаболических признаков, используемых в таксономии цианобактерий, резко расширился после описания класса *Vampirovibrionia* с несколькими типами нефототрофного метаболизма (табл. 1).

Хемотаксономические признаки. В отличие от многочисленных примеров для других прокариотов (Tindall et al., 2010), эти признаки недостаточно используются при описании цианобактерий. Например, это касается таких стандартных признаков, как структура пептидогликана, а также набор хинонов и полиаминов. Состав жирных кислот учитывался с начала 1970-х гг.; его корреляция с морфологическими признаками *Anabaena* spp., *Nostoc* spp., *Spirulina* spp., *Synechococcus* spp. и *Synechocystis* spp. анализировалась до 20-х годов XXI в. (Anand et al., 2019). На основе этих работ была предложена классификационная система, подразделяющая цианобактерии на несколько фенотипических групп согласно длине жирнокислотной цепи, числу и положению двойных связей, а также типу используемых десатураз (Cohen et al., 1995; Los, Mironov, 2015). Состав жирных кислот служит второстепенным, но порой существенным элементом полифазного подхода. В частности, по этому признаку были обособлены рода *Arthrospira* и *Spirulina* (позднее это подтвердил молекулярно-филогенетический анализ; Litvaitis, 2002), а также два вида прохлорофитов (Pinevich et al., 2012).

Важное место в хемотаксономии цианобактерий занимают фотосинтетические пигменты: главные (в реакционных центрах) и вспомогательные (в антенных комплексах). Если первые в целом консервативны, то молекулярный состав и относительное содержание вторых (соответственно, цвет клеток) варьируют, что иногда отражается

в номенклатуре. Так, с доминированием фикозерина связаны видовые эпитеты *Altericista violacea*, *Gloeobacter violaceus*, *Lyngbya purpurea*, *Oscillatoria rosea*, *O. rubescens*, *Planktothrix rubescens*, *Snowella rosea* и *Trichodesmium erythraeum*; фикоцианина — эпитеты *Merismopedia glauca*, *Microcystis aeruginosa* и *Phormidium aerugineo-coeruleum*. Способность модулировать состав фикобилипротеинов при комплементарной хроматической адаптации входит в диагноз родов и видов (Averina et al., 2021). В то же время молекулярный состав каротиноидов (важный признак у зеленых серных бактерий) для цианобактерий не приобрел хемотаксономического значения, хотя иногда он специфичен (Takaichi, 2011). Тем не менее высокое относительное содержание этих пигментов, соответственно, цвет клеток, отразились в некоторых видовых эпитетах (*Geitlerinema carotinosum*, *Lyngbya lutea* и *L. ochracea*).

С середины 1970-х гг. важное таксономическое значение придается другим, чем хлорофилл *a*, хлорофиллам (см. Averina et al., 2019). Немногочисленные виды, не образующие фикобилипротеины, но содержащие хлорофиллы *a/b* (*Prochloron didemni*, *Prochlorothrix* spp.) или 2,4-дивинилхлорофиллы *a/b* (*Prochlorococcus marinus*), известны как *прохлорофиты*. Смысловой элемент *Prochloro-* в номенклатуре представителей данной группы исходил из ошибочного предположения о том, что *P. didemni*, описанный первым из них, имел общего предка с зелеными водорослями (см. Pinevich et al., 2012). Другое название этой группы, *зеленые цианобактерии*, не несет филогенетической коннотации, хотя также указывает на использование хлорофилла *a/b*-белкового комплекса вместо фикобилисомы. Данный термин также подчеркивает цвет, обусловленный низким содержанием каротиноидов. Впрочем, доминированием хлорофилла *a* над другими пигментами может объясняться (темно)зеленый цвет цианобактерий и с тривиальным набором пигментов (*Lyngbya nigra*, *Microcystis viridis*, *Phormidium chlorinum*).

В первом (1989 г.) издании руководства Берги прохлорофитам придавался ранг порядка *Prochlorales*. Позднее цианобактерии было предложено рассматривать как филу, а тип светособирающего комплекса считать признаком таксона рангом не выше рода (Pinevich et al., 1997). Эти оба предложения были без необходимой ссылки учтены во втором издании руководства Берги (Castenholz, 2001).

В последние годы активно изучаются штаммы, образующие при адаптации к дальнему красному/ближнему инфракрасному свету (>700 нм) “красно-смещенные” (red-shifted) хлорофиллы *d* или *d/f* (Averina et al., 2019). Данный признак зафиксирован в нескольких видовых эпитетах. Примером служит *Halomicronema hongdechloris* (кит. *hong-de* красного цвета и греч. *chloros* зеленый; имеется в виду

красно-смещенный хлорофилл *f*; Chen et al., 2012). Другой пример — *Altericista variichlora* (лат. *varius* разный; подразумеваются хлорофиллы *a/d/f*; Averina et al., 2021). Третий пример — *Brocelinema telerythrochlorum*, gen. nov. et sp. nov., выделенная из пруда в г. Брюсселе (*Brocela* — название древнего поселения на месте современного Брюсселя; лат. *nema* нить; греч. *tele* далеко и *erythros* красный; имеются в виду красно-смещенные хлорофиллы *d* и *f*) (данное название предлагается авторами для нового штамма, депонированного в коллекции CALU). Конститутивное образование хлорофилла *d* — признак *Acaryochloris marina* и *Candidatus A. bahamiensis* (подробнее см. в обзоре: Пиневиц, Аверина, 2022).

Экологические признаки. Таксономические диагнозы цианобактерий могут включать указание на принадлежность к определенной температурной группе (см. Anand et al., 2019); на отношение к солёности воды (например, *H. hongdechloris*; Chen et al., 2012); на взаимодействие с твердыми субстратами (примерами служат эндолитные штаммы или компоненты биопленок и микробных матов; см. Velichko et al., 2021); на участие в специфических симбиозах (например, между *Anabaena azollae* с водным папоротником *Azolla* spp.; Plazinski et al., 1990) и т. д.

Данные масс-спектрометрического анализа. Масс-спектрометрический анализ биомаркеров проводится на клетках, клеточных гомогенатах, субклеточных фракциях и отдельных группах молекул. Для этого используются такие методы, как MALDI-TOF, ESI, SELDI и BAMS. Пути использования этих методов в микробиологических исследованиях подробно описаны в обзоре (Velichko, Pinevich, 2019). Богатые возможности предоставляет MALDI-TOF — оперативный и относительно несложный метод с широким спектром применения, преимущественно в протеомике. К сожалению, этот метод пока что редко применяется по отношению к цианобактериям: им анализируются потенциально токсиногенные объекты в цветениях и при скрининге среди культивируемых штаммов. Так, в результате анализа гомогенатов 25 штаммов *Planktothrix* spp. были выявлены 13 хемотипов, в том числе 9 продуцентов микроцистинов. Биомаркером, по которому токсиногенные штаммы *Microcystis aeruginosa* отличались от нетоксиногенных, был состав рибосомных белков (см. обзор Velichko, Pinevich, 2019).

Интересно, что данные MALDI-TOF анализа могут послужить связующим звеном между фенотипическими и генотипическими признаками. Например, иерархическая кластеризация масс-спектров потенциально токсиногенных представителей родов *Anabaena* и *Microcystis* позволила выявить разные фило типы (см. обзор Velichko, Pinevich, 2019). Помимо критериев, основанных на анализе ДНК (см. ниже), востребованными

маркерами филогении могут быть спектры рибосомных белков. По сравнению с последовательностью гена 16S рРНК они представляют собой более богатый источник информации, что дополнительно способствует надежной филогенетической реконструкции. В настоящее время остро необходимы MALDI-TOF базы рибосомных белков цианобактерий, в частности, в интересах таксономии этой группы.

Концепция и критерии вида. Генотипические признаки. Под видом прокариотов понимается фенотипически и генотипически целостный (“cohesive”) кластер (Doolittle, Zhaxybaeva, 2009). Конкретнее, это группа фенотипически сходных/генетически родственных клональных популяций в разных местообитаниях в совокупности с набором репрезентативных коллекционных штаммов (определение авторов). В настоящее время качественная и количественная оценка родства и сходства осуществляются на основе консенсуса (т.е. концепция и критерии вида находятся в процессе разработки).

Для таксономии цианобактерий наиболее приемлем монофилетический вариант филогенетической концепции вида (Johansen, Casamatta, 2005; Dvořák et al., 2015). В рамках полифазного подхода вид цианобактерий развернуто определяется как “группа популяций (+штаммов), которые принадлежат к одному и тому же генотипу (роду), характеризуются устойчивыми фенотипическими признаками (устанавливаемыми и распознаваемыми, с четкими границами изменчивости) и имеют одни и те же экологические признаки. Они повторно встречаются (во времени) в разных экологически сходных местообитаниях” (Komárek, 2010).

Род прокариотов по совокупности генотипических и фенотипических признаков представлен видом/штаммом (или группой видов/штаммов), не принадлежащих к филогенетическому кластеру другого валидно опубликованного рода, и его обособленное таксономическое положение подтверждается фенотипическими признаками, отсутствующими у соседних родов (Johansen et al., 2021).

В генотипической классификации прокариотов приняты внутренние границы родов, семейств, порядков и классов, соответственно, 94, 92, 89 и 86% сходства последовательности гена 16S рРНК (Yarza et al., 2014; Rosselló-Móra, Amann, 2015). Консенсусным барьером вида, в том числе у цианобактерий, служат >98.65% сходства (Kim et al., 2014).

При установлении внутривидовых и межвидовых границ дополнительным критерием служит сравнение последовательностей, а также вторичной структуры доменов региона 16S-23S ITS (Johansen et al., 2011). Однако если в первом случае предложен порог >7%, то во втором случае он не установлен по причине высокой

вариабельности пространственной организации данных доменов (Dvořák et al., 2023).

Более высокую разрешающую способность обеспечивают данные мультилокусного анализа генных последовательностей (multilocus sequence analysis; MLSA). В частности, для цианобактерий отдельно проводится выравнивание последовательностей генов 16S рРНК, *rpoC1* и *rbcL*, после чего строятся конкатенированные эволюционные деревья (Averina et al., 2021). При описании рода *Sodalinema* вместо последовательностей генов *rpoC1* и *rbcL* использовались последовательности генов *rpoB* и *GyrB* (Samylina et al., 2021).

Интегральным генотипическим признаком служит среднее количество идентичных нуклеотидов всех гомологичных генов в сравниваемых геномах (average nucleotide identity; ANI), а также межгеномная дистанция (Genome-to-Genome Distance; GGD). Принадлежность к одному и тому же виду оценивается сходством в 95 и 70% соответственно (Konstantinidis, Tiedje, 2005; Thompson et al., 2013). Пока еще редкими примерами служит использование этих признаков применительно к некоторым токсинообразующим цианобактериям (Bouma-Gregson et al., 2019), а также при описании нового рода *Pannus* (Machado et al., 2024).

Наконец, ДНК-фингерпринтинг повторяющихся последовательностей STRR, RAPD и HIP1, которые составляют значительную часть генома цианобактерий (см. Anand et al., 2019), позволяет разделять описывать дивергентные, но морфологически сходные *криптовиды* в противоположность генетически однородным, но морфологически и экологически различающимся *морфовидам* и *эковидам* (Casamatta et al., 2003).

Номенклатура

Согласно прокариотному кодексу, таксон считается действительно, или валидно опубликованным (validly published) при наличии описания/диагноза и указания типового материала (type material), или номенклатурного типа.

Кодекс также формулирует условия, при которых название является законным (legitimate), т.е. присвоенным с соблюдением приоритета. Применительно к цианобактериям эти условия обычно не выполняются, и поэтому подавляющее большинство таксонов, описанных с начала 2000-х гг., не входит в “Список названий прокариотов, обладающих номенклатурным статусом” (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature; Parte, 2014).

Значение номенклатурных типов. Номенклатурный тип — это такой элемент таксона, с которым от момента исходной публикации таксона неразрывно связано его название, т.е. тип служит идентификатором и носителем имени таксона. По характеру иерархической лестницы номенклатурных

типов прокариотный кодекс сходен с ботаническим кодексом: имя рода определяет имена семейства и порядка; имя порядка — имя класса. Однако субстанциональное отличие прокариотного кодекса от ботанического заключается в разном типовом материале. В первом случае это типовой штамм, представленный чистой культурой (использование последовательности геномной ДНК в качестве номенклатурного типа обсуждается ниже). Во втором случае типовым материалом может быть описание, а также гербарный или потенциально жизнеспособный, но не поддерживаемый в культуре образец. Данное различие типового материала послужило одной из главных проблем при разработке номенклатуры цианобактерий в рамках прокариотного кодекса.

Подчинение номенклатуры цианобактерий правилам прокариотного кодекса. С тех пор, как синезеленых водорослей отнесли к бактериям, их таксономия не регулировалась Международным Кодексом Номенклатуры бактерий (ICNB; Lapage et al., 1992) / Международным Кодексом Номенклатуры Прокариотов (ICNP; Parker et al., 2019), положения которого отличаются от положений Международного Кодекса Ботанической Номенклатуры (ICBN; Greuter et al., 2000) / Международного Кодекса Номенклатуры водорослей, грибов и растений (ICN; Turland et al., 2018).

Ключевое положение ICNP, или Принцип 2 (вступил в силу с ноября 2000 г.) — *зависимость* (“... is not independent”) номенклатуры прокариотов от ботанической номенклатуры. Эта замысловатая формула означает, что при описании новых таксонов рангом рода и выше следует избегать имен, регулируемых ботаническим кодексом. Другое положение фиксирует дату отсчета для приоритета имен — 01.01.1980 (выход списков валидно опубликованных имен бактерий, Approved Lists of Bacterial Names; Skerman et al., 1980). В отличие от этого, приоритет имен синезеленых водорослей считается от 01.05.1753 (выход Species Plantarum Карла Линнея). Третье положение, или Правило 18а, посвящено номенклатурному типу (см. выше). Четвертое — валидная публикация имен прокариотов по прокариотному кодексу возможна только в Международном журнале по систематике и эволюции микроорганизмов (IJSEM). Напротив, “ботанические” имена могут быть валидно опубликованы в разных печатных изданиях или на разных сайтах.

Тема подчинения номенклатуры цианобактерий кодексу ICNB/ICNP обсуждалась на протяжении 50 лет; в период 1971–2021 гг. ей было посвящено около 20 сообщений. Первое предложение (Stanier et al., 1978) поступило от 12-ти членов подкомитета по таксономии фототрофных бактерий Международного комитета по систематике бактерий (ICSB). После того, как его отклонила Юридическая комиссия по номенклатуре бактерий (JCNB)

при ICSB, началась серия дискуссий на форумах и подкомитетах ICSB. В частности, не исключалась возможность поместить имена цианобактерий под общую юрисдикцию двух кодексов — ботанического и бактериального (Trüper, 1986; Oren, 2004; Oren, Ventura, 2017). Однако обращения в адрес ICSB (позднее — ICSP) с конкретным алгоритмом выхода из тупиковой ситуации долго не поступало (см. Oren, 2004). Когда же, наконец, оно появилось (Oren, Garrity, 2014), международное сообщество цианобактериологов было крайне обеспокоено: ведь предлагалось убрать слово *Cyanobacteria* из Общего Соображения 5 (где перечислены группы, номенклатура которых подчиняется правилам ICNP). Действительно, исключение имен цианобактерий из номенклатуры прокариотов грозило катастрофическими последствиями: по сути, ликвидацией бактериальной таксономии данной группы и утратой смысла очищать культуры и создавать коллекции типовых штаммов. Встречное предложение (Pinevich, 2015) состояло в том, чтобы *в виде исключения* (т.е. в обход действующих правил ICNP) изменить Принцип 2 — считать имена цианобактерий, валидно опубликованные согласно ICN, валидно опубликованными и согласно ICNP. Критика данного предложения (см. Oren, 2020) сводилась к тому, что в нем не комментировались вопросы приоритета присвоения и дублирования имен. В итоге, оба предложения были отклонены заочным голосованием членов ICSP (см. Oren et al., 2021). Тем не менее применительно к цианобактериям комитет ICSP все-таки принял решение о независимости номенклатуры прокариотов от ботанической номенклатуры, и соответствующее положение вошло в новую версию ICNP (Oren et al., 2023).

Классификация

В разное время были созданы три классификационные системы синезеленых водорослей/цианобактерий: а) ботаническая; б) бактериологическая; в) филогеномная.

Ботаническая система. Она разрабатывалась на протяжении XIX в. и первой половины XX в. путем морфологического описания полевых образцов и гербарного материала. Основной вклад, связанный с первичным подразделением на одноклеточный и нитчатый морфотипы, а также с приоритетным описанием многих родов и видов, внесли выдающиеся ботаники XIX в. (см. Mollenhauer, Kováčik, 1988) — Карл Адольф Агард (C.A. Agardh), Эдуар Борне (E. Bornet), Жан Пьер Этьен Воше (J.P.E. Vaucher), Фридрих Траугот Кютцинг (F.T. Kützinger), Карл Вильгельм фон Нэгели (C.W. von Nägeli), Густав-Адольф Тюрэ (G.-A. Thuret) и Шарль Флао (C. Flahaut). В начале XX в. Лотар Гайтлер (Geitler, 1925) распределил описанные

ими рода и виды между пятью “одноклеточными” (Chroococcales, Dermocarpales, Entophysalidales, Pleurocapsales, Siphononematales) и двумя “нитчатыми” (Nostocales и Stigonematales) порядками. Затем, после разбиения или слияния этих таксонов (Geitler, 1932) остались только три порядка: Chroococcales (одноклеточные, бинарно делящиеся), Chamaesiphonales (одноклеточные, гетерополярно делящиеся; почкующиеся, в современной терминологии) и Hormogonales (нитчатые). В дальнейшем по данному алгоритму были созданы системы, различающиеся количеством порядков, но неизменно основанные на фундаментальном подразделении на одноклеточные и нитчатые формы (Еленкин, 1938; Desikachary, 1959; Starmach, 1966).

С середины 1980-х гг. гайтлерианская система поэтапно перерабатывалась и дополнялась с использованием морфологических, ультраструктурных и экофизиологических признаков представителей порядков Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales и Stigonematales (см. Anagnostidis, Komárek, 1985).

Бактериологическая система. В отличие от ботанической системы в данном случае использовался полифазный подход к описанию культивируемых штаммов (Rippka et al., 1979). Однако каркас этой системы по-прежнему составлял ботанический алгоритм. В итоге, цианобактерии распределялись по пяти не таксономическим секциям с разными сочетаниями пар альтернативных морфологических признаков. К ним относились: морфотип (одноклеточный vs. трихомный), способ деления (бинарное vs. множественное), характер ветвления трихома (ложное vs. истинное) и способность к клеточной дифференциации (есть vs. отсутствует). Такая система была с незначительными изменениями использована в двух последовательных изданиях (1989 г. и 2001 г.) руководства Берги. В данном случае пяти секциям sensu Rippka et al. соответствовали морфологические группы, обозначенные как Субсекции I–V (условные эквиваленты ботанических порядков Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales и Stigonematales).

С использованием нетаксономической категории “субсекция” был связан терминологический казус, поскольку цианобактерии исходно подразделялись на пять секций (см. выше). Позднее, в Берги-1989 все бактерии (в том числе “археобактерии”, т.е. археи) были разбиты на 33 фенотипические группы, названные секциями. В частности, Секция 19 (Оксигенные фотосинтезирующие бактерии) состояла из группы (еще одна нетаксономическая категория!) *Cyanobacteria* и порядка *Prochlorales*. В Берги-2001 цианобактерий уже интерпретировали как филу VX *Cyanobacteria* со странным переходом от классификации

на филогенетической основе к фенотипической системе условных порядков, названных субсекциями (Castenholz, 2001).

Субсекции подразделялись на рабочие таксоны – “формы-рода” (form-genus; под формой понимались широко распространенные объекты характерной морфологии, такие, как *Nostoc* spp.; Castenholz, 1992). Формы-рода не объединялись в семейства и не состояли из видов.

За исключением отдельных случаев (в частности, штаммов Субсекций IV и V, образующих дифференцированные клетки), использованная в руководстве Берги система не согласовалась с филогенетическим древом и поэтому в настоящее время она устарела.

Филогеномная классификация. В ее основе лежит не групповое объединение по морфологическому сходству, а эволюционное родство (см. Johansen, Casamatta, 2005). С самого начала целью было отделить монофилетичные таксоны от полифилетичных (Komárek, 2006). Затем на древе появились новые филогенетические порядки Chroococcidiopsidales и Spirulinales (Komárek et al., 2014). Наконец, MLSA-анализ морфологически однородных, но полифилетичных Synechococcales (Komárek et al., 2020) и Oscillatoriales (Martins et al., 2019) позволил описать внутри этих групп новые виды, рода и семейства (Mai et al., 2018; Mishra et al., 2021; Tuji et al., 2021; Zimba et al., 2021), а также обособить порядки Gloeomargaritales ordo nov. (Moreira et al., 2017) и Thermostichales ordo nov. (Komárek et al., 2020).

При разработке новейшей классификации цианобактерий на уровне выше рода были использованы все доступные результаты секвенирования геномов в сочетании с данными 16S рРНК-филогении (Strunecký et al., 2023). Предложенная система, в том числе 10 новых порядков (табл. 2) и 15 новых семейств, опирается на филогеномное древо (особо прослежен феномен морфологической

конвергенции взаимно удаленных таксонов); в комментариях даны фенотипические сведения, полезные полевым исследователям.

Проблема таксономической избыточности цианобактерий. Число описываемых видов цианобактерий неуклонно растет (Nabout et al., 2013). Только за период 2014–2021 гг. число переименованных или вновь описанных таксонов составило примерно 140 родов и 300 видов (Kašovský, 2023). Пугающий рост числа публикаций с описанием новых цианобактерий ведет к таксономической избыточности (“насыщению”; Johansen et al., 2021). В связи с этим имело бы смысл изменить стратегию описания путем либо укрупнения, либо ограниченного дробления таксонов. Для этого можно было бы сузить спектр морфологических признаков (данная стратегия уже использовалась, хотя и без последствий для классификации синезеленых водорослей; Drouet, 1981). Набор генотипических признаков следовало бы, напротив, расширить и пересмотреть в свете разработки концепции вида у цианобактерий (что является частью общей задачи таксономии прокариотов).

Экогеномная классификация. Первым шагом в данном направлении стало комбинированное использование филогеномных данных и экогеномного подхода (Walter et al., 2017). В частности, с использованием множественных маркеров (последовательностей консервативных генов, а также результатов ANI и GGD) было построено конкатенированное эволюционное древо для 99-ти практически полноразмерных (с покрытием в 98.23–100%) геномов. Параллельно с этим на основе метагеномных данных было оценено распределение этих геномов по разным экосистемам.

В результате были предложены 28 новых родов и 32 новых вида, а также выявлены глобальные экогруппы цианобактерий (низкотемпературная, низкотемпературная копитрофная,

Таблица 2. Динамика развития филогеномной системы цианобактерий*

Публикация	Порядки	Общее число семейств
Komárek, 2006	Chroococcales, Gloeobacterales, Nostocales, Oscillatoriales, Pseudanabaenales, Synechococcales	28
Komárek et al., 2014	Chroococcales, Chroococcidiopsidales , Gloeobacterales, Nostocales, Oscillatoriales, Pleurocapsales , Pseudanabaenales, Spirulinales , Synechococcales	45
Strunecký et al., 2023	Acaryochloridales , Aegococcales , Chroococcales, Chroococcidiopsidales, Coleofasciculales , Desertifilales , Geitlerinematales , Gloeobacterales, Gloeomargaritales , Gomontiellales , Leptolyngbyales , Nodosilineales , Nostocales, Oculatellales , Oscillatoriales, Prochlorotrichales , Pseudanabaenales, Spirulinales, Synechococcales, Thermostichales	50

*Вводимые порядки выделены жирным шрифтом.

высокотемпературная олиготрофная). Однако большинство предложенных таксонов не было валидно опубликовано. Кроме того, при обособлении новых таксонов не учитывались те, которые ранее были опубликованы валидно, но без приведения данных геномного секвенирования. Например, штамм PCC 7105, указанный в Берги-2015 как типовой для морского кластера формы-рода *Geitlerinema*, предложен как новый вид *G. catellasis* (Walter et al., 2017). Однако по данным молекулярно-генетического анализа этот штамм не относится к валидно опубликованному и филогенетически подтвержденному роду *Geitlerinema* (Strunecky et al., 2017). Впоследствии он стал типовым для валидно опубликованного нового рода *Baaleninema* с типовым видом *B. simplex* (Samylina et al., 2021). Так или иначе, ответственная номенклатурная идентификация, безальтернативно соотнесенная с генетическими базами данных, имеет принципиальное значение для современных классификационных систем цианобактерий (Komárek, 2016).

Дальнейшее членение глобальных экогрупп может быть осуществлено с использованием таких категорий, как рабочая таксономическая единица (operational taxonomic unit; OTU), таксономическая единица-кандидат (Candidate taxonomic unit; CTU) и экологически значимая таксономическая единица (ecologically significant taxonomic unit; ESTU).

ТАКСОНОМИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В СВЕТЕ НЕКОТОРЫХ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ ПРОКАРИОТНОГО КОДЕКСА

В настоящее время перед прокариотным кодексом стоят, по крайней мере, три проблемы, и все они имеют прямое отношение к таксономии цианобактерий.

Положение ICNP о чистой культуре типового штамма

Согласно кодексу ICNP, номенклатурным типом вида служит штамм, представленный чистой культурой (Правило 18a), т.е. только при этом условии таксон может быть валидно опубликован. Однако даже в последнем издании Кодекса (Oren et al., 2023), термин *чистая культура* используется без уточнения, притом что известное определение (Gottschalk et al., 1992) “...чистая культура микроорганизма — это популяция (клон, штамм), полученная из отдельной клетки и, будучи свободной от других (контаминирующих) микроорганизмов, называемая аксеничной культурой” сформулировано не четко, а рутинные критерии чистоты культуры ненадежны (Pinevich et al., 2018).

Существенно, что под *чистой культурой* (pure culture), притом что чистота как мера удаления

примесей может быть разной (в случае химических реактивов это категории “ч”, “чда” и т.д.), подразумевается *аксеничная культура* (axenic culture, греч. *axenos* — свободный от чужого). Иными словами, это культура, не содержащая посторонних видов, генетически однородная популяция. Однако и возможность получения такой культуры, и достоверность используемых критериев аксеничности вызывают сомнения. Так, остаточная контаминация неизбежно сохраняется не только при применении разных физических способов очистки (промывка, фильтрация, дифференциальное центрифугирование, предельные разведения и т.д.), но и при использовании физиологического метода элективных сред (Vázquez-Martínez et al., 2004). В итоге очищаемый штамм оказывается не аксеничной, а накопительной культурой (enrichment). В свою очередь, рутинным доказательством аксеничности считается тест на фенотипическую однородность популяции: единообразие морфологии объекта и его сходное поведение в микроскопическом препарате, а также образование одинаковых колоний, в том числе на диагностических средах (Gottschalk et al., 1992). Однако судить об аксеничности только с помощью таких тестов невозможно (Heck et al., 2016; Pinevich et al., 2018). Во-первых, за гранью визуального наблюдения могут скрываться сопутствующие ультрамикробы (Huber et al., 2002; Duda et al., 2012). Во-вторых, даже в предельных разведениях и при клонировании очищаемый штамм могут сопровождать некультивируемые объекты (Lagier et al., 2015).

Идеальная (100%-ная) аксеничность — это теоретически предполагаемое стохастическое состояние; на практике оно нереально и недоказуемо (Heck et al., 2016; Pinevich et al., 2018). Иное дело вывод об условной аксеничности (Pinevich et al., 2018). Он возможен по результатам метагеномного анализа, свидетельствующего о присутствии в очищаемой культуре только одного *геновида* (genospecies; Rosselló-Mora et al., 2004) со сходством ампликонов гена 16S рРНК более 98.65% (Kim et al., 2014). Во избежание ложного вывода из-за ПЦР-артефактов необходим дополнительный анализ варибельности ITS, ANI и индекса максимальных уникальных совпадений (MUM).

Для цианобактерий положение ICNP о чистой культуре типового штамма распространяется только на таксоны, валидно опубликованные в журнале IJSEM (до сих пор это только 4 рода и 7 видов; Oren, 2011). Естественно, не следует постфактум оспаривать, что культуры в этих исследованиях действительно были чистыми (как и культуры в первой компиляции таксономии цианобактерий; Rippka et al., 1979). Однако их декларированная аксеничность сомнительна не только по общим соображениям (см. выше), но и в связи со спецификой метаболизма цианобактерий. Во-первых,

первичная продукция неизбежно провоцирует развитие консументов. Во-вторых, обычные у цианобактерий капсулы и чехлы защищают сателлитов от физических и химических воздействий. В-третьих, цианобактерии часто находятся в облигатной зависимости от сателлитов (Velichko et al., 2015; Heck et al., 2016). В итоге, исследователи либо не подозревают, что вместо чистых культур имеют дело с мультиксеничными монокультурами, либо сознательно обходят требование ICNP, считая положение ICNP о чистой культуре типового штамма анахроничным препятствием для современных исследований (Alvarenga et al., 2017).

Добавление ранга филы к ICNP

Фила, или филум (греч. *phylon*, лат. *phylum* поколение) — один из высших рангов в ботанической и зоологической таксономиях, где он, соответственно, выступает как отдел и тип. В таксономии прокариотов фила имеет наивысший ранг и со второй половины 1970-х гг. данная категория используется при обобщении данных 16S-палеонтологии. Однако этот таксон не рассматривался в ICNP. Несмотря на необходимость включить в номенклатуру прокариотов таксоны рангом выше класса, ICSP долго воздерживался от подобного шага, и только по инициативе влиятельных авторитетов (Oren et al., 2015) ранг филы был включен в ICNP (Oren et al., 2023). До этого в рамках номенклатуры, поддержанной базой данных GTDB (Parks et al., 2018), было предложено изменить названия фил, имеющих культивируемых представителей, используя стандартный суффикс *-ota* (Whitman et al., 2018).

Вскоре после публикации списка измененных таким образом названий он был одобрен комитетом ICSP (Oren, Garrity, 2021). Критики данного решения (Lloyd, Tahon, 2022; Panda et al., 2022) обратили внимание на угрозу информационного хаоса при смешении старых и новых названий, особенно в случае широко документированных крупных фил *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*. Далее, ICNP не рекомендует присваивать неблагозвучные названия, а это не было строго соблюдено (например, *Chlamydiota* вместо *Chlamydota*). Наконец, среди новых названий встречаются громоздкие конструкции, например суффикс *-ota* сопровождается прежним полным названием (например, *Chrysiogenetota* вместо *Chrysiogenota*).

Фила *Cyanobacteriota*, как не имевшая номенклатурного статуса, не вошла в упомянутый список по причине отсутствия валидно опубликованного рода *Cyanobacterium* с типовым видом *C. stanieri*. Следует напомнить, что первоначальное предложение подчинить номенклатуру цианобактерий правилам бактериального кодекса (Stanier et al., 1978) было отклонено; позже было отклонено и предложение типового рода *Cyanobacterium* с типовым видом *C. stanieri* и типовым штаммом PCC 7202 (Rippka,

Cohen-Bazire, 1983). Аналогичным образом, было отклонено предложение семейства *Cyanobacteriaceae* (Komárek et al., 2014): этот таксон не имел номенклатурного статуса, поскольку, согласно ботаническому кодексу ICBN, род *Cyanobacterium* был нелегитимным (в описании отсутствовал латинский диагноз и не было ссылки на гербарный голотип).

Согласно последним данным, род *Cyanobacterium* принадлежит к новому семейству *Geminocystaceae* (Tuji et al., 2021). Недавно с использованием полифазного подхода на основе описания типового вида *C. stanieri* он был валидно опубликован по правилам ICN (Oren et al., 2022). Поскольку филогенетический кластер семейства *Geminocystaceae* состоит из субкластера штаммов типового р. *Geminocystis*, субкластера штаммов “*Cyanobacterium aponinum*” и субкластера штаммов “*Cyanobacterium stanieri*” (Polyakova et al., 2023), данная атрибуция не противоречит монофилетическому принципу. Таким образом, с учетом состоявшегося подчинения номенклатуры цианобактерий правилам ICNP (см. выше), название филы *Cyanobacteriota* получает номенклатурный статус.

Создание параллельного ICNP кодекса номенклатуры (SeqCode)

Взрывообразное накопление метаданных (Whitman et al., 2019; Hugenholtz et al., 2021) актуализировало тему имен таксонов-кандидатов, по правилам ICNP не имеющих номенклатурного статуса (Murray, Schleifer, 1994). Попытки радикально решить эту проблему начались с предложения (Whitman, 2016) считать номенклатурным типом по правилам ICNP не только культуру, но и последовательность геномной ДНК. Затем это предложение было дополнительно аргументировано (Konstantinidis et al., 2017; Whitman et al., 2019), и многие исследователи в области метагеномного анализа его поддержали (Murray et al., 2020). Однако комитет ICSP его отклонил (Göker et al., 2022), на что последовал сепаратистский шаг: был разработан и анонсирован кодекс номенклатуры, параллельный ICNP (Whitman et al., 2022).

Основные сведения об этом “Кодексе номенклатуры прокариотов, описанных по данным секвенирования ДНК” (Code of Nomenclature of Prokaryotes Described from Sequence Data; SeqCode), а также руководство к действиям согласно его положениям и рекомендациям, приведены в недавней публикации (Hedlund et al., 2022). Черновик текста размещен по сетевому адресу <https://seqco.de>. Следует подчеркнуть, что за исключением использования другого номенклатурного типа, SeqCode в целом копирует структуру ICNP и признает приоритет имен, опубликованных по его правилам до 01.01.2022 г.

Несмотря на осторожный оптимизм (Konstantinidis et al., 2017), конвергенция между двумя

кодексами, тем более их объединение, маловероятны. Редколлегия журнала IJSEM не намерена рассматривать описания, содержащие ссылку вроде “законно опубликовано по положениям SeqCode” (Göker et al., 2022). В то же время журнал Systematic and Applied Microbiology готов считать имена валидно опубликованными и по правилам ICNP, и по правилам SeqCode (Wu, Ivanova, 2023). Администрация SeqCode временно предоставляет портал “SeqCode Registry” для валидации и курирования имен в порядке, который предписывается “Комитетом по систематике прокариотов, описываемых по данным секвенирования” (Committee on the Systematics of Prokaryotes Described from Sequence Data, CSPDS; см. Hedlund et al., 2022). После прохождения данного фильтра результаты секвенирования/аннотирования генома могут стать предметом журнальной публикации.

Цианобактерии, полученные в смешанной культуре или зарегистрированные в базах данных по последовательности гена 16S рРНК, вряд ли будут аксенизированы в обозримом будущем, так что они на неопределенный срок останутся “кандидатами” по действующим правилам ICNP. Тем не менее с настоящего момента перед ними открыты два выхода из номенклатурного тупика — их имена могут быть валидно опубликованы по правилам ICNP либо по правилам SeqCode в зависимости от изучаемого материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В таксономии цианобактерий происходят эпохальные перемены. В настоящее время цианобактерии интегрированы в общий поток таксономических проблем прокариотов. Эти проблемы решаются на фоне взрывообразного накопления данных секвенирования генов 16S рРНК, а также благодаря глобальным выводам из результатов метагеномного анализа. Прогресс таксономии цианобактерий неразрывно связан с поисками объектов, обладающих ранее неизвестными признаками. Яркими примерами служат описание объектов с несколькими типами не фотосинтетического метаболизма, а также получение штаммов с нетривиальными формами фотосинтетических пигментов, в частности, красно-смешанными хлорофиллами. В задачи будущих исследований входит ограничение таксономической избыточности цианобактерий и дальнейшая разработка концепции их вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят рецензентов за ценные замечания и комментарии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-24-00052.

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

- Гоби Хр. Обзорение системы растений. Петроградъ, 1916. 63 с. + 5 табл.
- Громов Б.В., Мамкаева К.А. Электронно-микроскопическое изучение паразитизма бактерии *Bdellovibrio chlorellavorus* на клетках зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* // Цитология. 1972. Т. 14, С. 256–260.
- Еленкин А.А. Синезеленые водоросли СССР. Монография пресноводных и наземных Суанопхусеае, обнаруженных в пределах СССР. Специальная (систематическая) часть. Вып. 1 (при участии М.М. Голлербаха и др.). М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1938. 985 с.
- Пиневиц А.В. Эволюция светособирающих антенн и филогенез оксигенных фототрофов // Цитология. 1991. Т. 33. С. 3–21.
- Пиневиц А.В., Аверина С.Г. На краю радуги: длинноволновые хлорофиллы и фотосинтетическая адаптация цианобактерий к дальнему красному свету // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 666–684.
- Pinevich A.V., Averina S.G. On the edge of the rainbow: red-shifted chlorophylls and far-red light photoadaptation in cyanobacteria // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 631–648.
- Alvarenga D.O., Fiore M.F., Varani A.M. A metagenomic approach to cyanobacterial genomics // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art 809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00809>
- Anagnostidis K., Komárek J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1 — Introduction // Algol. Stud. 1985. V. 38–39. P. 291–302.
- Anand N., Thajuddin N., Dadheech P.K. Cyanobacterial taxonomy: morphometry to molecular studies // Cyanobacteria: from basic science to applications / Eds. A.K. Mishra, D.N. Tiwari, A.N. Rai. NY & L.: Elsevier, 2019. P. 43–64.
- Arieli B., Shahak Y., Taglicht D., Hauska G., Padan E. Purification and characterization of sulfide-quinone

- reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 5705–5711.
- Averina S.G., Velichko N.V., Pinevich A.A., Senatskaya E.V., Pinevich A.V. Non-*a* chlorophylls in cyanobacteria // Photosynthetica. 2019. V. 57. P. 1109–1118.
- Averina S., Polyakova E., Senatskaya E., Pinevich A. A new cyanobacterial genus *Altericista* and three species *A. lacusladogae* sp. nov., *A. violacea* sp. nov., and *A. variichlora* sp. nov., described using a polyphasic approach // J. Phycol. 2021. V. 57. P. 1517–1529.
- Bland J.A., Brock T.D. Genus IV *Leucothrix* Oersted 1844, 44^{AL} // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. N.Y.: Springer, 2005. V. 2. Part B.P. 162–168.
- Bonen L., Doolittle W.F., Fox G.E. Cyanobacterial evolution: results of 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses // Can. J. Biochem. 1979. V. 57. P. 879–888.
- Bouma-Gregson K., Olm M.R., Probst A.J., Anantharaman K., Power M.E., Banfield J.F. Impacts of microbial assemblage and environmental conditions on the distribution of anatoxin-a producing cyanobacteria within a river network // ISME J. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0374-3>
- Cardona T. A fresh look at the evolution and diversification of photochemical reaction centers // Photosynth. Res. 2015. V. 126. P. 111–134.
- Casamatta D.A., Vis M.L., Sneath R.G. Cryptic species in cyanobacterial systematics, a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data // Aquat. Bot. 2003. V. 77. P. 295–309.
- Castenholz R.W. Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae) // J. Phycol. 1992. V. 28. P. 737–745.
- Castenholz R.W. Oxygenic photosynthetic bacteria // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. / Eds. D.R. Boone, R.W. Castenholz, G.M. Garrity. NY: Springer, 2001. V. 1. P. 474–487.
- Chen M., Li Y., Birch D., Willows R.D. A cyanobacterium that contains chlorophyll *f* – a red-absorbing photopigment // FEBS Lett. 2012. V. 586. P. 3249–3254.
- Cohen Z., Margheri M.C., Tomaselli L. Chemotaxonomy of cyanobacteria // Phytochemistry. 1995. V. 40. P. 1155–1158.
- Colwell R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species // J. Bacteriol. 1970. V. 104. P. 410–433.
- De Bary A. 1885. Vorlesungen über Bakterien. Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann, 1885. 144 S.
- Desikachary T.V. Cyanophyta // I.C.A.R. Monographs on Algae / Ed. M.S. Randhawa. New Dehli: Indian Counc. Agricult. Res., 1959. 686 p.
- Di Rienzi S.C., Sharon I., Wrighton K.C., Koren O., Hug L.A., Thomas B.C., Goodrich J.K., Bell J.T., Spector T.D., Banfield J.F., Ley R.E. The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria // eLife. 2013. V. 2. <https://doi.org/10.7554/eLife.01102>
- Doolittle W.F., Zhaxybayeva O. On the origin of prokaryotic species // Genome Res. 2009. V. 19. P. 744–756.
- Drews G. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology in the 19th century // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. P. 225–249.
- Drouet F. Revision of the *Stigonemataceae* with a summary of the classification of the blue-green algae // Nowa Hedwigia. 1981. V. 6. P. 1–221.
- Duda V.I., Suzina N.E., Polivtseva V.N., Boronin A.M. Ultramicrobacteria: formation of the concept and contribution of ultramicrobacteria to biology // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 379–390.
- Dvořák P., Jahodářová E., Stanojković A., Skoupý S., Casamatta D.A. Population genomics meets the taxonomy of cyanobacteria // Algal Res. 2023. V. 72. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103128>
- Dvořák P., Pouličková A., Hašler P., Belli M., Casamatta D.A., Papini A. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification // Biodivers. Conserv. 2015. V. 24. P. 739–757.
- Fischer A. Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien. Jena, Gustav Fischer, 1897. 136 S.
- Fritsch F.E. The structure and reproduction of the algae. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1945. V. II. 939 p.
- Garcia-Pichel F., Zehr J.P., Bhattacharya D., Pakrasi H.B. What's in a name? The case of cyanobacteria // J. Phycol. 2020. V. 56. P. 1–5.
- Geitler L. Cyanophyceae. Jena, Gustav Fischer Verlag, 1925. 450 p.
- Geitler L. Cyanophyceae // Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Leipzig: Akad. Verlag, 1932. Bd. XIV. 1196 S.
- Geitler L. Einige kritische Bemerkungen zu neuen zusammenfassenden Darstellungen der Morphologie und Systematik der Cyanophyceen // Pl. Syst. Evol. 1979. V. 132. P. 153–160.
- Göker M., Moore E.R.B., Oren A., Trujillo M. Status of the SeqCode in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2022. V. 72. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005754>
- Gottschalk J.C., Harder W., Prins R.A. Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of bacteria // The Prokaryotes. 2nd edn. / Eds. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer. NY e.a.: Springer, 1992. V. 1. P. 149–196.
- Greuter W., McNeill J., Barrie F.R. et al. (Eds.). International Code of Botanical Nomenclature (St. Louis Code), adopted by the Sixteenth International Botanical Congress, St. Louis, Missouri, July–August 1999. Königstein, Koeltz Sci. Books, 2000. 28 p.
- Gromov B., Mamkaeva K. In: Validation List No. 5. Validation of the publication of new names and new combinations

- previously effectively published outside the IJSB // Int. J. Syst. Bacteriol. 1980. V. 30. P. 676–677.
- Guglielmi G., Cohen-Bazire G. Etude taxonomique d'un genre de cyanobactérie Oscillatoriacée: le genre *Pseudanabaena* LAUTERBORN. I. Etude ultrastructurale // Protistologica. 1984. V. 20. P. 377–391.
- Heck K., Machineski G.S., Alvarenga D.O., Vaz M.G.M.V., de Mello Varani A., Fiore M.F. Evaluating methods for purifying cyanobacterial cultures by qPCR and high-throughput Illumina sequencing // J. Microbiol. Meth. 2016. V. 129. P. 55–60.
- Hedlund B.P., Chuvochina M., Hugenholtz P., Konstantinidis K.T., Murray A.E., Palmer M., Parks D.H., Probst A.J., Reysenbach A.-L. SeqCode: a nomenclatural code for prokaryotes described from sequence data // Nat. Microbiol. 2022. V. 7. P. 1702–1708.
- Hoffmann L., Komárek J., Kaštovský J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004 // Algolog. Stud. 2005. V. 117. P. 95–115.
- Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., Stetter K.O. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont // Nature. 2002. V. 414. P. 63–67.
- Hugenholtz P., Chuvochina M., Oren A., Parks D.Y., Soo R.M. Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequencing data // ISME J. 2021. V. 15. P. 1879–1892.
- Johansen J.R., Casamatta D.A. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm // Algol. Stud. 2005. V. 117. P. 71–93.
- Johansen J.R., González-Rezendis L., Escobar-Sánchez V., Segal-Kischinevsky C., Martínez-Yerena J., Hernández-Sánchez J., Hernández-Pérez G., León-Tejera H. When will taxonomic saturation be achieved? A case study in *Nunduva* and *Kyrtuthrix* (Rivulariaceae, Cyanobacteria) // J. Phycol. 2021. V. 57. P. 1699–1720.
- Johansen J.R., Kovacik L., Casamatta D.L., Iková K.F., Kaštovský J. Utility of 16S–23S sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria) // Nova Hedwigia. 2011. V. 92. P. 283–302.
- Kämpfer P., Spring S. Genus *Incertae Sedis* XVI. *Sphaerotilus*. Kützing 1833, 386^{AL} // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. NY: Springer, 2005. V. 2. Part C.P. 750–755.
- Kaštovský J. Welcome to the jungle!: an overview of modern taxonomy of cyanobacteria // Hydrobiologia. 2024. V. 851. P. 1063–1077.
<https://doi.org/10.1007/s10750-023-05356-7>
- Kim M., Oh H.S., Park S.C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 346–351.
- Komárek J. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches // Algae. 2006. V. 21. P. 349–375.
- Komárek J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept) // Hydrobiologia. 2010. V. 639. P. 245–259.
- Komárek J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications // Eur. J. Phycol. 2016. V. 51. P. 346–353.
<https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1163738>
- Komárek J., Johansen J.R., Šmarda J., Strunecký O. Phylogeny and taxonomy of *Synechococcus*-like cyanobacteria // Fottea. 2020. V. 20. P. 171–191.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach // Preslia. 2014. V. 86. P. 295–335.
- Konstantinidis K.T., Rosselló-Móra R., Amann R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy // ISME J. 2017. V. 11. P. 2399–2406.
- Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 2567–2572.
- Lagier J.-C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology // Clin. Microbiol. Rev. 2015. V. 8. P. 208–235.
- Lapage S.P., Sneath P.H.A., Lessel E.F., Lessel E.F., Skerman V.B.D., Seeliger H.P.R., Clark W.A. (Eds.). International Code of Nomenclature of Bacteria. Bacteriological Code, 1990 Revision. Washington (DC): ASM Press, 1992. 159 p.
- Lewin R. The Prochlorophytes // The Prokaryotes. A handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria / Eds. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H. Schlegel. Berlin e.a.: Springer, 1981. V. 1. Ch. 13. P. 257–266.
- Litvaitis M.K. A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analysis // Hydrobiologia. 2002. V. 468. P. 135–145.
- Lloyd K.G., Tahon G. Science depends on nomenclature, but nomenclature is not science // Nat. Rev. Microbiol. 2022. V. 20. P. 123–124.
- Los D.A., Mironov K.S. Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria: an update // Life. 2015. V. 5. P. 554–567.
- Machado M.J., Botero N.B., Andreote A.P.D., Feitosa A.M.T., Popin R.V., Sivonen K., Fiore M.F. Genomic insights into the taxonomy and metabolism of the cyanobacterium *Pannus brasiliensis* CCIBt3594 // Taxonomy. 2024. V. 4. P. 184–198.
- Mai T., Johansen J.R., Pietrasiak N., Bohunická M., Martin P. Revision of the *Synechococcales* (Cyanobacteria) through recognition of four families including *Oculatellaceae* fam. nov., and *Trichocoleaceae* fam. nov. and six new genera containing 14 species // Phytotaxa. 2018. V. 365.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.365.1.1>

- Mareš J., Strunecký O., Bučinská L., Wiedermannová J. Evolutionary patterns of thylakoid architecture in Cyanobacteria // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 277. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00277>
- Martins M.D., Machado-de-Lima N.M., Branco L.H.Z. Polyphasic approach using multilocus analysis supports the establishment of the new aerophytic cyanobacterial genus *Pycnacronema* (Coleophasciculaceae, Oscillatoriales) // *J. Phycol.* 2019. V. 55. P. 146–159.
- Matheus Carnevali P.B., Schultz F., Castelle C.J., Kantor R.S., Shih P.M., Sharon I., Santini J.M., Olm M.R., Amano Y., Thomas B.C., Antharaman K., Burstein D., Becraft E.D., Stepanauskas K., Woyke T., Banfield J.F. Hydrogen-based metabolism as an ancestral trait in lineages sibling to the Cyanobacteria // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. Art. 463. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08246-y>
- Mishra D., Saraf A., Kumar N., Pal S., Singh P. Issues in cyanobacterial taxonomy: comprehensive case study of unbranched, false branched and true branched heterocystous cyanobacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 2021. V. 368. Art. fnab005. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab005>
- Mollenhauer D., Kováčik L. Who was who in Cyanophyte research. I. // *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 80. 1988. V. 80. P. 1–4.
- Moreira D., Tavera R., Benzerara K., Skouri-Panet F., Couradeau E., Gérard E., Lousset Fonto C., Novelo E., Zivanovic Y., López-García P. Description of *Gloeomargarita lithophora* gen. nov., sp. nov., a thylakoid-dearing, basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal of *Gloeomargaritales* ord. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 653–658.
- Murray A.E., Freudenstein J., Gribaldo S., and other 61 authors. Roadmap for naming uncultivated Archaea and Bacteria // *Nat. Microbiol.* 2020. V. 5. P. 987–994.
- Murray R.G.E. A place for bacteria in the living world // *Bergey's Manual of determinative Bacteriology* / Eds. R.E. Buchanan, N.E. Gibbons. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1974. P. 4–9.
- Nabout J.C., da Silva Rocha B., Carneiro F.M., Sant'Anna C.L. How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number // *Biodivers. Conserv.* 2013. V. 22. P. 2907–2918.
- Oren A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 1895–1902.
- Oren A. Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy / *International Journal of Systematic Bacteriology* / *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 10–15.
- Oren A. Three alternative proposals to emend the Rules of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes to resolve the status of the *Cyanobacteria* in the prokaryotic nomenclature // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 4406–4408.
- Oren A., Arahal D.R., Göker M., Moore E.R.B., Rosselló-Mora R., Sutcliffe I.C. International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2022 Revision) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2023. V. 73. Art. 005585. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005585>
- Oren A., Arahal D.R., Rosselló-Mora R., Sutcliffe I.C. Emendation of General Consideration 5 and Rules 18a, 24a and 30 of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes to resolve the status of the *Cyanobacteria* in the prokaryotic nomenclature // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021. V. 71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004939>
- Oren A., da Costa M.S., Garrity G.M. et al. Proposal to include the rank of phylum in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 4284–4287.
- Oren A., Garrity G.M. Proposal to change General Consideration 5 and Principle 2 of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 309–310.
- 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>
- Oren A., Mareš J., Rippka R. Validation of the names *Cyanobacterium* and *Cyanobacterium stanieri*, and proposal of *Cyanobacteriota* phyl. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2022. V. 72. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005528>
- Oren A., Shilo M. Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*: sulfur respiration and lactate fermentation // *Arch. Microbiol.* 1979. V. 122. P. 77–84.
- Oren A., Ventura S. The current status of cyanobacterial nomenclature under the “prokaryotic” and the “botanical” code // *Ant. van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. P. 1257–1269.
- Panda A., Islam S.T., Sharma G. Harmonizing prokaryotic nomenclature: fixing the fuss over phylum name flipping // *mBio*. 2022. V. 13. Art. e00970-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.00970-22>
- Parker C.T., Tindall B.J., Garrity G.M. International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2008 revision) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. S1–S111.
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 35. P. 996–1004.
- Parte A.C. LPSN – List of prokaryotic names with standing in nomenclature // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 613–616.
- Pinevich A.V. Proposal to consistently apply the International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP) to names of the oxygenic photosynthetic bacteria (cyanobacteria) including those validly published under the International Code of Botanical Nomenclature

- (ICBN)/International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (ICN), and proposal to change Principle 2 of the ICNP // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 1070–1074.
- Pinevich A.V., Andronov E.E., Pershina E.V., Pinevich A.A., Dmitrieva H.Y. Testing culture purity in prokaryotes: criteria and challenges // Ant. van Leeuwenhoek. 2018. V. 111. P. 1509–1521.
- Pinevich A., Averina S. New life for old discovery: amazing story about how bacterial predation on *Chlorella* resolved a paradox of dark cyanobacteria and gave the key to early history of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration // Protistology. 2021. V. 15. P. 107–126.
- Pinevich A.V., Averina S.G., Velichko N.V. Another view on the role of photosynthetic pigments in taxonomy of oxygenic-phototrophic bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 1264–1267.
- Pinevich A., Velichko N., Ivanikova N. Cyanobacteria of the genus *Prochlorothrix* // Front. Microbiol. 2012. V. 3. Art. 173.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00173>
- Plazinski J., Zheng Q., Taylor R., Croft L., Rolfe B.G., Gunning B.E. DNA probes show genetic variation in cyanobacterial symbionts of the *Azolla* fern and a closer relationship to free-living *Nostoc* strains than to free-living *Anabaena* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 1263–1270.
- Polyakova E., Averina S., Pinevich A. *Geminocystis urbisnovae* sp. nov. (Chroococcales, Cyanobacteria): polyphasic description complemented with a survey of the family *Geminocystaceae* // Algae. 2023. V. 38. P. 93–110.
- Ponce-Toledo R.I., Deschamps P., López-García P., Zivanovic Y., Berzerara K., Moreira D. An early-branching freshwater cyanobacterium at the origin of plastids // Curr. Biol. 2016. V. 27. P. 1–6.
- Prakash O., Verma M., Sharma P., Kumar M., Kumari K., Singh A., Kumari H., Jit S., Gupta S.K., Khanna M., Lal R. Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances // Indian J. Microbiol. 2007. V. 47. P. 98–108.
- Rahmatpour N., Hauser D.A., Nelson J.M., Chen P.Y., Villareal A.J.C., Ho M.-Y., Li F.-W. A novel thylakoid-less isolate fills a billion-year gap in the evolution of Cyanobacteria // Curr. Biol. 2021. V. 31. P. 1–14.
- Reichenbach H. Taxonomy of the gliding bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 1981. V. 35. P. 339–364.
- Reichenbach H., Ludwig W., Stackebrandt E. Lack of relationship between gliding cyanobacteria and filamentous gliding heterotrophic bacteria: comparison of 16S rRNA catalogues of *Spirulina*, *Saprospira*, *Vitreoscilla*, *Leucothrix*, and *Herpetosiphon* // Arch. Microbiol. 1986. V. 145. P. 391–395.
- Rippka R., Cohen-Bazire G. The cyanobacteriales: A legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? // Ann. Microbiol. (Paris). 1983. V. 134B. P. 21–36.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 111. P. 1–61.
- Rosselló-Móra R., Amann R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea // Syst. Appl. Microbiol. 2015. V. 38. P. 209–216.
- Rosselló-Móra R., Kämpfer P. Defining microbial diversity – the species concept for prokaryotic and eukaryotic microorganisms // Microbial diversity and bioprospecting / Ed. A.T. Bull. Washington, DC.: ASM Press, 2004. P. 29–39.
- Samylina O.S., Sinetova M.A., Kupriyanova E.V., Starikov A. Yu., Sukhacheva M.V., Dziuba M.V., Tourova T.P. Ecology and biogeography of the “marine Geilertinema” cluster and description of *Sodalinema orleanskyi* sp. nov., *Sodalinema gerasimenkovae* sp. nov., *Sodalinema stali* sp. nov. and *Baaleninema simplex* gen. et sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) // FEMS Microbiol. Ecol. 2021. V. 97. Art. fiab104.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiab104>
- Schütz M., Brugna M., Lebrun E., Baymann F., Huber R., Stetter K.O., Hauska G., Toci R., Lemesle-Meunier D., Tron P., Schmidt C., Nitschke W. Early evolution of cytochrome *bc* complexes // J. Mol. Biol. 2000. V. 300. P. 663–675.
- Shih P.M., Hemp J., Ward L.M., Matzke N.J., Fischer W.W. Crown group Oxyphotobacteria postdate the rise of oxygen // Geobiology. 2017. V. 15. P. 19–29.
- Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath P.H.A. Approved lists of bacterial names // Int. J. Syst. Bacteriol. 1980. V. 30. P. 225–420.
- Sly L.I., Fegan M. Genus IV. *Lewinella* Sly, Taghavi and Fegan 1998, 735^{VP} // Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. / Eds. N.R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown et al. NY e.a.: Springer, 2011. V. 4. P. 366–370.
- Smith A.J. Modes of cyanobacterial carbon metabolism // The Biology of Cyanobacteria / Eds. N.G. Carr, B.A. Whitton. Oxford e.a.: Blackwell Sci. Publ., 1982. P. 47–85.
- Spring S., Kämpfer P. Genus *Incertae Sedis* XIII. *Leptothrix*. Kützing 1843, 184^{AL} // Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edn. / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. NY: Springer, 2005. V. 2. Part C. P. 740–746.
- Stanier R.Y. The position of cyanobacteria in the world of phototrophs // Carlsberg Res. Commun. 1977. V. 42. P. 77–98.
- Stanier R.Y., Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria // Annu. Rev. Microbiol. 1977. V. 31. P. 225–274.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // Bacteriol. Rev. 1971. V. 35. P. 171–205.
- Stanier R.Y., van Niel C.B. The concept of a bacterium // Arch. Mikrobiol. 1962. B. 42. S. 17–35.
- Stanier R.Y., Siström W.R., Hansen T.A., Whitton B.A., Castenholz R.W., Pfennig N., Gorlenko V.M.,

- Kondratieva E.N., Eimhjellen K.E., Whittenbury R., Gherna R.L., Trüper H.G. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1978. V. 28. P. 335–336.
- Starmach K. Cyanophyta-Sinice // *Flora slodkowodna Polski*. Warszawa: PAN, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, 1966. V. 2. P. 1–753.
- Strohl W.R. Genus *Vitreoscilla* Pringsheim 1949c, 70^{AL} // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. NY: Springer, 2005a. V. 2. Part C.P. 851–858.
- Strohl W.R. Genus III *Beggiatoa* Trevisan 1842, 56^{AL} // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. NY: Springer, 2005b. V. 2. Part C.P. 148–161.
- Strunecký O., Ivanova A.P., Mareš J. An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis // *J. Phycol.* 2023. V. 59. P. 12–51.
- Takaichi S. Carotenoids in algae: distribution, biosyntheses and functions // *Mar. Grugs.* 2011. V. 9. P. 1101–1118.
- Thauer R.K. A fifth pathway of carbon fixation // *Science*. 2007. V. 318. P. 1732–1733.
- Thompson C.C., Chimetto L., Edwards R.A. et al. Microbial genomic taxonomy // *BMC Genomics*. 2013. V. 14. Art. 913.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-913>
- Tindall B.J., Rosselló-Mora R., Busse H.-J., Ludwig W., Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 249–266.
- Trüper H.G. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Phototrophic Bacteria. Minutes of the Discussion Workshop: Taxonomy of Cyanobacteria, 17 to 19 June 1985, Paris, France // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1986. V. 36. P. 114–115.
- Tuji A., Yamaguchi H., Kataoka T., Sato M., Sano T., Niyaama Y. *Annamia dubia* sp. nov. with a description of a new family, Geminocystaceae fam. nov. (Cyanobacteria) // *Fottea*. 2021. V. 21. P. 100–109.
- Turland N.J., Wiersma J.H., Barrie F.R., Greuter W., Hawksworth D.L., Herendeen P.S., Knapp S., Kusber W.-H., Li D.-Z., Marhold K., May T.W., McNeill J., Monro A.M., Prado J., Price M.J., Smith G.F. [Eds.]. International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Shenzhen Code) Adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017. *Regnum Vegetabile* 159. Glashütten, Koeltz Botanical Books, 2018. 254 p.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics // *Microbiol. Rev.* 1996. V. 60. P. 407–438.
- Vázquez-Martínez G., Rodríguez M.H., Hernández-Hernández F., Ibarra J.E. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis* // *J. Microbiol. Meth.* 2004. V. 57. P. 115–121.
- Velichko N., Chernyaeva E., Averina S., Gavrilova O., Lapidus A., Pinevich A. Consortium of the “bichlorophyllous” cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica* and chemoheterotrophic partner bacteria: culture and metagenome-based description // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 7. P. 623–633.
- Velichko N.V., Pinevich A.V. Classification and identification tasks in microbiology: mass spectrometric methods coming to the aid // *Microbiology (Moscow)*. 2019. V. 88. P. 534–547.
- Velichko N., Smirnova S., Averina S., Pinevich A. A survey of Antarctic cyanobacteria // *Hydrobiologia*. 2021. V. 11. P. 2627–2652.
- Walter J.M., Coutinho F.H., Dutilh B.E., Dutilh B.E., Swings J., Thompson F.L., Thompson C.C. Ecogenomics and taxonomy of Cyanobacteria phylum // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 2132.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02132>
- Ward L.M., Cardona T., Holland-Moritz H. Evolutionary implications of anoxygenic phototrophy in the bacterial phylum *Candidatus Eremiobacterota* (WPS-2) // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 1658.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01658>
- Whitman W.B. Modest proposals to expand the type material for naming prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 2108–2112.
- Whitman W.B., Chuvochina M., Hedlund B.P., Hugenholtz P., Konstantinidis T.T., Murray A.E., Palmer M., Parks D.H., Probst A.J., Reysenbach A.-L., Rodrigues R.L.M., Rosselló-Móra R., Sutcliffe I., Venter S.N. Development of the SeqCode: A proposed nomenclatural code for uncultivated prokaryotes with DNA sequences as type // *Syst. Appl. Microbiol.* 2022. V. 45. Art. 126305.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126305>
- Whitman W.B., Oren A., Chuvochina M. Proposal of the suffix *-ota* to denote phyla. Addendum to “Proposal to include the rank of phylum in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes” // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 967–969.
- Whitman W.B., Sutcliffe I.C., Rosselló-Mora R. Proposal for changes in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes: granting priority to *Candidatus* names // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 2174–2175.
- Williams H.N., Baer M.L., Tudor J.J. Genus I. *Bdellovibrio* Stolp and Starr 1963, 243^{AL} // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. NY: Springer, 2005. V. 2. Part C.P. 1041–1053.
- Wu D., Ivanova N. A tale of two codes // *Nature Rev. Microbiol.* 2023. V. 21. P. 486.
- Xiong J., Bauer C.E. Complex evolution of photosynthesis // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. V. 53. P. 503–521.
- Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.D., Ludwig W., Scleifer K.-H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R.,

Roselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA sequences // Nature Rev. Microbiol. 2014. V. 12. P. 635–645.

Zimba P.V., Shalygin S., Huang I. et al. A new boring toxin producer – *Perforafilum tunnelli* gen. & sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) isolated from Laguna Madre, Texas, USA // Phycologia. 2021. V. 60. P. 10–24.

REVIEWS

Taxonomy of Cyanobacteria: The Era of Change

A. V. Pinevich^{1, *} and S. G. Averina¹

¹Saint Petersburg State University, St.-Petersburg, 199034, Russia

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

Abstract. Until mid-1970s, cyanobacteria have been interpreted as algae despite they differed from other members of this taxonomic group by the absence of cell nucleus (that is currently considered a character of prokaryotic organization). However, when bacteria were reinterpreted as prokaryotes, blue-green algae became reattributed as cyanobacteria, and bacteriologists began to study their cultured strains with microbiology methods. But since these objects did not obey the provisions of bacteriological code (ICNB), the development of their taxonomy had certain problems, especially regarding nomenclature, that could not be solved until early-2010s. Current changes in taxonomy of cyanobacteria result from a general progress in taxonomy of prokaryotes due to the explosive accumulation of 16S rRNA gene sequencing data, particularly of uncultured objects. Advances in the description of cyanobacteria are as follows: I) based on polyphasic approach, new taxa ranging from species to order were published; II) “dark” objects demonstrating several types of non-photosynthetic metabolism were described; III) the objects producing red-shifted chlorophylls *d* and *f* were published. Advances in the nomenclature of cyanobacteria are: IV) taxa validly published according to the botanical code (ICN) are also considered valid under the prokaryotic code (ICNP); V) category of phylum was introduced into ICNP, and due to valid publication of the type genus *Cyanobacterium*, the phylum name *Cyanobacteriota* became legitimate; VI) names of uncultured *Candidatus* objects could get standing in nomenclature based on the SeqCode in which type material is represented by genomic DNA sequences. Advances in the classification of cyanobacteria are: VII) evolutionary tree of oxygenic phototrophs and related phylotypes was construed; VIII) phylogenomic system of orders and families was elaborated; IX) ecogenomic system combining genome analysis and genome distribution data was offered. The subject for future research is a restriction of taxonomic redundancy in cyanobacteria, and further attempts to develop their species concept.

Keywords: International Code of Botanical Nomenclature (ICN), International Code of Nomenclature of Prokaryotes Described from Sequence Data (SeqCode), molecular phylogeny, phylum, polyphasic approach, Prokaryotic Code (ICNP), pure culture, taxonomy of cyanobacteria, type strain, *Vampirovibrionia*

УДК 579.22+579.81:57.083.18

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ОЦЕНКА ЭКЗОГЕННЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ “*ANABAENA*” SP. IPPAS B-2020¹

© 2024 г. Ю. В. Батаева^{a, *}, М. А. Синетова^b, Е. А. Курашов^c, Ю. В. Крылова^c,
Л. В. Коломбет^a, Л. Н. Григорян^d

^aГосударственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора,
Оболensk, 142279, Россия

^bИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276, Россия

^cИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
п. Борок, Некоузский район, Ярославская область, 152742, Россия

^dАстраханский государственный университет им В.Н. Татищева, Астрахань, 414056, Россия

*e-mail: aveatab@mail.ru

Поступила в редакцию 09.11.2023 г.

После доработки 12.01.2024 г.

Принята к публикации 15.01.2024 г.

Культура цианобактерий “*Anabaena*” sp. выделена из аллювиальных луговых почв юга России и депонирована в коллекции культур микроводорослей и цианобактерий IPPAS Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под номером IPPAS B-2020. Филогенетический анализ показал, что изучаемый штамм относится к кладе, объединяющей роды *Sphaerospermopsis*, *Amphiheterocytum*, *Raphidiopsis*, *Wollea* и *Neowollea*, но не может быть в настоящее время отнесен ни к одному из них. Изучена фитотоксичность, фунгицидная и антиоксидантная активности штамма. Культура оказалась нетоксична. Водно-спиртовой экстракт и биомасса “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 полностью подавляли рост микромицетов *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides* с максимальным диаметром зоны ингибирования 2.5 см. Выраженной антиоксидантной активностью обладал водный экстракт цианобактерий “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 – 39.3%. В составе метаболитов “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 обнаружены органические кислоты (изолимонная, молочная, уксусная), терпены, алканы, спирты и другие низкомолекулярные органические соединения. Культура “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 представляет интерес для биотехнологии как продуцент таких важных биологически активных соединений, как трибутилфосфат, D-лимонен, сквален, α-пинен.

Ключевые слова: цианобактерии, *Aphanizomenonaceae*, метаболиты, антиоксидантная активность, фунгицидная активность, экстракт, хромато-масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0026365624050026

Цианобактерии – морфологически разнообразная группа прокариот, включающая одноклеточные, трихотомные и колониальные формы. По характеру клеточной организации они соответствуют грамотрицательным бактериям и представляют самостоятельную ветвь их эволюции (Панкратова, 2010). При этом цианобактерии имеют сходство с водорослями и высшими растениями, так как осуществляют фотосинтез с выделением кислорода и содержат хлорофилл *a*, а также ряд других общих с растениями пигментов

(Пиневиц, Аверина, 2022). Понимание невозможности разграничения видов цианобактерий на основе морфологических признаков пришло с развитием технологии секвенирования ДНК, которая на сегодняшний день является необходимым инструментом для описания новых и ревизии известных видов, определения их границ, проверки традиционных видовых концепций (Komárek, 2014; Темралева и соавт., 2021; Strunecký, 2023).

Цианобактерии участвуют в почвообразовательном процессе и часто составляют основной

¹Дополнительные материалы к статье размещены по ссылке DOI: 10.31857/S0026365624050026

фототрофный компонент сообщества микроорганизмов (Бессолицына, 2012; Bataeva et al., 2017). Одновременно с фотосинтезом цианобактерии фиксируют атмосферный азот, накапливая его в почве в количестве до 25–150 кг/га в год, и тем самым вносят существенный вклад в обогащение почвы азотом, подготавливая ее для заселения другими организмами (Андреюк и соавт., 1990).

В процессе жизнедеятельности цианобактерии продуцируют комплекс биологически активных метаболитов различного состава, включая белки, углеводы, липиды, органические кислоты, стеринны, изопреноиды, гормоны, фенольные соединения, витамины и др. (Singh et al., 2017; Bataeva et al., 2018; Dabravolski, Isayenkov, 2022). Среди этих веществ низкомолекулярные органические соединения (НОС) являются одними из наименее изученных. Метаболиты цианобактерий обладают антибактериальными, антиоксидантными, противогрибковыми, фитостимулирующими, аллелопатическими свойствами (Ferrari et al., 2015; Kumar et al., 2016; Bataeva et al., 2018). Поступая в корни растений, они интенсифицируют их рост, увеличивают урожайность сельскохозяйственных культур, сокращают сроки созревания, повышают питательную ценность, повышают устойчивость к неблагоприятным факторам, защищают от болезней и выполняют многие другие функции (Hirsch, 2004; Трефилова, 2008; Цавкелова, 2021; Батаева, 2022). Цианобактерии известны фитостимулирующей активностью в отношении злаковых (Prasanna et al., 2012; Fadl-Allah et al., 2011), бобовых (Панкратова и соавт., 2008; Трефилова, Патрушева, 2009; патент № 2734987), овощных (патент № 2634387; Батаева и соавт., 2020; Батаева, Григорян, 2022) и масличных культур (патент № 2734987; Батаева и соавт., 2022). Известен антагонизм цианобактерий к грибам, вызывающим болезни растений. Например, цианобактерии *Lyngbya majuscula*, *Nostoc muscorum*, *Nostoc palludosum*, *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica*, *Scytonema ocellatum*, *Phormidium tenue*, *Nodularia harveyana*, *Fischerella muscicola*, *Tolypothrix* sp. проявляли ингибирующую активность в отношении представителей рода *Fusarium* и других фитопатогенов (Kajiyma et al., 1998; Ramamurthy, 2012; Гольдин, 2013).

Высокая пластичность метаболизма и адаптация цианобактерий на таксономическом и физиолого-биохимическом уровнях организации обуславливает возможность разработки на их основе новых агробiotехнологических методов и ценных препаратов (Lacar-Bugler et al., 2017; Домрачева и соавт., 2021).

Таким образом, целью работы стал поиск почвенных цианобактерий, имеющих биотехнологический потенциал. В задачи работы входило выделение и идентификация нового штамма, а также исследование его фитотоксичности, фунгицидной, антиоксидантной активностей и состава экзогенных метаболитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение культуры цианобактерий. Цианобактериальный штамм изолировали из образцов аллювиальных луговых почв ясеневое леса Астраханской области, на которых визуальным способом не было отмечено биокорков. Сначала получали накопительную культуру на среде BG-11 (Гайсина и соавт., 2008), затем абиологически чистую культуру выделяли методом кратного разведения, поочередно пересаживая необходимые колонии на жидкую и плотную среду BG-11. Полученную культуру цианобактерий депонировали в коллекции культур микроводорослей и цианобактерий IPPAS Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под номером IPPAS B-2020.

Культивирование проводили в люминесцентных при освещении 600–700 лк при температуре 22–25°C. О росте цианобактерий судили по изменению цвета, образованию пленок, обрастаний, выделению газа. Микроскопирование клеток цианобактерий осуществляли с использованием микроскопа Axio Imager D1 с камерой AxioCam MRc (“Carl Zeiss”, Йена, Германия). Для получения достаточного количества биомассы культуру IPPAS B-2020 выращивали в течение 30 сут на среде BG-11, после чего использовали для экспериментальной работы и получения экстрактов.

Идентификация штамма IPPAS B-2020. Идентификацию по фенотипическим признакам проводили по определителю (Komárek, 2013).

Для молекулярно-генетической идентификации ДНК цианобактерий выделяли фенол-хлороформным методом (Mironov, Los, 2015). Последовательность 16S рРНК амплифицировали с помощью универсальных бактериальных праймеров 16S_F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Eden et al., 1991) и 16S_R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (Takeuchi et al., 1993). Последовательность 16S–23S ITS региона амплифицировали с помощью универсальных бактериальных праймеров ITS_F 5'-TGACACACCGCCCGTC-3' и ITS_R 5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3' (Iteman et al., 2000). Полученные продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) разделяли электрофорезом в агарозном геле, вырезали участки геля, содержащие продукт ПЦР, и выделяли ДНК из геля набором GenJet Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, Уолтем, США), используя стандартный протокол производителя. Амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали по Сенгеру (“Евроген”, Москва, Россия) с помощью праймеров, использованных для ПЦР и дополнительных праймеров для 16S рРНК CYA106F 5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3' CYA781R 5'-GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT-3' (Nübel et al., 1997). Полученные при секвенировании

последовательности собирали в единый контиг 16S рРНК-ITS с помощью программного обеспечения SeqMan Pro Lasergene v. 12.3.1 (“DNASar Inc.”, Мэдисон, Висконсин, США). Полученный контиг содержал 1969 нуклеотидов и был депонирован в базу данных GenBank NCBI под номером OR712118.

Для поиска гомологичных последовательностей использовали первые 1475 нуклеотидов полученной последовательности OR712118, кодирующие 16S рРНК. Поиск проводили в базе данных Genbank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с помощью алгоритма Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для дальнейшего анализа отбирали последовательности культивируемых штаммов цианобактерий с покрытием не менее 95% и идентичностью более 95.6%. Кроме того, к анализу были добавлены последовательности референсных штаммов и штаммов с проанализированным таксономическим положением, принадлежащих к родам сем. *Aphanizomenonaceae*, пор. *Nostocales* (Strunecký et al., 2023). В качестве внешней группы использовали последовательность 16S рРНК *Gloeobacter violaceae* PCC 7421. Список использованных для анализа последовательностей приведен в таблице S1.

Отобранные 142 последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalW в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) и затем редактировали вручную. После выравнивания длина анализируемых последовательностей равнялась 1036 п.н.

Филогенетические деревья строили в программе MEGA X с помощью двух алгоритмов, Neighbor-Joining и Maximum Likelihood. В качестве оптимальной модели нуклеотидных замен в первом случае была выбрана модель K2+G (двухпараметрическая модель Кимуры с гамма-распределением), во втором — модель K2+G+I (двухпараметрическая модель Кимуры с гамма-распределением и инвариантными сайтами). Статистическую достоверность кластеров оценивали с помощью бутстреп-анализа (1000 реплик).

Генетические дистанции p-distance рассчитывали в программе MEGA X. Генетическое сходство рассчитывали по формуле $100 \times [1 - (p\text{-distance})]$.

Получение экстрактов и фракции культуры “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020. Для получения водных и водно-спиртовых экстрактов образец сырой биомассы цианобактерий (пленки в 30-суточной культуре) высушивали при температуре 37°C в сушильном шкафу (ШС-8001 СПУ) в течение 3 сут до постоянного веса. Абсолютно сухую биомассу измельчали в ступке до размера частиц 1–2 мм. Для получения водно-спиртового экстракта 10 мг измельченной биомассы заливали 1 мл раствора дистиллированной воды и этанола (50/50; 20/80; 80/20). Водный экстракт получали, смешивая сухую биомассу с дистиллированной водой в аналогичном соотношении. Спустя 1 ч экстракты тщательно отфильтровывали через мембранный фильтр.

Фракцию получали методом колоночной хроматографии, пропуская водно-спиртовой экстракт (50/50) цианобактерий “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 через колонку с силикагелем (КСМГ, фракция 0.125–0.20 мм) высотой 14 см. Колонку предварительно заливали элюентной водно-спиртовой системой 20/80. Через 90 мин получили одну фракцию лимонного цвета. Высушенную фракцию массой 5 мг разводили 5 мл стерильной дистиллированной воды и использовали для опытов.

Для выделения экзогенных метаболитов (НОС) “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 методом газовой хромато-масс-спектрометрии получали гексановые экстракты. Для этого 250 мл культуры (3 г сырой биомассы/100 мл среды) отфильтровывали через нейлоновый фильтр (диаметр пор 200 мкм) для освобождения от пленок и экстрагировали 5 мл гексана (Батаева и соавт., 2014). Жидкость помещали в делительную воронку, добавляли гексан и взбалтывали в течение 3 мин. Затем отстаивали, жидкость утилизировали, а гексан помещали во флаконы из темного стекла и сохраняли в морозильной камере при –18°C до проведения хромато-масс-спектрометрического исследования.

Определение фитотоксичности. Фитотоксичность изучали на семенах кресс-салата (*Lepidium sativum*) сорта Дукал согласно ГОСТ 12038-84. Для эксперимента семена помещали во влажные камеры — стерильные чашки Петри с фильтровальной бумагой, предварительно простерилизовав их 70% этанолом в течение 3–5 мин. В каждую камеру помещали 50 семян, которые увлажняли суспензией с 10 мл стерильной дистиллированной воды и 0.3 г сырой биомассы цианобактерий. Семена, обработанные суспензией и дистиллированной водой (контроль) в трех повторностях, проращивали в течение 3 сут при дневном освещении и температуре 25°C. Наличие ростстимулирующего, ингибирующего или нейтрального эффекта определяли, сравнивая всхожесть семян, длину корня и побега растений в контрольном и опытном вариантах (ГОСТ 12038-84).

Определение фунгицидной активности. Фунгицидную активность определяли методом диффузии в агар (МУК 4.2.1890-04). В качестве тест-объектов использовали грибы рода *Fusarium* (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*), которые являются фитопатогенными и способствуют появлению корневых гнилей у растений, что снижает рост и урожайность растений и ведет к их гибели. Грибы предоставлены лабораторией технологии микробных препаратов ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии.

В опыте использовали сырую биомассу (пленки в 30-суточной культуре), водно-спиртовой экстракт (50/50) и фракцию водно-спиртового экстракта (50/50) культуры “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020. В водную суспензию с макро- и микроконидиями

микромицетов с титром $0.3\text{--}0.7 \times 10^7$ спор/мл добавляли питательную среду (бобовый агар в соотношении 1 : 10) и разливали по чашкам. В застывшем агаре каждой чашки делали лунки диаметром 5 мм, которые заполняли исследуемым материалом. В центральной лунке помещали контроль в количестве 100 мкл. В экспериментах с биомассой цианобактерий контролем служила дистиллированная вода; при исследовании водно-спиртовых экстрактов и фракции контролем был водно-спиртовой раствор (50 : 50).

На 3 сут проводили измерение диаметра зоны ингибирования (ДЗИ) роста культур, отмечая фунгистатическую активность в последующие 2 сут по зарастанию зоны подавления, и выявляли фунгицидное действие по отсутствию роста тест-культур. Пролонгированное действие препаратов оценивали по зоне фунгицидного подавления роста тест-культур в последующие 3–4 недели. Морфологические изменения, происходящие с фитопатогенными грибами под воздействием цианобактерий, изучали с помощью микроскопа Микмед 5 с визуализатором VidCap.

Определение антиоксидантной активности. В экспериментах по определению антиоксидантной активности использовали суспензию клеток “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 (3 г сырой биомассы/100 мл питательной среды), водный и водно-спиртовой экстракты (50/50). Применяли метод колориметрии свободных радикалов, основанный на реакции DPPH (ДФПГ, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, $M = 394.33$), растворенного в метаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме $\text{DPPH}^* + \text{АН} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^*$ (Molyneux, 2004). В результате восстановления ДФПГ антиоксидантом снижается интенсивность пурпурно-синей окраски ДФПГ в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 517 нм методом спектрофотометрии. К 1480 мкл этилового спирта 96% добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 20 мкл исследуемого образца. Так как с такой концентрацией образцов активность была недостаточно высокой, увеличили соотношение образца к оксиданту, уменьшая при этом объем растворителя – спирта. К 1400 мкл этилового спирта 96% добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 100 мкл исследуемого образца. В качестве контроля антиоксидантной активности выбрали аскорбиновую кислоту (Астафьева и соавт., 2021). К 1480 мкл этилового спирта 96% добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 20 мкл раствора аскорбиновой кислоты (1 мг/мл). Аналогично делали раствор со 100 мкл кислоты. Смесь энергично встряхивали и оставляли на 60 мин. Исследования проводили в трех повторностях. Антиоксидантную активность рассчитывали по формуле: $\text{АОА} = (\text{D}_\text{к} - \text{D}_\text{оп} / \text{D}_\text{к}) \times 100\%$, где $\text{D}_\text{к}$, $\text{D}_\text{оп}$ – оптическая плотность (среднее значение) в контрольном и опытном образцах соответственно (Хасанов и соавт., 2004).

Определение синтезируемых органических кислот “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение органических кислот проводили в водно-спиртовых экстрактах (80/20, 20/80) культуры “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 с использованием анионообменных колонок и супрессионной системы с кондуктометрическим детектированием. Для определения органических кислот использовали жидкостной хроматограф Waters Alliance 2695 с диодно-матричным детектором Waters 2996 при длине волны 220 нм. Концентрацию обнаруженных кислот рассчитывали автоматически, сравнивая со стандартами.

Определение компонентного состава метаболитов штамма IPPAS B-2020 методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС). Качественный и количественный состав НОС гексановых экстрактов определяли на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMSQP2010 Ultra. Использовали неполярную колонку MTX-1; $30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \times 0.25 \text{ мкм}$. В качестве газа-носителя служил гелий. Масс-спектры снимали в режиме сканирования по полному диапазону масс ($30\text{--}1090 \text{ m/z}$) в программном режиме температур ($35^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 2°C/мин до $60^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 2°C/мин до $80^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 4°C/мин до $120^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 5°C/мин до $150^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 15°C/мин до $240^\circ\text{C} - 10 \text{ мин}$) с последующей пошаговой обработкой хроматограмм.

Идентификацию выявленных НОС проводили с использованием библиотек масс-спектров NIST-2014 и Wiley (Wiley et al., 2011). Количественный анализ выполняли с использованием бензофенона в качестве внутреннего стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическое описание штамма IPPAS B-2020. Трихомы штамма IPPAS B-2020 сине-зеленые, изополярные, прямые, перешнурованные у поперечных перегородок, одиночные, свободно плавающие или образующие небольшие сгустки, погруженные в экзополисахаридный матрикс (рис. 1а). На твердой среде штамм не образует колонии, а обрастает всю поверхность агара. Клетки коротко-бочонкообразные, шириной $5.0\text{--}6.5 \text{ мкм}$, длиной $3.0\text{--}6.0 \text{ мкм}$ (рис. 1а–1г), в некоторых клетках заметны газовые вакуоли (рис. 1г). Трихомы слегка суженные к концу, апикальные клетки закругленные конические (рис. 1б, 1в). Гетероцисты преимущественно интеркалярные, редко апикальные, шаровидные, $5\text{--}7 \text{ мкм}$ в диаметре (рис. 1а–1в). Акинеты не обнаружены. Размножение происходит путем разрывов трихомов. Важно также отметить, что, хотя штамм выделен из почвы, присутствие газовых вакуолей свидетельствует

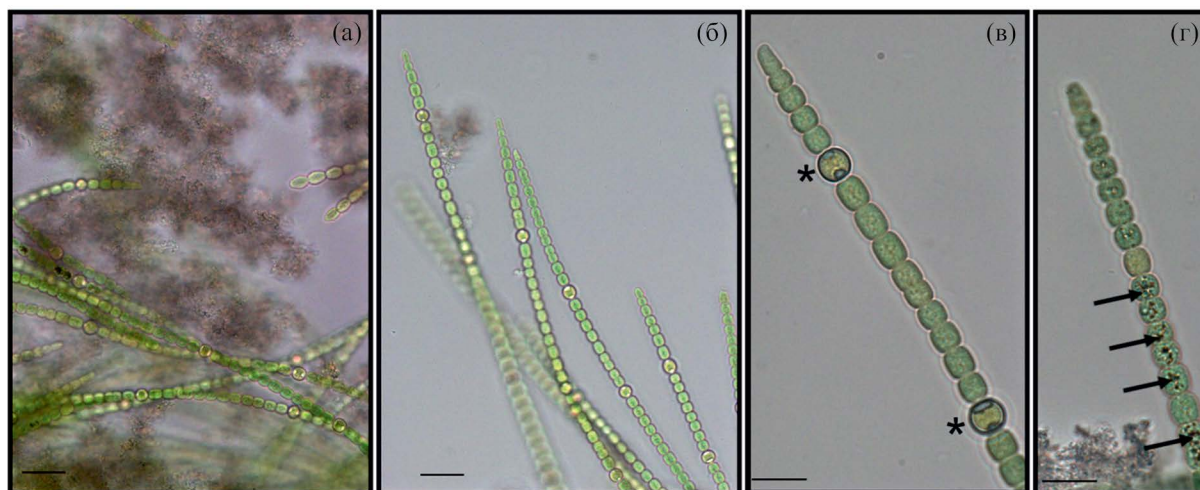


Рис. 1. Трихомы “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 в световом микроскопе: а — общий вид трихомов, окруженных окрашенным экзополисахаридным матрикосом; б, в — трихомы с интеркалярными гетероцистами и закругленными конечными клетками; трихом с клетками, содержащими газовые вакуоли, и развивающейся гетероцистой; зрелые гетероцисты отмечены звездочками; г — стрелки указывают на газовые вакуоли. Масштабная линейка: а, б — 10 мкм; в, г — 20 мкм.

о его планктонном происхождении. Территория отбора проб в весенний период подвергалась затоплению паводковыми водами, поэтому в почве могли остаться планктонные виды. По комплексу фенотипических признаков выделенный штамм был определен как *Sphaerospermum aphanizomenoides* (Komárek, 2013). Однако ключевым признаком семейства *Nostocaceae* Komárek (2013) считает морфологическое строение и положение акинет, а у изучаемого штамма они отсутствовали. Поэтому однозначное определение штамма по этому ключу не было возможным.

Филогенетический анализ с использованием нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, показал, что штамм IPPAS образует кластер с высокой бутстреп-поддержкой со штаммами BCCUSP55 и PMC 306.07, идентифицированными как *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Lorenzi et al., 2022) и *Anabaena sphaerica* (Duval et al., 2018) соответственно (кластер IB на рис. 2).

Штамм *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* BCCUSP55 был изолирован из водохранилища Жуказиньо (Jucazinho) в семиаридном регионе Бразилии (Lorenzi et al., 2022). Морфологическое описание этого штамма или его изображение найти не удалось. Штамм *Anabaena sphaerica* PMC 306.07 был изолирован из пруда в деревне Дужани (Ducjani) на острове Майотта; по морфологии он сходен с изучаемым штаммом IPPAS B-2020, за исключением того, что у штамма PMC 306.07 наблюдали развитие 1–2 округлых или овальных акинет по обе стороны от гетероцист (Duval et al., 2018). Сходство между последовательностями 16S рРНК в этом кластере

составляет 99.6–100%, следовательно, эти штаммы определенно принадлежат к одному роду и, возможно, также к одному виду. Кластер IB не кластеризуется ни с одним из валидно описанных родов, однако он принадлежит большой кладе, обозначенной на рис. 2 как клада I. В эту кладу входят представители сем. *Aphanizomenonaceae* пор. *Nostocales*, принадлежащие родам *Sphaerospermopsis* Zapomelová et al., *Amphiheterocytum* Sant'Anna et al., *Raphidiopsis* F.E.Fritsch and M.F.Rich (включая *Cylindrospermopsis* G.Seenayya and N.Subba Raju) (Aguilera et al., 2018), *Wolleea* Bornet and Flahault, *Neowolleea* Tawong, а также штаммы, идентифицированные как *Anabaena* Bory ex Bornet and Flahault и два симбиотических штамма, ошибочно обозначенных как “*Nostoc*”. Учитывая, что штаммы, которые, согласно исследованиям Kozlíková-Zapomelová et al. (2016), относятся к типовому виду рода *Anabaena* — *A. oscillarioides* Bory ex Bornet and Flahault, находятся в далеко отстоящей кладе (рис.2), ни один из представителей клады I не принадлежит к роду *Anabaena sensu stricto*. Штаммы клады I, идентифицированные как различные виды рода *Anabaena*, принадлежат либо к одному из вышеперечисленных родов клады I, либо к новым, еще не описанным родам.

Представители родов *Sphaerospermopsis*, *Amphiheterocytum*, *Raphidiopsis* и *Neowolleea* и некоторые штаммы, идентифицированные как *Wolleea*, образуют внутри клады I кластер IA с относительно высокой бутстреп-поддержкой (67), что совпадает с данными предыдущих работ (Tawong et al., 2019; Wang et al., 2023). Важно отметить, что часть штаммов, идентифицированных как *Sphaerospermopsis*,

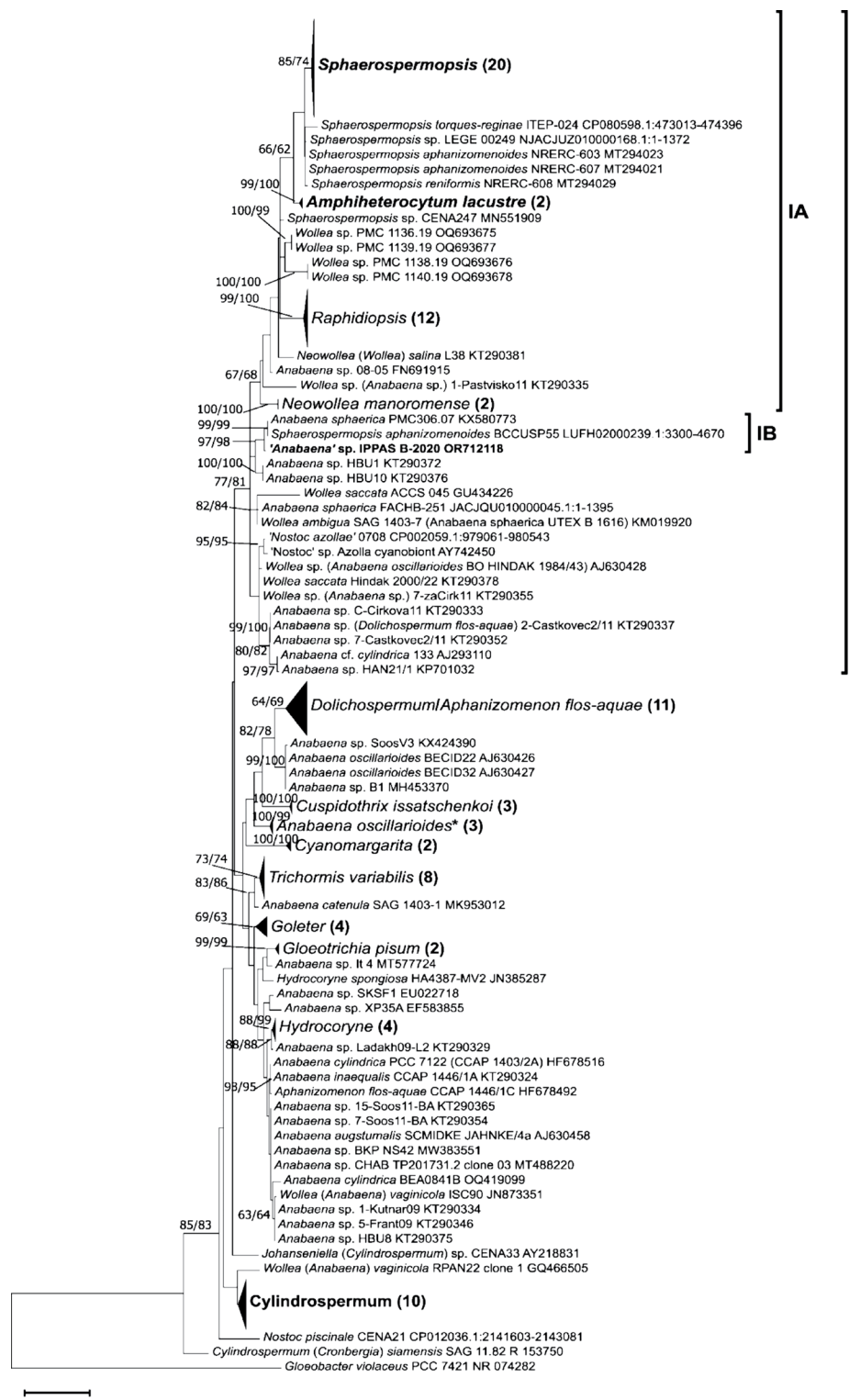


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (1036 п.н.) представителей сем. *Aphaniizomenonaceae*, пор. *Nostocales*. Дерево построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с указанием значений поддержки бутстрепа при данном анализе и при анализе методом присоединения соседей (Neighbor Joining, NJ) как ML/NJ. Показаны только значения >60%. Последовательность исследуемого штамма выделена жирным шрифтом. Последовательности, принадлежащие одному роду, объединены в кластеры, обозначенные названием соответствующего рода, в скобках указано количество последовательностей в таком кластере. Звездочкой отмечен кластер, образованный штаммами, которые относятся к типовому виду рода *Anabaena*, *A. oscillarioides* Bory de Saint-Vincent et Flahault, согласно Kozlíková-Zapomělová et al. (2016).

Таблица 1. Фенологические показатели кресс-салата после обработки культурой “*Anabaena*” sp.

Вариант эксперимента	Всхожесть семян, %	Длина корня, мм (ср.)	Длина побега, мм (ср.)
Контроль	85.7 ± 1.2	25.7 ± 1.4	13.4 ± 0.6
“ <i>Anabaena</i> ” sp.	98.7 ± 1.2	34.6 ± 0.4	17.1 ± 0.2

на нашем филогенетическом дереве оказались за пределами основной клады *Sphaerospermopsis* и, видимо, нуждаются в таксономической ревизии. Штаммы рода *Neowollea* не образовали единого кластера с высокой бутстреп-поддержкой на нашем дереве. Штаммы клады I, определенные как *Wollea*, далеко отстоят от других штаммов рода *Wollea*, отнесенных к этому роду согласно Kozlíková-Zapomělová et al. (2016) и образующих еще две независимые клады на нашем филогенетическом дереве (рис. 2). Таким образом, род *Wollea* в современном понимании является полифилетическим, нуждается в пересмотре и, прежде всего, в определении штаммов, действительно относящихся к типовому виду рода *W. saccata*.

Кластер IB с изучаемым штаммом IPPAS B-2020 находится за пределами кластера IA и не объединяется с ним, и, таким образом, не может принадлежать ни к одному из родов кластера IA, включая *Sphaerospermopsis* и *Neowollea*, с которыми представители кластера IB имеют определенное морфологическое сходство. Генетическое сходство между кластером IB и родами кластера IA составляет <98% (95.8–97.9%), что у представителей порядка *Nostocales* соответствует разным родам (Kaštovský et al., 2014).

Хотя клада IB не образует кластера с высокой бутстреп-поддержкой ни с какими другими штаммами клады I, она имеет довольно высокое (>98%) сходство со штаммами *Anabaena* sp. HBU1, *Anabaena* sp. HBU10, *Anabaena sphaerica* FACHB-251 и *Wollea ambigua* SAG 1403-7, а также пограничные значения сходства 97.9–98.1% со штаммами *Wollea saccata* Hindak 2000/22 и *Wollea* sp. 7-zaCirk11. Учитывая это высокое сходство, нельзя исключать отнесение клады IB к роду *Wollea*, но для решения этого вопроса необходимо прежде всего определить границы этого рода. Против такого объединения говорит тот факт, что штаммы клады IB не образуют макроколонию, но важность этого признака как морфологического маркера уже вызвала сомнения (Kozlíková-Zapomělová et al., 2016).

Таким образом, изучаемый штамм в настоящее время не может быть отнесен ни к одному из валидно описанных родов. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы прояснить, являются ли штаммы кластера IB, включая изучаемый штамм IPPAS B-2020, представителями нового рода или все-таки принадлежат к одному из описанных родов, например, роду *Wollea*. До прояснения этого вопроса

мы решили обозначить штамм IPPAS B-2020 как “*Anabaena*” sp. *sensu lato*.

Фитотоксичность. В результате обработки полученных данных, культура “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 оказалась нетоксичной для семян кресс-салата. Обработка семян клетками цианобактерий повышала всхожесть на 13%, длину корневой части проростка – на 34%, длину побега – на 27% (табл. 1).

Значения не оказались статистически значимыми, но выявлена тенденция к увеличению показателей при бактерилизации цианобактериями. “*Anabaena*” sp. относится к азотфиксирующим гетероцистным формам цианобактерий, играющих большую экологическую роль в почвах и оказывающих активное влияние на растения (Панкратова и соавт., 2008). Также известно, что рост-стимулирующий эффект цианобактерий связан с наличием в них ауксино- и гиббериллиноподобных веществ (Цавкелова, 2021).

Фунгицидная активность. При исследовании фунгицидной активности на 3–5 сут наблюдали полное визуальное подавление роста фитопатогенного гриба *F. culmorum* биомассой и водно-спиртовым экстрактом штамма IPPAS B-2020 (рис. 3). Также полное ингибирование произошло при воздействии “*Anabaena*” sp. на рост *F. sporotrichioides* в вариантах опыта с сырой биомассой и водно-спиртовым экстрактом “*Anabaena*” sp. (табл. 2).

Одновременно наблюдали визуальное подавление роста фитопатогенного гриба *F. poae* водно-спиртовым экстрактом и фракцией водно-спиртового экстракта IPPAS B-2020. Микроскопирование показало, что в условиях непосредственного взаимодействия с экстрактом и фракцией формирование мицелия тест-грибов значительно замедлялось по сравнению с контролем.

На рост гриба *F. graminearum* оказал наибольший ингибирующий эффект водно-спиртовой экстракт с полной задержкой роста 2.1 см. Фракция “*Anabaena*” sp. не оказала подавляющего действия на *F. graminearum*. Аналогичное антифузариозное действие гетероцистных цианобактерий наблюдали в ризосфере и почве (Домрачева и соавт., 2009).

В результате установлено, что водно-спиртовой экстракт штамма цианобактерий IPPAS B-2020 ингибировал рост всех исследуемых фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium*. Водно-спиртовой экстракт и биомасса IPPAS B-2020 оказали полное подавление грибов *F. culmorum*, *F. graminearum*,

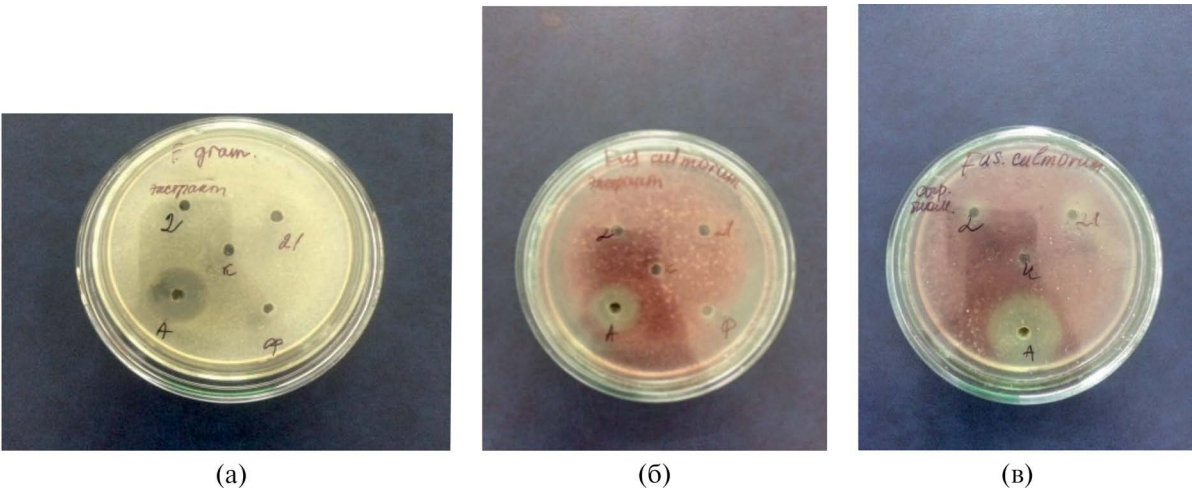


Рис. 3. Влияние цианобактерии “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 на рост микромицетов: а – *F. graminearum* – с водно-спиртовым экстрактом; б – *F. culmorum* – с водно-спиртовым экстрактом; в – *F. culmorum* – с сырой биомассой. Подписи на чашках: А – “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020; Ф – фракция; 2 и 21 – номера культур цианобактерий, взятые для сравнения.

Таблица 2. Фунгицидная активность “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 по отношению к микромицетам рода *Fusarium*

Объект исследования	Диаметр зоны ингибирования, см			
	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. sporotrichioides</i>
Сырая биомасса	2.4 ± 0.25	0	1.9 ± 3.11*	2.1 ± 2.10
Водно-спиртовой экстракт, 50/50	2.3 ± 1.00	1.6 ± 1.19*	2.1 ± 1.47	2.5 ± 2.96
Фракция водно-спиртового экстракта	0	1.8 ± 2.50*	0	0

*Зона неполного ингибирования роста гриба.

F. sporotrichioides. Фракция водно-спиртового экстракта цианобактерий “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 оказала фунгистатическое действие только на *F. poae*. Таким образом, наибольшую фунгицидную активность “*Anabaena*” sp. проявила по отношению к *F. sporotrichioides* и *F. culmorum*.

Исследование антиоксидантной активности “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020. Выраженной антиоксидантной активностью обладал водный экстракт цианобактерий “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 в объеме 20 мкл – 39.3% и 100 мкл – 28.7% (табл. 3).

В объеме 100 мкл высокой активностью обладал также водно-спиртовой экстракт – 27.7%. В остальных вариантах антиоксидантная активность была ниже контрольной на 6.3–17.2%. В литературе часто встречается информация о цианобактериях – продуцентах фенольных соединений с антиоксидантными свойствами (Ferrari et al., 2015). *Arthrospira platensis*, *Nostoc muscorum*, *Phormidium foveolarum* продуцировали такие антиоксиданты, как пролин,

аскорбат, цистеин и небелковые тиолы (Kumar et al., 2016). Поэтому мы исследовали состав органических кислот и НОС культуры IPPAS B-2020.

Исследование состава органических кислот цианобактерий. Исследование водно-спиртовых

Таблица 3. Антиоксидантная активность “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020

Вариант опыта	Антиоксидантная активность, %	
	20 мкл	100 мкл
Контроль – аскорбиновая кислота	12.5 ± 0.02	25.0 ± 0.11
Суспензия	6.2 ± 0.01	7.8 ± 0.09
Водный экстракт	39.3 ± 0.94	28.7 ± 0.06
Водно-спиртовой экстракт, 50/50	3.2 ± 0.02	27.7 ± 0.01

экстрактов (80/20, 20/80) культуры “*Anabaena*” sp. IPPAS В-2020 методом ВЭЖХ показало наличие органических кислот – изолимонной, молочной, уксусной.

В водно-спиртовом экстракте (80/20) “*Anabaena*” sp. обнаружена изолимонная кислота в количестве 0.439 г/л. В экстракте 20/80 обнаружены молочная (0.207 г/л) и уксусная кислоты (0.270 г/л). Молочная и уксусная кислоты являются активными противомикробными и антиоксидантными агентами (Goldwhite, 2003; Lamb et al., 2006).

Исследование экзогенных метаболитов “*Anabaena*” sp. IPPAS В-2020. Вторичные метаболиты

изучены у представителей порядков *Oscillatoriales* (49%), *Nostocales* (26%), *Chroococcales* (16%), *Pleurocapsales* (6%) и *Stigonematales* (4%) (Gerwick et al., 2008). Это различные соединения с цитотоксическими (41% от общего количества найденных веществ), противоопухолевыми (13%), противовирусными (4%), противомикробными (12%), а также противогрибковыми, гербицидными, антиоксидантными, фитостимулирующими свойствами (Burja et al., 2001; Gerwick et al., 2008; Verma et al., 2022).

В составе вторичных метаболитов штамма IPPAS В-2020 обнаружили 61 НОС, из которых

Таблица 4. Состав экзогенных метаболитов “*Anabaena*” sp. IPPAS В-2020

Вещество	Формула	RT	RI	C	%
Гексан-2-он	$C_6H_{12}O$	3.21	799	0.031	0.51
Октан	C_8H_{18}	3.33	800	0.142	2.34
Гексан-2-ол	$C_6H_{14}O$	3.41	812	0.018	0.29
Этилциклогексан	C_8H_{16}	3.94	831	0.005	0.09
1,2-ксилен	C_8H_{10}	4.90	867	0.032	0.52
1,3-ксилен	C_8H_{10}	5.61	893	0.176	2.89
Нонан	C_9H_{20}	6.01	900	0.021	0.34
2,6,6-триметилбицикло-(3,1,1)гепт-2-ен (α -пинен)	$C_{10}H_{16}$	7.13	929	0.081	1.33
1-этил-3-метилбензен	C_9H_{12}	8.40	956	0.034	0.57
2,6-диметилгептан-4-он	$C_9H_{18}O$	9.06	970	0.025	0.40
1-этил-2-метилбензен	C_9H_{12}	9.89	988	0.042	0.70
Анилин	C_6H_7N	10.12	993	0.043	0.71
2-метилоктан-4-ол	$C_9H_{20}O$	10.45	999	0.142	2.33
Декан	$C_{10}H_{22}$	10.60	1000	0.057	0.94
1-метил-4-пропан-2-илбензен	$C_{10}H_{14}$	11.64	1020	0.071	1.18
(4R)-1-метил-4-проп-1-ен-2-илциклогексен	$C_{10}H_{16}$	11.84	1023	0.682	11.23
Бензойная кислота	$C_7H_6O_2$	23.22	1182	0.194	3.19
Додекан	$C_{12}H_{26}$	24.78	1200	0.104	1.71
2,6,8-триметилдекан	$C_{13}H_{28}$	32.58	1302	0.017	0.29
Додец-1-ен	$C_{12}H_{24}$	37.85	1395	0.026	0.43
Тетрадекан	$C_{14}H_{30}$	38.23	1400	0.177	2.92
Октилциклогексан	$C_{14}H_{28}$	39.82	1442	0.033	0.55
3-метилтетрадекан	$C_{15}H_{32}$	39.96	1445	0.039	0.64
Пентадекан	$C_{15}H_{32}$	42.19	1500	0.022	0.36
(2S,3S,4R,5S)-2-[(1R)-1,2-диметоксиэтил]-3,4,5-триметоксиоксолан	$C_{11}H_{22}O_6$	42.49	1508	0.016	0.26
N',P-ди-изопропил-N-T-бутилфосфоник диамид	$C_{10}H_{25}N_2OP$	42.49	1508	0.015	0.25
2,6,11,15-тетраметилгексадекан	$C_{20}H_{42}$	45.33	1573	0.009	0.15
2-метилгексадекан-1-ол	$C_{17}H_{36}O$	46.29	1595	0.050	0.81
Гексадекан	$C_{16}H_{34}$	46.57	1600	0.068	1.12
3,3-Диэтилтридекан	$C_{17}H_{36}$	48.17	1651	0.031	0.50
Трибутилфосфат	$C_{12}H_{27}O_4P$	48.50	1661	0.018	0.29
Гептадекан	$C_{17}H_{36}$	49.83	1700	0.043	0.70
Октадекан	$C_{18}H_{38}$	52.93	1800	0.085	1.39
Нонадекан	$C_{19}H_{40}$	55.39	1900	0.071	1.17

Окончание таблицы 4

Вещество	Формула	RT	RI	C	%
7,9-Ди-трет-бутил-1-оксаспиро[4.5]дека-6,9-диен-2,8-дион	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	55.59	1919	0.026	0.43
2-метилнонадекан	C ₂₀ H ₄₂	56.33	1977	0.064	1.06
Эйкозан	C ₂₀ H ₄₂	56.65	2000	0.085	1.40
2-метилэйкозан	C ₂₁ H ₄₄	56.68	2007	0.252	4.15
2-О-(циклогексилметил) 1-О-гептил оксалат	C ₁₆ H ₂₈ O ₄	56.74	2013	0.041	0.68
2,4-диметилэйкозан	C ₂₂ H ₄₆	57.21	2064	0.083	1.36
2-О-(циклогексилметил) 1-О-октил оксалат	C ₁₇ H ₃₀ O ₄	57.69	2118	0.123	2.02
8-метилэйкозан	C ₂₁ H ₄₄	57.83	2136	0.162	2.66
3-Метилгенейкозан	C ₂₂ H ₄₆	58.03	2162	0.081	1.33
Пентадецилциклогексан	C ₂₁ H ₄₂	58.15	2178	0.299	4.93
(Е)-3-Метилгеникос-2-ен	C ₂₂ H ₄₄	58.26	2192	0.076	1.24
2-Метилгенейкозан	C ₂₂ H ₄₆	58.39	2210	0.174	2.86
Генейкозан-1-ол	C ₂₁ H ₄₄ O	58.84	2277	0.266	4.38
Тетракозан	C ₂₄ H ₅₀	59.76	2400	0.234	3.86
Докозан-1-ол	C ₂₂ H ₄₆ O	59.93	2446	0.152	2.50
(6Е,10Е,14Е,18Е)-2,6,10,14,18-пентаметилэйкоза-2,6,10,14,18-пентаен	C ₂₅ H ₄₂	61.34	2615	0.094	1.55
(6Е,10Е,14Е,18Е)-2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен (сквален)	C ₃₀ H ₅₀	64.2	2831	0.185	3.05
Всего				6.076	100.0

Примечание. RT – время удерживания, мин; RI – индекс удерживания; % – доля соединения среди всех НОС; C – концентрация соединения в экстракте, мг/л.

10 не идентифицированы. В табл. 4 приведены только идентифицированные соединения.

В наибольшей концентрации присутствует (4R)-1-метил-4-проп-1-ен-2-илциклогексен (D-лимонен) (11.23%). D-лимонен – терпеновый углеводород, обладающий антибактериальной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, а также имеющий синергический эффект в сочетании с гентамицином (Costa et al., 2018). Лимонен и гептеналь, являющиеся компонентами экстрактов можжевельника и шалфея, проявляли противомикробную активность относительно бактерий родов *Staphylococcus*, *Escherichia* и дрожжей рода *Candida* (Голованов, 2011). Обнаруженный 2,6,6-триметилбицикло(3,1,1)гепт-2-ен (α-пинен) является терпеном, обладающим активностью против метициллинрезистентного золотистого стафилококка. Также α-пинен проявляет противовоспалительную, антиоксидантную активности и обладает противогрибковым потенциалом (Allenspach, Steuer, 2021). (6Е,10Е,14Е,18Е)-2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен (сквален) – углеводород терпенового ряда, принадлежащий к группе каротиноидов, обладает антиоксидантными свойствами (Pora et al., 2014).

Кластеры генов продукции терпеновых соединений обнаружены в геноме штамма *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* BCCUSP55 (Lorenzi et al., 2022). Терпеновые соединения широко распространены в природе и имеют важное значение для сохранения экологического баланса в межвидовых взаимоотношениях бактерий, цианобактерий, микроводорослей и их симбионтов, простейших и растений, а также между различными трофическими уровнями (Гольдин, 2011). Эти метаболиты проявляют широкий спектр биологических свойств и участвуют практически во всех функциональных проявлениях действия низкомолекулярных органических веществ в экосистемах (Курашов, 2012; Kurashov et al., 2016).

В экстракте обнаружили достаточное количество алканов, таких как октан (2.34%), декан (0.94%), тетракозан (3.86%), додекан (1.71%), тетрадекан (2.92%) и других. Тетрадекан и додекан являются как природными, так и антропогенными соединениями, которые используют в качестве растворителей и синтетических промежуточных продуктов в промышленности. Считается, что появление алканов в природных экосистемах обусловлено антропогенными факторами. Однако несомненно, что и растения, водоросли и цианобактерии

в природных условиях их синтезируют (Хуан, 2006). Так, присутствие в большой концентрации (23.78%) октакозана связано с массовым развитием цианобактерий *Gloeocapsa* sp. в присутствии диатомовых водорослей рода *Navicula* и зеленых водорослей родов *Chlorella* и *Scenedesmus* (Батаева и соавт., 2014). Высокое содержание алканов выявили в культуральной среде монокультуры цианобактерий *Oscillatoria neglecta* (до 11.14%) (Кирпенко, 2010). В смешанных культурах *Oscillatoria neglecta* и *Anabaena variabilis* количество алканов снижалось. Гептадекан и гексакозан обнаружены в качестве основных алканов в культурах зеленых водорослей *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus acutus*, *S. acuminatus*, *S. obliquus* и цианобактерий вида *Spirulina platensis* (Sivonen, Jones, 1999). Показано, что почвенная цианобактерия *Microcoleus vaginatus* из пустыни Негев, продуцировала 4 нормальных и более 60 разветвленных алканов, состав которых необычен, а также ряд жирных кислот, циклических и ненасыщенных углеводородов, альдегидов, спиртов и кетонов (Дембицкий, 2001). Преобладающими соединениями были гептадекан (12%), 7-метилгептадекан (7.8%), гексадекановая кислота (6.5%) и др. Эфирное масло *Anthemis altissima*, в составе которого находился трикозан, проявляло антимикробную активность по отношению к видам бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Samadi, 2012).

В составе экзогенных метаболитов "*Anabaena*" sp. IPPAS B-2020 в концентрации 0.194 мг/л (3.19%) обнаружена бензойная кислота, которая обладает противомикробными и фунгицидными свойствами (Apostol et al., 2021), поэтому используется в пищевой промышленности как консервант и в медицине как наружный антисептик. Она участвует в аллелопатических взаимодействиях многих наземных и водных растений (Macías, 2008). Значительное количество бензойной кислоты находится в плодах, в том числе в ягодах — клюкве и бруснике (Лютикова, 2013).

Вызывает интерес вещество трибутилфосфат, обнаруженное, хоть и в небольшой концентрации, в составе экзометаболитов "*Anabaena*" sp., но, по всей вероятности, играющее регуляторную роль в функционировании экосистем. Известно, что трибутилфосфат используют при производстве фармакологических препаратов из плазмы крови человека, поскольку он разрушает липидную оболочку вируса, препятствуя сцеплению его с клеткой-мишенью и лишая инфектогенности (Кудашева и соавт., 2015). Наши исследования показали, что это вещество обнаруживается в составе низкомолекулярного метаболома высших водных растений горца земноводного (*Persicaria amphibia* (L.) Delarbre) (Крылова и соавт., 2020) и рдеста

пронзеннолистного (*Potamogeton perfoliatus* L.), причем произрастающих в местах со слабым антропогенным влиянием, в то время как в местах с высокой нагрузкой это вещество в составе метаболитов таких растений не выявлено. Это наталкивает на мысль, что фотосинтезирующие организмы, в том числе и цианобактерии "*Anabaena*" sp. IPPAS B-2020, синтезируют его в качестве экзогенного метаболита, выполняющего функцию разрушения липидных оболочек конкурирующих видов цианобактерий или других бактерий.

Ранее нами был получен патент на изобретение, описывающий способ стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности и защиты от фитопатогенных грибов в аридной зоне с участием культуры IPPAS B-2020 (патент № 2634387). В изобретении подтверждены рост-стимулирующие свойства "*Anabaena*" sp. в отношении ряда сельскохозяйственных культур (кресс-салата, перца болгарского, томата) и фунгицидная активность против фитопатогенных грибов. Аналогичный патент получен исследователями на штамм *Nostoc linckia* IPPAS B-2044, обладающий свойствами стимуляции роста в отношении бобовых, масличных и овощных культур, а также гербицидной активностью (патент № 2734987).

Таким образом, результаты экспериментов показали, что штамм "*Anabaena*" sp. IPPAS B-2020 оказался не фитотоксичным, обладал высокой фунгицидной и антиоксидантной активностями. В составе его вторичных экзогенных метаболитов присутствовали изолимонная, молочная, уксусная кислоты, терпены, алканы, спирты и другие НОС. Обнаруженные соединения, такие как трибутилфосфат, D-лимонен, сквален, α -пинен, известны своей высокой противомикробной активностью.

Штамм IPPAS B-2020 в настоящее время не может быть отнесен ни к одному из валидно описанных родов, и для дальнейшей его идентификации необходимо проводить дополнительные исследования. Изучаемый штамм перспективен не только в качестве оздоравливающего средства с фунгицидной, антиоксидантной, фитостимулирующей активностями в агроэкосистемах, но и как источник метаболитов с ценными свойствами, и может служить основой для разработки полифункциональных биопрепаратов для растениеводства.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора. Молекулярно-генетическая идентификация штамма выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700045-3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреюк Е.И., Контева Ж.Л., Занина В.В. Цианобактерии. Киев: Наукова думка, 1990. 159 с.
- Астафьева О.В., Жаркова З.В., Генатулина Г.Н. Исследование фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов соцветий *Tagetespatulal* // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2021. Т. 15. № 4. С. 116–120.
- Батаева Ю.В. Особенности микробных комплексов аридной зоны в условиях агро- и техногенеза и их биотехнологическая значимость. Автореферат дис. ... докт. биол. наук, 24.03.2023. Оболенск: ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, 2022. 48 с.
- Батаева Ю.В., Григорян Л.Н., Яковлева Л.В., Магзанова Д.К., Баймухамбетова А.С., Андреева М.Д. Особенности развития томатов при инокуляции цианобактериальными сообществами // АгроЭкоИнфо. 2020. № 2 (40). С. 15.
- Батаева Ю.В., Григорян Л.Н. Оценка фитостимулирующих свойств цианобактерий *Anabaena constricta* IPPAS B-2020 в микроделяночном опыте // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмулы. 2022. № S2 (63). С. 139–142.
- Батаева Ю.В., Курашов Е.А., Крылова Ю.В. Хромато-масс-спектрометрическое исследование экзогенных метаболитов альго-бактериальных сообществ в накопительной культуре // Вода: Химия и экология. 2014. № 9 (75). С. 59–68.
- Батаева Ю.В., Магзанова Д.К., Григорян Л.Н. Возделывание хлопчатника с применением цианобактерий для биологизации агросистем // Экологические системы и приборы. 2022. № 11. С. 18–25. <https://doi.org/10.25791/esip.11.2022.1331>
- Бессолицына Е.А. Биология цианобактерий. Киров: ФГБОУ ВПО “ВятГУ”, 2012. 51 с.
- Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования. 2001. Т. 27. С. 130–140.
- Домрачева Л.И., Ковина А.Л., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я. Цианобактериальные симбиозы и возможность их практического использования (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 3. С. 21–30. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-3-021-030>
- Домрачева Л.И., Широких И.Г., Фокина А.И. Антифузариозное действие цианобактерий и актиномицетов в почве и ризосфере // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. С. 157–165.
- Кирпенко Н.И., Курашов Е.А., Крылова Ю.В. Экзогенные метаболитные комплексы двух синезеленых водорослей в моно- и смешанных культурах // Пресноводная гидробиология. 2010. № 2 (43). С. 241–244.
- Крылова Ю.В., Курашов Е.А., Русанов А.Г. Сравнительный анализ компонентного состава низкомолекулярного метаболома горца земноводного (*Persicaria amphibia* (L.) Delarbre) из разнотипных местообитаний в Ладожском озере // Труды Карельского научного центра РАН. 2020. № 4. С. 95–114. <https://doi.org/10.17076/lim1141>
- Кудашева Э.Ю., Борисевич И.В., Иванов В.Б., Климов В.И., Корнилова О.Г., Лебединская Е.В., Буянтян Н.Д. Современные технологические подходы к обеспечению вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов человека // Успехи современного естествознания. 2015. № 5. С. 132–138.
- Курашов Е.А., Крылова Ю.В., Митрукова Г.Г. Компонентный состав летучих низкомолекулярных органических веществ *Ceratophyllum demersum* L. во время плодоношения // Вода: Химия и экология. 2012. № 6. С. 107–116.
- Лютикова М.Н. Изучение состава биологически активных компонентов дикорастущих ягод *Vaccinium vitis-idaea*, *Oxycoccus palustris* в зависимости от степени их зрелости и условий хранения. Автореферат дис. ... канд. хим. наук, 25.06.13. Черноголовка: Институт физиологически активных веществ РАН, 2013. 25 с.
- МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2004. 94 с.
- Панкратова Е.М. Становление функциональных особенностей цианобактерий на путях их сопряженной эволюции с биосферой // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 3. С. 4–11.
- Панкратова Е.М., Трефилова Л.В., Зяблых Р.Ю., Устюжанин И.А. Цианобактерия *Nostoc paludosum* Kütz как основа для создания агрономически полезных микробных ассоциаций на примере бактерий рода *Rhizobium* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 2. С. 266–272.
- Pankratova E. M., Trefilova L. V., Zyablykh R. Yu., Ustyuzhanin I. A. Cyanobacterium *Nostoc paludosum* Kütz as a basis for creation of agriculturally useful microbial associations by the example of bacteria of the genus *Rhizobium* // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 228–234.

- Патент РФ. 2019. № 2734987. Средство для стимуляции роста бобовых, масличных и овощных культур и угнетения сорных растений в агроценозах.
- Патент РФ. 2017. № 2634387. Способ стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности и защиты от фитопатогенных грибов в аридной зоне.
- Пиневи́ч А. В., Авери́на С. Г. На краю радуги: длинноволновые хлорофиллы и фотосинтетическая адаптация цианобактерий к дальнему красному свету // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 666–684.
<https://doi.org/10.31857/S0026365622600444>
- Pinevich A. V., Averina S. G. On the edge of the rainbow: red-shifted chlorophylls and far-red light photoadaptation in cyanobacteria // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 631–648.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722602019>
- Темралеева А. Д., Кривина Е. С., Букин Ю. С. Современные подходы к изучению водорослей: ДНК-баркодинг и ДНК-таксономия // Вопросы современной альгологии. 2021. № 2 (26). С. 124–130.
[https://doi.org/10.33624/2311-0147-2021-2\(26\)-124-130](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2021-2(26)-124-130)
- Трефилова Л. В. Использование цианобактерий в агротехнологии. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 24.12.2008. Саратов: Ин-т биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, 2008. 26 с.
- Трефилова Л. В., Патрушева М. Н. Эффективность использования цианоризобияльного консорциума при выращивании гороха посевного // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 3. С. 67–75.
- Хасанов В. В., Рыжова Г. Л., Мальцева Е. В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63–75.
- Цавкелова Е. А. Структурно-функциональные особенности микробных сообществ эпифитных орхидей: биоразнообразие, роль и биотехнологическая значимость ассоциативных микроорганизмов. Автореферат дис. ... докт. биол. наук, 18.05.2021. М.: Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 2021. 46 с.
- Aguilera A., Berrendero Gómez E., Kaštovský J., Echenique R. O., Salerno G. L. The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria) // Phycologia. 2018. V. 57. P. 130–146.
<https://doi.org/10.2216/17-2.1>
- Allenspach M., Steuer C. α -Pinene: a never-ending story // Phytochemistry. 2021. V. 190. Art. 12857.
- Apostol T. V., Chifiriuc M. C., Draghici C., Socea L. I., Marutescu L. G., Olaru O. T., Nitulescu G. M., Pahontu E. M., Saramet G., Barbuceanu S. F. Synthesis, *in silico* and *in vitro* evaluation of antimicrobial and toxicity features of new 4-[(4-chlorophenyl)sulfonyl]benzoic acid derivatives // Molecules. 2021. V. 26. Art. 5107.
<https://doi.org/10.3390/molecules26165107>
- Bataeva Y. V., Dzerzhinskaya I. S., Yakovleva L. V. Composition of phototrophs in different soil types of Astrakhan oblast // Euras. Soil. Sci. 2017. V. 50. P. 943–951.
<https://doi.org/10.1134/s1064229317080026>
- Bataeva Yu. V., Satkalieva M. S., Antonova S. V., Sinetova M. A., Kozlova A. Yu., Astafyeva O. V., Baimuhambetova A. S. Study of antioxidant activity and composition of cyanobacteria metabolites by TLC, HPTLC, and HPLC for the search of environmentally safe cleaning agents // Rus. J. Gen. Chem. 2018. V. 88. P. 2898–2902.
<https://doi.org/10.1134/S107036321813011X>
- Burja A. M., Banaigs B., Abou-Mansour E., Burgess J. G., Wright P. C. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products // Tetrahedron. 2001. V. 57. P. 9347–9377.
- Costa M. D. S., Rocha J. E., Campina F. F., Silva A. R. P., Da Cruz R. P., Pereira R. L. S., Quintans-Junior L. J., Coutinho H. D. M. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of D-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin // Eur. J. Pharm. Sci. 2019. V. 128. P. 158–161.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.036>
- Dabravolski S. A., Isayenkov S. V. Metabolites facilitating adaptation of desert cyanobacteria to extremely arid environments // Plants. 2022. V. 11. Art. 3225.
<https://doi.org/10.3390/plants11233225>
- Duval C., Thomazeau S., Drelin Y., Yepremian C., Bouvy M., Couloux A., Troussellier M., Rousseau F., Bernard C. Phylogeny and salt-tolerance of freshwater *Nostocales* strains: contribution to their systematics and evolution // Harmful Algae. 2018. V. 73. P. 58–71.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.01.008>
- Eden P. A., Schmidt T. M., Blakemore R. P., Pace N. R. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1991. V. 41. P. 324–325.
<https://doi.org/10.1099/00207713-41-2-324>
- Fadl-Allah E. M., El-komy H. M., Al-Harbi N. A., Sholkamy E. N. *In vitro* creation of artificial nitrogen fixing cyanobacterium (*Nostoc muscorum*) association with wheat // African J. Microbiol. Res. 2011. V. 5. P. 302–310.
- Ferrari P. F., Palmieri D., Casazza A. A., Aliakbarian B., Perego P., Palombo D. TNF α -induced endothelial activation is counteracted by polyphenol extract from UV-stressed cyanobacterium *Arthrospira platensis* // Med. Chem. Res. 2015. V. 24. P. 275–282.
- Goldwhite H. Short summary of the career of the German organic chemist, Hermann Kolbe // New Haven Section Bull. Am. Chem. Soc. J. 2003. V. 20. P. 203–218.
- Hirsch A. M. Hormonal regulation in plant-microbe symbioses (symposium remarks) // Biology of Plant-Microbe Interactions. 2004. V. 4. P. 389–390.
- Iteman I., Rippka R., Marsac N. T., Herdman M. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria // Microbiology (Reading). 2000. V. 146. P. 1275–1286.
<https://doi.org/10.1099/00221287-146-6-1275>

- Gerwick W.H., Coates R.C., Engene N., Gerwick L., Grindberg R.V., Jones A.C., Sorrels C.M. Giant marine cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals // *Microbe*. 2008. V. 3. P. 277–284.
- Kajiya S., Kanzaki H., Kawazu K., Kobayashi A. Nostofungicide, an antifungal lipopeptide from the fieldgrown terrestrial bluegreen alga *Nostoc commune* // *Tetrahedron Lett.* 1998. V. 39. P. 3737–3740.
- Kaštovský J., Gomez E.B., Hladil J., Johansen J.R. *Cyanocohniella calida* gen. et sp. nov. (Cyanobacteria: Aphanizomenonaceae) a new cyanobacterium from the thermal springs from Karlovy Vary, Czech Republic // *Phytotaxa*. 2014. V. 181. P. 279–292. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.181.5.3>
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach // *Preslia*. 2014. V. 86. P. 295–335.
- Komárek J. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota 3. Teil/3rd part: Heterocytous Genera // Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2013. 1131 p.
- Kozlíková-Zapomělová E., Chatchawan T., Kaštovský J., Komárek J. Phylogenetic and taxonomic position of the genus *Wolleea* with the description of *Wolleea salina* sp. nov. (Cyanobacteria, Nostocales) // *Fottea*. 2016. V. 16. P. 43–55. <https://doi.org/10.5507/fot.2015.026>
- Kurashov E.A., Krylova J.V., Mitrukova G.G., Aleshina D.G., Bataeva Y.V., Astafyeva O.V. Low-molecular weight metabolites in *Spirodela polyrhiza* (L.) Scheiden from Northwest Russia in the middle of the growing season // *Ponte*. 2016. V. 72. P. 10–22. <https://doi.org/10.21506/j.ponte.2016.10.2>
- Kumar J., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. UVB induces biomass production and nonenzymatic antioxidant compounds in three cyanobacteria // *J. Appl. Phycol.* 2016. V. 28. P. 131–140.
- 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.
- Lacap-Bugler D.C., Lee K.K., Archer S., Gillman L.N., Lau M.C.Y., Leuzinger S., Lee C.K., Maki T., McKay C.P., Perrott J.K., de los Rios-Murillo A., Warren-Rhodes K.A., Hopkins D.W., Pointing S.B. Global diversity of desert hypolithic cyanobacteria // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 867. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00867>
- Lamb G.D., Stephenson D.G. Point: Counterpoint: Lactic acid accumulation is an advantage disadvantage during muscle activity // *J. Appl. Physiology*. 2006. V. 100. C. 1410–1412.
- Lorenzi A.S., Bonatelli M.L., Varani A.M., Quecine M.C., Bittencourt-Oliveira M.D.C. Draft genome sequence of the cyanobacterium *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* BCCUSP55 from the Brazilian semiarid region reveals potential for anti-cancer applications // *Arch. Microbiol.* 2022. V. 204. P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02602-1>
- Macias F.A., Galindo J.L.G., Garcia-Diaz M.D., Galindo J.C.G. Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models // *Phytochem. Rev.* 2008. V. 7. P. 155–178.
- Mironov K.S., Los D.A. RNA Isolation from *Synechocystis* // *Bio-protocol*. 2015. V. 5. Art. e1428. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1428>
- Molyneux P., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity // *J. Sci. Technol.* 2004. V. 26. P. 211–219.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3327–3332.
- Popa I., Băbeanu N., Niță S., Popa O. Squalene – natural resources and applications // *Farmacia*. 2014. V. 62. P. 840–862.
- Prasanna R., Jaiswal P., Shrikrishna J., Joshi M., Nain L., Rana A., Shivay Y.S. Evaluating the potential of rhizo-cyanobacteria as inoculants for rice and wheat // *J. Agricult. Technol.* 2012. V. 8. P. 157–171.
- Ramamurthy V.D., Raveendran S., Thirumeni S., Krishnaveni S. Antimicrobial activity of heterocytic Cyanobacteria // *Int. J. Adv. Life Sci.* 2012. V. 1. P. 32–39.
- Samadi N., Manayi A., Vazirian M., Samadi M., Zeinalzadeh Z., Saghari Z., Abadian N., Mozaffarian V.O., Khanavi M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Anthemis altissima* L. var. *altissima* // *Nat. Prod. Res.* 2012. V. 26. V. 20. P. 1931–1934.
- Singh R., Parihar P., Singh M., Bajguz A., Kumar J., Singh S., Singh V.P., Prasad S.M. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: current status and future prospects // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 515. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00515>
- Sivonen K., Jones G. Cyanobacterial toxins // *Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management* / Eds. Chorus I., Bartram J. London: E. and F.N. Spon, 1999. P. 41–111.
- Strunecký O., Ivanova A.P., Mareš J. An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis // *J. Phycol.* 2023. V. 59. P. 12–51. <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>
- Takeuchi M., Kawai F., Shimada Y., Yokota A. Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing bacteria: emended description of the genus *Sphingomonas* and new descriptions of *Sphingomonas macrogoltabidus* sp. nov., *Sphingomonas sanguis* sp. nov. and *Sphingomonas terrae* sp. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 1993. V. 16. P. 227–238. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(11\)80473-x](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(11)80473-x)
- Tawong W., Pongcharoen P., Pongpadung P., Ponza S. *Neowolleea manoromense* gen. & sp. nov. (Nostocales,

- Cyanobacteria*), a novel geosmin producer isolated from Thailand // *Phytotaxa*. 2019. V. 424. P. 1–17. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.424.1.1>
- Verma S., Thapa S., Siddiqui N., Chakdar H. Cyanobacterial secondary metabolites towards improved commercial significance through multiomics approaches // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 38. Art. 100. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03285-6>
- Wang H., Halary S., Duval C., Bernard C., Troussellier M., Beniddir M.A., Brunel J.-M., Castaldi A., Caudal F., Golléty C., Martin C., Bourguet-Kondracki M.-L., Duperron S. Diversity, metabolome profiling and bioactivities of benthic filamentous cyanobacteria isolated from coastal mangroves of Mayotte // *Front. Mar. Sci.* 2023. V. 10. Art. 1201594. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1201594>
- Willey J.M., Gaskell A.A. Morphogenetic signaling molecules of the streptomycetes // *Chem. Rev.* 2011. V. 111. P. 174 – 187.
- Xuan T.D., Chung M., Khanh T.D., Tawata S. Identification of phytotoxic substances from early growth of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) root exudates // *J. Chem. Ecol.* 2006. V. 32. P. 895–906.

 EXPERIMENTAL ARTICLES

Characterization of Biological Activity and Evaluation of Exogenous Metabolites of Cyanobacteria “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020

Yu. V. Bataeva^{1, *}, M. A. Sinetova², E. A. Kurashov³, J. V. Krylova³, L. V. Kolombet¹, and L. N. Grigoryan⁴

¹State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, 142279, Russia

²K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276, Russia

³Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, 152742, Russia

⁴Astrakhan State University named after V.N. Tatishchev, 414056, Astrakhan, Russia

*e-mail: aveatab@mail.ru

Abstract. Culture of cyanobacteria “*Anabaena*” sp. isolated from alluvial meadow soils in the south of Russia and deposited in the collection of cultures of microalgae and cyanobacteria IPPAS of the Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev RAS under the number IPPAS B-2020. Phylogenetic analysis showed that the studied strain belongs to a clade that unites the genera *Sphaerospermopsis*, *Amphiheterocytum*, *Raphidiopsis*, *Wolleea* and *Neowolleea*, but cannot currently be assigned to any of them. The phytotoxicity, fungicidal and antioxidant activities of the strain were studied. The culture turned out to be non-toxic. Water-alcohol extract and biomass of “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 had a complete suppression of micromycetes *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides* with a maximum diameter of the growth inhibition zone of 2.5 cm. The water extract of cyanobacteria “*Anabaena*” sp. had pronounced antioxidant activity. IPPAS B-2020 in the amount of 20 µl – 39.3%. As part of the metabolites of “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 detected organic acids (citric, lactic, acetic), terpenes, alkanes, alcohols and other low molecular weight organic compounds. Culture “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 is of interest for biotechnology as a producer of such important biologically active compounds as tributyl phosphate, D-limonene, squalene, α-pinene.

Keywords: cyanobacteria, Aphanizomenonaceae, metabolites, antioxidant activity, fungicidal activity, extract, gas chromatography-mass spectrometry

УДК 579.258+575.852

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА УТИЛИЗАЦИИ УГЛЕВОДОВ У БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *SPHAEROCHAETACEAE*: ЭВОЛЮЦИОННОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ ГЕНОВ ГАЛАКТУРОНИДАЗЫ И НЕНАСЫЩЕННОЙ РАМНОГАЛАКТУРОНИЛ-ГИДРОЛАЗЫ¹

© 2024 г. О. Ю. Трошина^{а, *}, Д. Г. Наумов^б, В. И. Речкина^а, В. А. Щербакова^а

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”,

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино, 142290, Россия

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

*e-mail: oltro676@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.02.2024 г.

После доработки 08.04.2024 г.

Принята к публикации 09.04.2024 г.

Проведен сравнительный анализ белков деградации углеводов, закодированных в доступных в настоящее время геномных последовательностях бактерий семейства *Sphaerochaetaceae*, а именно *Sphaerochaeta associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T, *S. halotolerans* 4-11^T, *S. halotolerans* 585, *Sphaerochaeta* sp. S2, *Sphaerochaeta* sp. PS и *Parasphaerochaeta coccoides* SPN1^T. Геномы сферохет кодируют средний по размеру и по разнообразию набор белков, потенциально участвующих в деградации разных классов углеводов, в основном олигосахаридов. Все исследованные геномы кодируют гликозил-гидролазы семейств GH1, GH2, GH3, GH4, GH13, GH20, GH28, GH36, GH43, GH57, GH63, GH77, GH105 и карбогидратэстеразы семейств CE8 и CE9. У всех исследованных сферохет, за исключением *P. coccoides* SPN1^T, в геномах закодировано много белков семейства GH31. У исследованных представителей *Sphaerochaetaceae* нет генов эндо-β-ацетилмурамидазы (лизоцима) семейства GH23, вовлеченной в процесс оборота пептидогликана. Однако геномы *S. associata*, *S. globosa*, *Sphaerochaeta* sp. PS и *S. pleomorpha* содержат ген экзо-β-ацетилмурамидазы (семейство GH171). Значительная часть генов, кодирующих ферменты деградации углеводов, имеет наиболее близкие гомологи среди представителей филумов *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Pseudomonadota*. В геномах исследованных бактерий закодированы белки, которые потенциально могут участвовать в деградации пектина. Исследованы способность представителей *Sphaerochaetaceae* использовать для роста пектин, а также эволюционное происхождение генов, кодирующих потенциальные α-галактуронидазу (семейство GH4) и ненасыщенную глюкуронил/рамногалактуронил-гидролазу (семейство GH105), которые участвуют в деградации компонентов пектина.

Ключевые слова: *Sphaerochaeta*, горизонтальный перенос генов, гликозил-гидролаза, полисахаридлиаза, CAZy, GH4, GH105, α-галактуронидаза, ненасыщенная глюкуронил/рамногалактуронил-гидролаза

DOI: 10.31857/S0026365624050034

Сравнительные исследования геномов микроорганизмов показали, что они содержат гены с разной эволюционной историей. Кроме высоко консервативных генов, так называемых “ядерных” или универсальных генов, которые наследуются главным образом вертикально, значительная доля генов, кодирующих периферические метаболические функции и транспортные белки, подвергается масштабным перемещениям как между близкими видами, так и между бактериями из далеких таксонов. Приобретение устойчивости

к антибиотикам и токсинам, генов патогенности, способности использовать новые субстраты и ксенобиотики являются следствием горизонтального переноса генов. Признано, что он играет ключевую роль в эволюции адаптации прокариот к изменяющимся условиям среды (Ochman et al., 2000; Arnold et al., 2022). Ряд исследований указывает на важную роль самой окружающей среды в эволюции геномов бактерий и в их адаптации к специфической экологической нише (Саго-Quintero et al., 2011). Так, сравнительная геномика

¹Дополнительные материалы к статье размещены по ссылке DOI: 10.31857/S0026365624050034

штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* DPC4571 и *L. acidophilus* NCFM, имеющих 98.4% идентичности на уровне генов 16S рРНК, выявила наличие у них специфичных генов или баркодов, типичных для определенной экониши этих бактерий, молока или кишечника животных соответственно (O'Sullivan et al., 2009). Значительная доля генов, полученных в результате горизонтального переноса, отмечена для геномов кокковидных неподвижных спирохет *Sphaerochaeta globosa* и *S. pleomorpha* из семейства *Sphaerochaetaceae*. “Химерные” геномы этих двух бактерий содержат более 10% универсальных генов (генов ядра) и более 50% генов, кодирующих вторичные метаболические функции и транспортные белки, полученные, по-видимому, от грамположительных бактерий *Bacillota* (Caro-Quintero et al., 2012). Большинство генов приобретенных путем горизонтального переноса у исследованных сферохет относятся к категориям транспорта и метаболизма углеводов и аминокислот (Caro-Quintero et al., 2012).

В настоящее время в семействе *Sphaerochaetaceae* известны три рода, включающих восемь видов, а именно *Sphaerochaeta associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T, *S. halotolerans* 4-11^T, *S. pleomorpha* Grapes^T, *Parasphaerochaeta coccoides* SPN1^T, *Pleomorphochaeta caudata* SEBR 4223^T, *P. naphthae* SEBR 4209^T и *P. multiformis* MO-SPC2^T (Nazina et al., 2022). К этому семейству принадлежат также некультивируемые виды родов “*Candidatus Aphodenecus*”, “*Ca. Ornithospirochaeta*”, “*Ca. Physcosoma*”, описанные на основе метагеномных последовательностей, полученных из кишечного тракта птиц и млекопитающих (Gilroy et al., 2021, 2022; Gharechahi et al., 2022). Предлагается выделить семейство *Sphaerochaetaceae* в отдельный порядок *Sphaerochaetales* в классе *Spirochaetia* (Chuvochina et al., 2023). Последовательности генов сферохет широко представлены в разнообразных анаэробных местообитаниях: морских и пресноводных осадках, сточных водах, в нефтяных пластах, в биореакторах по переработке отходов, получения биогаза, в кишечном тракте насекомых, птиц и млекопитающих (Morrison et al., 2020; Tang et al., 2020; Gilroy et al., 2021, 2022; Gharechahi et al., 2022; Nazina et al., 2022). Доступность полногеномных последовательностей близкородственных представителей *Sphaerochaetaceae*, выделенных из разнообразных экологических ниш, позволяет понять, существует ли адаптация этих видов к специфической среде обитания на геномном уровне, а также изучить происхождение некоторых генов.

Все известные представители *Sphaerochaetaceae*, также как и таксономически близкие им бактерии из семейства *Spirochaetaceae*, являются хемоорганогетеротрофами и используют углеводы в качестве основного источника углерода и энергии. Это

предопределило применение нами в работе международной базы данных ферментов синтеза и утилизации углеводов (Carbohydrate-Active Enzymes, CAZy, <http://www.cazy.org/>), а точнее ее разделов, посвященных трем группам ферментов: гликозил-гидролазам (GH), полисахаридазам (PL) и карбогидратэстеразам (CE) (Drula et al., 2022). Ферменты синтеза и деградации углеводов, классифицированные в базе данных CAZy, названы далее термином CAZy-мы. Для каждой из этих групп ферментов классификация CAZy выделяет семейства на основании гомологии аминокислотных последовательностей их каталитических доменов (Drula et al., 2022). Так, в случае гликозил-гидролаз различают почти две сотни семейств (GH1–GH189), более трети из которых объединены в 20 кланов (GH-A–GH-S-T). В пределах части семейств принято выделять подсемейства (например, 49 подсемейств в семействе GH13: GH13_1–GH13_49 или 39 подсемейств в семействе GH43). В предложенной нами ранее иерархической классификации гликозил-гидролаз (Наумов, 2011) почти все разнообразие каталитических доменов этих ферментов сведено к шести основным фолдам — крупным группам белков, имеющих однотипную пространственную структуру и предполагаемую общность эволюционного происхождения. В частности, гликозил-гидролазы с каталитическим доменом в виде (α/α)₆-бочонка представлены в семи кланах (GH-G, GH-L, GH-M, GH-O, GH-P, GH-Q и GH-S), а также в целом ряде семейств, не относящихся к кланам, в т.ч. в семействе GH105. Это семейство объединяет ферменты, отщепляющие от своих субстратов ненасыщенные глюкоуронильные или галактуронильные остатки. Гены белков этого семейства представлены в геномах бактерий и грибов. Семейство GH4 является редким примером семейства, не относящегося ни к одному из шести основных фолдов, а характеризуется наличием у него так называемой укладки Россмана. Ферменты этого и родственного ему семейства GH109 характеризуются необычным для гликозил-гидролаз молекулярным механизмом с использованием НАД⁺ в качестве кофактора. Для ферментов семейства GH4 показано большое разнообразие катализируемых ими активностей (Hall et al., 2009). Проведенный нами ранее филогенетический анализ позволил выделить в нем четыре монофилетические группы белков, характеризующихся различающимися ферментативными активностями (Березина и соавт., 2003). Гены белков этого семейства представлены в геномах бактерий и архей. В 2013 году была установлена еще одна ферментативная активность для ряда белков семейства GH4, а именно активность α-галактуронидазы (Thompson et al., 2013).

Анализ в базе CAZy профилей ферментов деградации и синтеза углеводов (CAZy-мов)

у некоторых известных представителей *Spirochaetia* показывает, что они в значительной степени коррелируют с типом экологической ниши обитания микроорганизмов. *Treponema rectale*, *T. bryantii*, изолированные из кишечного тракта быка, *Thiospirochaeta perfilievi*, *Spirochaeta thermophila*, *Gracilinema caldarium*, *Salinispira pacifica*, выделенные из микробных матов, имели разнообразный и широкий набор CAZy-белков в отличие от родственных им спирохет *Entomospira culicis* и *E. entomophilus*, изолированных из комаров, а также многих патогенных трепонем и боррелий.

Цель настоящей работы заключалась в сравнительном исследовании геномных профилей ферментов деградации углеводов бактерий *Sphaerochaetaceae*, изучении способности представителей этого семейства использовать пектин в качестве источника углерода и анализ эволюционного происхождения генов потенциальных α -галактуронидазы и ненасыщенной глюкоуронил/рамногалактуронил-гидролазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали полные геномные последовательности *S. associata* GLS2^T (GCF_022869165.1), *S. globosa* Buddy^T (GCF_000190435.1), *S. pleomorpha* Grapes^T (GCF_000236685.1), и *P. coccoides* SPN1^T (GCF_000208385.1) (Abt et al., 2012; Caro-Quintero et al., 2012; Troshina et al., 2024), а также геномные данные хорошего качества для *S. halotolerans* 4-11^T (GCA_003429665.1) (Grouzdev et al., 2018), *S. halotolerans* 585 (GCF_009823595.1) и изолятов *Sphaerochaeta* sp. P5 (GCA_032144095.1), *Sphaerochaeta* sp. S2 (GCA_016406725.1).

Идентификацию CAZy-мов, кодируемых в геномах исследуемых бактерий, проводили с помощью ресурса dbCAN3 (<http://bcbl.unl.edu/dbCAN2/>), используя три алгоритма — HMMER:dbCAN, DIAMOND:CAZy и HMMER:dbCAN-sub (Zheng et al., 2023). Только белки, найденные хотя бы двумя из алгоритмов, рассматривали как CAZy-мы. Для сравнения использовали также данные CAZy для геномов *S. associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T, *P. coccoides* SPN1^T (<http://www.cazy.org/>) (Drula et al., 2022). Предсказание сигнальных пептидов проводили с dbCAN3 и Signal-BLAST (Frank, Sippl, 2008). Номера всех идентифицированных ферментов деградации углеводов исследованных геномов приведены в таблице S1 в приложении.

Поиск гомологов CAZy-мов, кодируемых в геномах *Sphaerochaetaceae*, проводили с помощью BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) в базе данных NCBI (раздел “non-redundant protein sequences”). При составлении таблицы

по таксономическому положению ближайших гомологов выбирали только гомологи, принадлежащие организмам с четким таксономическим положением, с покрытием не менее 80%. Если ближайшие гомологи принадлежали одному виду, то отбирали только первую ближайшую последовательность. Для построения филогенетических деревьев отбирали гомологи, имеющие максимальное покрытие исследуемого белка и с четким таксономическим положением, а также ряд метагеномных последовательностей организмов семейства *Sphaerochaetaceae*. Для выравнивания последовательностей, поиска моделей и построения филогенетических деревьев использовали пакет программ MEGA11 (Tamura et al., 2021). Деревья построены методом наибольшего правдоподобия (ML) по модели Le_Gascuel_2008 с дискретным гамма-распределением для моделирования различий в скорости эволюции между участками (5 категорий (+G) и модель изменения скорости позволила некоторым сайтам быть эволюционно неизменными [+I]). Статистическую надежность узлов филогенетических деревьев оценивали с помощью бутстреп-анализа, используя 500 реплик. Для презентации филогенетических деревьев использовали программу TreeViewer (<https://treeviewer.org>) (Bianchini, Sánchez-Baracaldo, 2024). Для идентификации гомологичных генных кластеров, кодирующих белки семейств GH88, PL12 и PL33, использовали сервис CAGECAT (<https://cagecat.bioinformatics.nl/#>) (Gilchrist et al., 2021). Анализ транспортных систем и ферментов метаболизма уроновых кислот проводили с помощью ресурсов KEGG и BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016).

Культуры *S. associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T и *P. coccoides* SPN1^T выращивали анаэробно в атмосфере N₂ в пробирках Хангейта на среде Пфеннинга (г на 1 л дистиллированной воды): NH₄Cl — 0.33, KH₂PO₄ — 0.33, KCl — 0.33, MgCl₂ · 6H₂O — 0.5, NaCl — 1.0, CaCl₂ · 6H₂O — 0.15, дрожжевой экстракт — 0.5, казаминовые кислоты — 0.5, витамины DSMZ 503 — 1 мл, микроэлементы — 1 мл (Кевбрин, Заварзин, 1992), L-цистеин гидрохлорид — 0.4, пектин (полигалактуронозная кислота, CDH) — 3.0. Для *P. coccoides* SPN1 количество дрожжевого экстракта и казаминовых кислот в среде было увеличено до 1.0 г на 1 л. Перед посевом в среду дополнительно вносили (г/л): Na₂S · 9H₂O — 0.25, NaHCO₃ 1.0–2.0. Культивирование проводили при 29°C. Рост оценивали после четырех пересевов на среду с пектином путем измерений оптической плотности при длине волны 600 нм на спектрофотометре модели Cary 300 (“Agilent Technologies”, Австралия) и путем прямых подсчетов клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии, используя микроскоп AxiostarPLUS (“Carl Zeiss”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ показал, что данные, полученные в результате аннотации белков, кодируемых в геномах *S. associata*, *S. globosa*, *S. pleomorpha* и *P. coccoides* с помощью dbCAN3, и данные, приведенные для вышеуказанных геномов в базе CAZy, совпали, за исключением нескольких карбоксиэстераз из семейств CE1, CE4, CE14. Все исследованные представители *Sphaerochaetaceae* имеют средний по размеру и в основном сходный набор семейств CAZy с незначительными различиями в числе генов каждого семейства и в профилях CAZy семейств (таблица). Все исследованные геномы кодируют белки гликозил-гидролаз семейств GH1, GH2, GH3, GH4, GH13, GH20, GH28, GH36, GH43, GH57, GH63, GH77, GH105 и карбогидратэстераз CE8 и CE9. У всех сферохет, за исключением *P. coccoides* SPN1^T, в геномах закодировано

много белков семейства GH31. Геномы *S. associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T и изолята *Sphaerochaeta* sp. S2 кодируют наибольшее число белков CAZy семейств и число CAZy-мов (таблица).

Наиболее представленные гены белков семейств GH2, GH3, GH4, GH31 кодируют потенциальные β-галактозидазы, β-глюкозидазы, α-глюкозидазы, α-галактозидазы, α-ксилозидазы. У всех исследованных сферохет присутствуют гены, кодирующие белки, вероятно, обеспечивающие деградацию соединений крахмала. Многие из этих белков относятся к семейству GH13. Согласно данным CAZy, белки семейства GH13 закодированы также в геномах многих представителей семейства *Spirochaetaceae*, например, в геноме *Spirochaeta africana* содержится 31 ген, у *Salinispira pacifica* их 22 (<http://www.cazy.org/>).

Анализ CAZy-мов сферохет на предмет таксономического положения наиболее близких гомологов программой BLASTP показал, что многие

Таблица. Численность закодированных белков из семейств CAZy для геномов *S. associata* GLS2^T (1), *S. globosa* Buddy^T (2), *S. halotolerans* 4-11^T (3), *S. halotolerans* 585 (4), *S. pleomorpha* Grapes^T (5), *Sphaerochaeta* sp. PS (6), *Sphaerochaeta* sp. S2 (7), *P. coccoides* SPN1^T (8)

CAZy семейства	Геномы							
	1	2	3	4	5	6	7	8
GH1	1	1	1	3	1	1	1	2
GH2	5	5	2	4	3	3	5	5
GH3	4	4	3	3	4	4	4	1
GH4	5	3	3	2	1	3	3	1
GH5	0	0	0	0	0	0	1	0
GH9	0	0	0	0	1	0	0	0
GH13	4	4	6	6	6	4	4	4
GH15	0	0	0	0	1	0	0	0
GH20	2	2	2	2	2	1	2	1
GH28	1	2	1	1	1	1	2	1
GH29	1	1	0	0	0	1	0	1
GH30	0	0	1	0	2	0	1	0
GH31	5	5	3	4	6	4	4**	0
GH36	1	1	1	1	1	1	1	2
GH38	1	0	1	3	0	0	0	1
GH42	0	0	0	1	0	0	1	0
GH43	4	2	2	2	1	1	2	1
GH50	0	0	0	0	1	0	0	0
GH51	1	1	1	1	0	1	1	1
GH52	0	0	0	0	0	0	0	1
GH57	2	2	2	2	2	2	3	3
GH57***	1	1	1	1	1	1	1	1
GH59	0	0	0	0	0	0	0	1
GH63	1	1	1	1	1	1	1	1
GH65	0	0	2	2	2	1	2	1
GH66	0	0	0	0	1	0	0	0
GH67	0	0	0	0	0	0	0	1

Окончание таблицы

CAZy семейства	Геномы							
	1	2	3	4	5	6	7	8
GH77	2	2	2	2	2	2	2	2
GH78	1	1	1	1	0	0	1	0
GH88	2	1	0	0	0	1	1	1
GH94	1	1	0	0	0	0	0	0
GH97	0	0	0	0	0	0	0	1
GH105	4	3	3	3	1	2	2	3
GH106	1	0	0	0	0	1	0	0
GH109	0	0	0	0	0	1	0	0
GH112	2	1	0	0	0	0	1	0
GH125	0	0	1	1	0	0	1	0
GH127	1	2	0	1	0	2	1	0
GH130	0	0	1	1	0	0	0	0
GH151	0	0	0	0	1	1	0	0
GH171	1	1	0	0	1	1	0	0
GH172	0	0	0	0	0	0	0	1
GH179	0	0	0	0	0	0	0	1
PL12	3	1	0	0	1	1	1	2
PL26	0	0	0	0	0	0	0	1
PL33	1	1	0	0	0	1	1	1
PLnc	1	1	0	0	1*	1	1	0
CE1	1*	1*	0	0	1*	1	0	0
CE4	1*	1*	1	1	1*	0	0	0
CE8	1	1	1	1	1	1	1	1
CE9	3	3	1	1	3	3	2	1
CE12	1	1	1	1	0	0	1	1
CE14	1*	1*	1	0	1	1	1	0
CE15	0	0	0	0	1	0	0	0
CE20	0	1	0	0	0	0	0	0
Число генов GH + PL + CE	67	59	46	52	53	50	56	46
Число CAZy семейств	34	33	27	27	31	31	32	31

*Отмеченные белки не присутствуют в списках CAZy. Эти белки были аннотированы программой dbCAN3.
**Один из белков семейства GH31 (WP_304945009.1) представлен в виде фрагмента. Он не был идентифицирован с помощью ресурса dbCAN3, он был идентифицирован BLAST.
***Белки отнесены к семейству GH57 программой dbCAN3. В базе CAZy гомологичные белки у *S. associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T и *P. coccoides* SPN1^T отнесены к GHnc (неклассифицированные).

гены, кодирующие белки деградации углеводов, были, по-видимому, получены в результате горизонтальных переносов из таксономически далеких таксонов *Bacillota*, *Pseudomonadota* и *Bacteroidota* (табл. S2 в приложении). Например, белки WP_244773140.1, WP_013606124.1, WP_117331179.1 и WP_198892871.1 (вероятная α-галактозидаза, семейство GH4) имеют высокий уровень сходства (около 74% идентичности) с гомологичными последовательностями из *Bacillota*. Только белки

семейств GH1, GH57, GH63, GH77 и некоторые белки семейств GH4 и GH13 имеют среди ближайших гомологов последовательности из *Spirochaetota* (табл. S2 в приложении).
У всех исследованных сферохет, в отличие от других известных представителей *Spirochaetota*, не обнаружены гены, кодирующие ферменты оборота пептидогликана, а именно пептидогликан-лиазы и мурамидазы/лизосима, которые относятся к семейству GH23. Однако *S. associata*,

S. globosa, *S. pleomorpha* и *Sphaerochaeta* sp. PS содержат гены, кодирующие белки с относительно высоким уровнем сходства (около 40% идентичности) к недавно охарактеризованному ферменту деградации пептидогликана экзо- β -N-ацетилмурамидазе (семейство GH171; P40407.1 в базе <https://www.uniprot.org/>) (Müller et al., 2021). Ближайшими гомологами этих белков, кодируемых в геномах вышеупомянутых сферохет, являются последовательности из *Bacillota* (табл. S2 в приложении). Гены белков семейства GH171 есть также у ряда представителей рода *Treponema*, а у многих представителей семейства *Leptospiraceae* (класс *Spirochaetia*) даже по 2 копии этого гена. Следует отметить, что набор предсказанных гликозил-гидролаз у *Leptospiraceae* (данные из CAZy), как патогенных, так и свободноживущих, является очень небольшим.

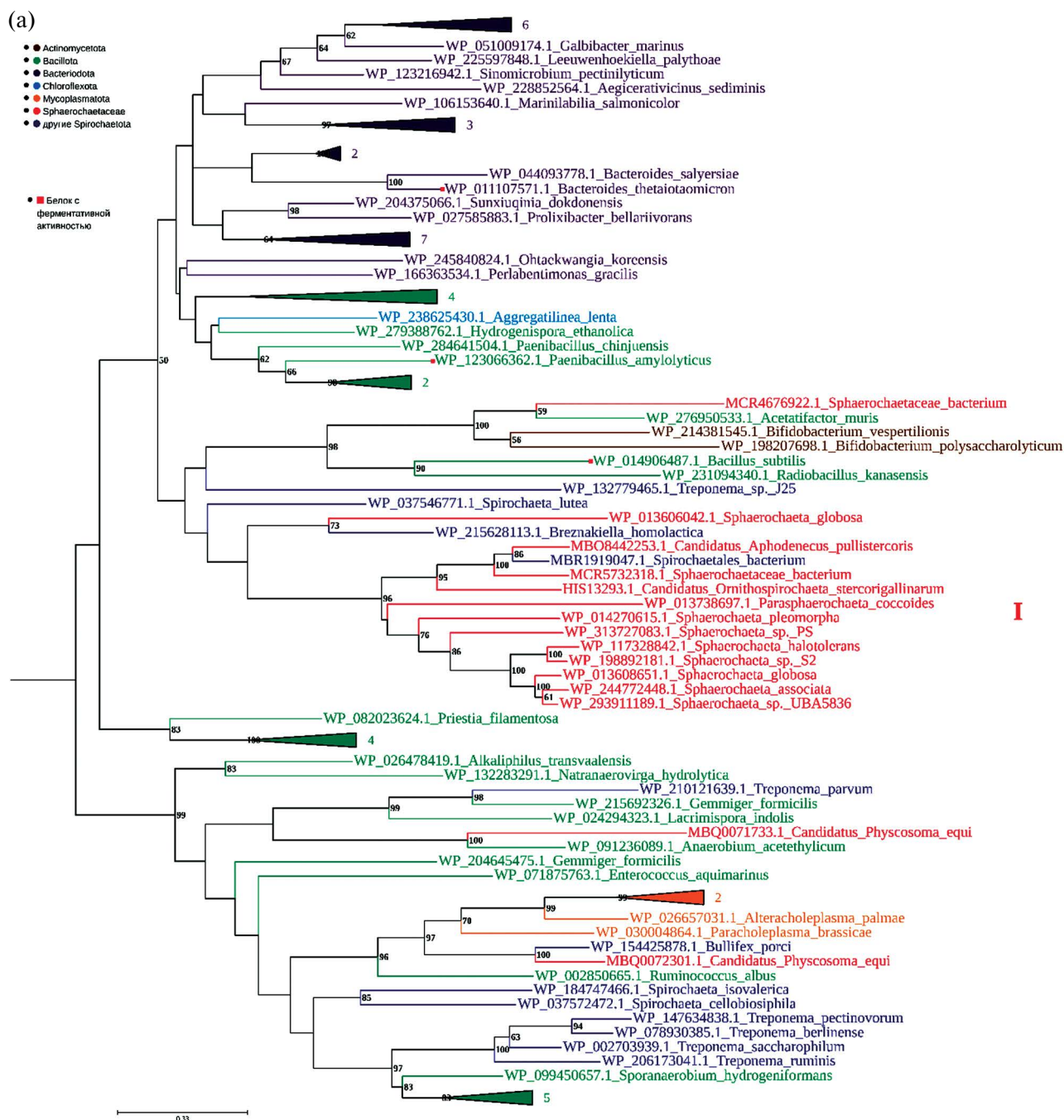
По сравнению с другими сферохетами геном *S. associata* GLS2^T имеет наибольшее число генов, кодирующих белки семейств GH43, GH88, GH105, PL12 и PL33 (таблица). Эти белки аннотированы как потенциальные ксилан-1,4- β -ксилозидазы (GH43), α -N-арабинофуранозидаза (GH43), ненасыщенная глюкуронил-гидролаза (семейство GH88), гепариназа II/III подобные белки (семейства PL12, PL33). Белки WP_244772593.1 и WP_244774031.1 из семейства GH88 у *S. associata* GLS2^T обнаруживают, соответственно, 46.1 и 45.0% идентичности в аминокислотной последовательности с биохимически охарактеризованным ферментом хондроитиндисахарид-гидролазой из *Streptococcus agalactiae* (номер Q8E372.1 в базе <https://www.uniprot.org/>). Белок WP_244774018.1 (семейство PL33) *S. associata* GLS2^T имеет 31.5% идентичности с белком AEW20097.1 из бактерии *Tannerella forsythia* (филум *Bacteroidota*), для которого была показана хондроитин-лиазная активность (К.Ф. 4.2.2.5) (Nguyen et al., 2022). Гены, кодирующие белки семейств GH88, PL12 и PL33, находятся рядом в геномах *S. associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T, *P. coccoides* SPN1^T и *Sphaerochaeta* sp. PS (рис. S1 в приложении), что может свидетельствовать об их функциональной взаимосвязи. Кластер генов вышеуказанных белков, обнаруживаемый в геномах многих сферохет, содержит также гены ABC-транспортных систем углеводов и гены белков двухкомпонентной регуляторной системы транскрипции YesM/YesN (рис. S1). Ген еще одной глюкуронил-гидролазы семейства GH88 (WP_244772593.1) *S. associata* GLS2^T также ко-локализуется с геном потенциальной гепариназы семейства PL12 (рис. S2). В этом локусе есть также гены сульфатаз и ABC-транспортных систем углеводов (белки WP_244772597.1, WP_244772598.1 и WP_244772599.1) (рис. S2 в приложении). Белки транспорта углеводов, закодированные в данном кластере генома *S. associata* GLS2^T, имеют высокую

степень сходства (более 70% идентичности) с гомологами из *Bacillota*. Потенциальная сульфатаза из *S. associata* GLS2^T (WP_244772595.1) обнаруживает 33.0% сходства с охарактеризованной сульфатазой из бактерии *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 (Q8A2F6.1), для которой показан гидролиз сульфатированных глюкозаминогликанов хондроитина и дерматансульфатов (Ulmer et al., 2014). Следует отметить, что штамм *S. associata* GLS2^T был выделен из устойчивого консорциума с археей рода *Methanosarcina* (Troshina et al., 2015), которые, как известно, содержат в составе клеточных оболочек метанохондроитин, состоящий из N-ацетил-D-галактозамина и D-глюкуроновой (или D-галактуроновой) кислоты в соотношении 2 : 1 и со следующей структурой $[\rightarrow\beta\text{-D-GlcA-(1\rightarrow3)-}\beta\text{-D-GalNAc-(1\rightarrow4)-}\beta\text{-D-GalNAc-(1\rightarrow)n}]$ (Klingl et al., 2019). Белки семейств GH88, PL12, PL33 у исследованных сферохет имеют среди ближайших гомологов последовательности представителей таксонов *Pseudomonadota* и *Bacillota* (табл. S2 в приложении), и, по-видимому, гены этих белков были получены в результате горизонтальных переносов. Гепариназа II/III подобные белки семейства PL12 сферохет имеют низкое сходство (около 25% идентичности для белка WP_244772004.1) с биохимически охарактеризованными гепаринсульфатазами. Можно предположить, что эти белки, при условии их выделения и изучения каталитических свойств, могут проявлять новую ферментативную активность.

В геномах *S. globosa*, *S. associata*, *Sphaerochaeta* sp. PS и *Sphaerochaeta* sp. S2 присутствует ген, кодирующий белок, который в настоящее время не классифицирован в CAZy. Его относят к семейству PLnc. В последовательности этого белка есть консервативная область рамногалактуронан-лиазы. Эти белки аннотированы алгоритмом HMMER в dbCAN3 как белки семейства PL11, но как неклассифицированные белки семейства PLnc алгоритмом DIAMOND. В геноме *P. coccoides* закодирована рамногалактуронан-экзолиаза семейства PL26. Этот белок, так же как и белок семейства PLnc, возможно, участвует в расщеплении олигосахаридов рамногалактуронана I, одного из компонентов пектина. Образующие в результате действия рамногалактуронан-лиаз по типу β -элиминирования олигосахариды с Δ -4,5-ненасыщенными α -галактуронопиранозными остатками на невозстанавливаемом конце в дальнейшем являются субстратами для белков семейства GH105. Охарактеризованные к настоящему времени белки этого семейства катализируют гидролитическое отщепление ненасыщенного остатка α -галактуроновой или α -глюкуроновой кислот от олигосахаридов пектина или ульвана соответственно (http://www.cazy.org/GH105_characterized.html). Впервые ферменты семейства GH105 были

выделены в 2006 году из *Bacillus subtilis* (Itoh et al., 2006). Гомологи потенциальных ненасыщенных рамногалактуронил-гидролаз (К.Ф. 3.2.1.172) и d-4,5-ненасыщенной α -галактуронидазы (К.Ф. 3.2.1.-) закодированы в геномах исследованных *Sphaerochaetaceae* (семейство GH105, таблица). В то же время белки семейства GH105 есть только у некоторых из аннотированных в базе CAZY представителей *Spirochaetota*, а именно только у некоторых видов родов *Treponema* и *Spirochaeta*. Напротив, у исследованных *Sphaerochaetaceae*

этот ген присутствует в количестве от 1 до четырех копий (таблица). То, что эти гены сохраняются в геномах сферохет и присутствуют в нескольких копиях, свидетельствует о возможном значении продуктов этих генов в метаболизме сферохет. В геномах *Sphaerochaetaceae* нет генов секретируемых белков, действующих на первых этапах деградации пектина, а именно пектин- и пектат-лиаз из семейств PL1 и PL9, рамногалактуронан эндо- и экзолиаз семейств PL11 и PL26, полигалактуроназы из семейства GH28 (табл. S1 в приложении).



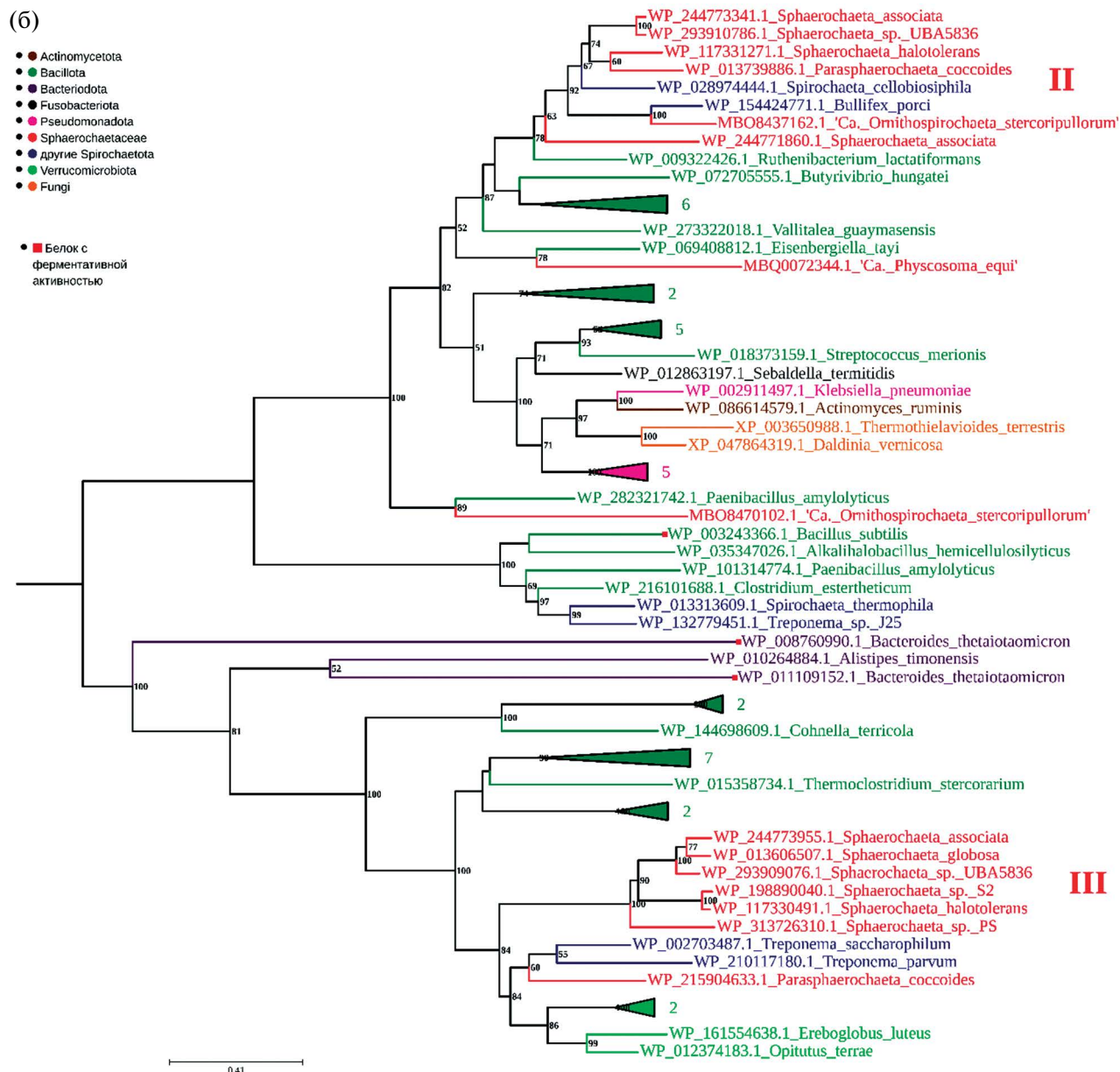


Рис. 1 (а, б). Филогенетическое древо белков семейства GH105 гликозил-гидролаз, закодированных в геномах *Sphaerochaetaceae*, построенное методом наибольшего правдоподобия: а – рисунок отражает филогенетическое положение белка WP_244772448.1 из *S. associata* и его гомологов; анализ включал 94 аминокислотные последовательности; б – рисунок отражает положение белков WP_244773341.1, WP_244771860.1, WP_244773955.1 из *S. associata* и их гомологов. Анализ включал 74 аминокислотные последовательности. Цветовые обозначения для крупных таксонов указаны на рисунке вверху слева. Белки с определенной ферментативной активностью, а именно d-4,5-ненасыщенная рамногалактуронил-гидролаза (WP_014906487.1, WP_003243366.1, WP_011109152.1) и d-4,5-ненасыщенная α -галактуронидаза (WP_008760990.1, WP_011107571.1, WP_123066362.1) обозначены. В точках ветвления указаны значения бутстрап-поддержки $\geq 50\%$. Масштаб указывает на количество замен на одно положение аминокислотной последовательности. Для упрощения отображения деревьев некоторые кластеры были слопнуты в треугольники со сторонами, соответствующими средней длине ветвей в данном кластере. Количество последовательностей указано рядом с кластерами. Номера последовательностей и организмы в слопнутых кластерах приведены в таблице S3 (по порядку сверху вниз) в приложении.

В то же время в геномах практически всех сферохет есть гены, кодирующие цитоплазматические белки, гомологичные полигалактуроназе (GH28),

пектинметил-эстеразе (CE8), рамногалактуронан-ацетилэстеразе (CE12), ненасыщенной рамногалактуронил-гидролазе (GH105) и α -галактуронидазе

(GH4) (таблица). Последний фермент осуществляет гидролиз дигалактуронатов. Ген потенциальной α -галактуронидазы присутствует у всех исследованных сферохет, за исключением *S. pleomorpha* Grapes^T (таблица).

С целью изучения происхождения белков семейства GH105, кодируемых в геномах *Sphaerochaetaceae*, был проведен филогенетический анализ с использованием нескольких десятков гомологов. В геноме *S. associata* присутствует 4 гена, кодирующих белки семейства GH105 (табл. S1). Поиск ближайших гомологов этих белков в базах NCBI и UniProtKB/Swiss-Prot показал, что один из белков WP_244772448.1 из *S. associata* имел отличающийся спектр близких гомологов и низкий уровень сходства с остальными белками семейства GH105 из *S. associata* (24.9% идентичности с WP_244771860.1, 32.2% с WP_244773341.1 и 30.1% с WP_244773955.1). Кроме того, белок WP_244772448.1 и три остальных белка отличались в отношении их сходства с белками с известной ферментативной активностью. Множественное выравнивание и исследование филогении белков семейства GH105 из *Sphaerochaetaceae* (рис. S3) показало, что WP_244772448.1 и его ближайшие гомологи образуют отдельный и далекий кластер. В связи с низким сходством белка WP_244772448.1 с тремя остальными белками из *S. associata*, для них были построены отдельные филогенетические деревья (рис. 1а и 1б).

На филогенетических деревьях белки семейства GH105 сферохет формируют три четко обособленных кластера I–III (рис. 1а, 1б). Кластер I потенциальных ферментов семейства GH105 сферохет имеет сложную филогенетическую картину (рис. 1а). Попарное сравнение WP_244772448.1 *S. associata* из этого кластера с известными экспериментально охарактеризованными ферментами семейства GH105 показало, что он имеет сходство с d-4,5-ненасыщенной α -галактуронидазой *Paenibacillus amylolyticus* (WP_123066362.1, идентичность 43.2% аминокислотных остатков), с d-4,5-ненасыщенной α -галактуронидазой *B. thetaiotaomicron* (WP_011107571.1, идентичность 43.1%) и ненасыщенной рамногалактуронил-гидролазой YteR из *B. subtilis* (WP_014906487.1, идентичность 36.9%) (Itoh et al., 2006; Ndeh et al., 2017; Keggi, Doran-Peterson 2020). На филогенетическом древе (рис. 1а) кластер I последовательностей сферохет состоит из двух подкластеров. Один из них образован из белков, закодированных в геномах культивируемых изолятов *Sphaerochaetaceae*. Второй образован последовательностями из метабеномов, изолированных из кишечного тракта птиц и млекопитающих. Кроме того, две последовательности из вида “*Ca. Physcosoma equi*” (MBQ0071733.1, MBQ0072301.1), для которого доступен лишь геном, созданный на основе метабенома (MAG),

группируются отдельно от остальных белков сферохет, ближе к последовательностям из *Spirochaetaceae* (рис. 1а). Структура филогенетического древа не позволяет сделать однозначный вывод о происхождении этой группы белков у *Sphaerochaetaceae*, так как кластер I образует статистически плохо поддерживаемые кластеры с белками из *Bacillota*, *Bacterioidota* и некоторыми из *Spirochaetaceae*.

Две последовательности WP_244773341.1 и WP_244771860.1 *S. associata*, вместе с ближайшими гомологами из *Sphaerochaetaceae* и двумя белками из сферохет, образовали кластер II (рис. 1б). Последовательность MBQ0072344.1 из некультивируемого вида “*Ca. Physcosoma equi*” оказалась отдельно от сферохет, вместе с более эволюционно древними белками из *Bacillota*. Белки кластера II имеют ближайшего общего эволюционного предка с представителями *Bacillota* (рис. 1б) и имеют сходство около 30% идентичных аминокислотных остатков с ненасыщенной рамногалактуронил-гидролазой YesR *B. subtilis* (WP_003243366.1) (Itoh et al., 2006).

Кластер III составляют белки длиной около 690 аминокислотных остатков (рис. 1б). Все экспериментально исследованные к настоящему времени белки из семейства GH105 имеют длину до 400 аминокислотных остатков. Попарное сравнение белка WP_244773955.1 *S. associata* с известными охарактеризованными белками семейства GH105 показало низкий уровень сходства с ненасыщенной рамногалактуронил-гидролазой (WP_011109152.1 идентичность 31.8%) и с d-4,5-ненасыщенной α -галактуронидазой (WP_008760990.1, идентичность 27.6%) *B. thetaiotaomicron*. Белки из *Sphaerochaetaceae*, составляющие кластер III, находятся внутри большого статистически надежного кластера последовательностей *Bacillota* (рис. 1б), и, по-видимому, кодирующие их гены были получены в результате горизонтального переноса из *Bacillota*.

Потенциальная α -галактуронидаза семейства GH4 у исследованных сферохет имеет примерно 40% идентичности с гомологами из *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (WP_014757159.1) и *B. subtilis* (WP_003244472.1), для которых была впервые продемонстрирована ферментативная активность — отщепление остатка α -галактуроновой кислоты в дигалактуронатах/олигогалактуронатах (Thompson et al., 2013). Филогенетический анализ потенциальной α -галактуронидазы, кодируемой в геномах сферохет, указывает на общего ближайшего предка у этих белков с белками из веррукомикробиот и протеобактерий (рис. 2).

Исследование роста *S. associata*, *S. globosa*, *S. pleomorpha*, *P. coccoides* показало слабый, но устойчивый рост на пектине в течение многих пересевов. Численность клеток в культурах *S. associata* и *S. globosa* на среде с пектином была значительно выше, чем в контролях (рис. S4 в приложении).

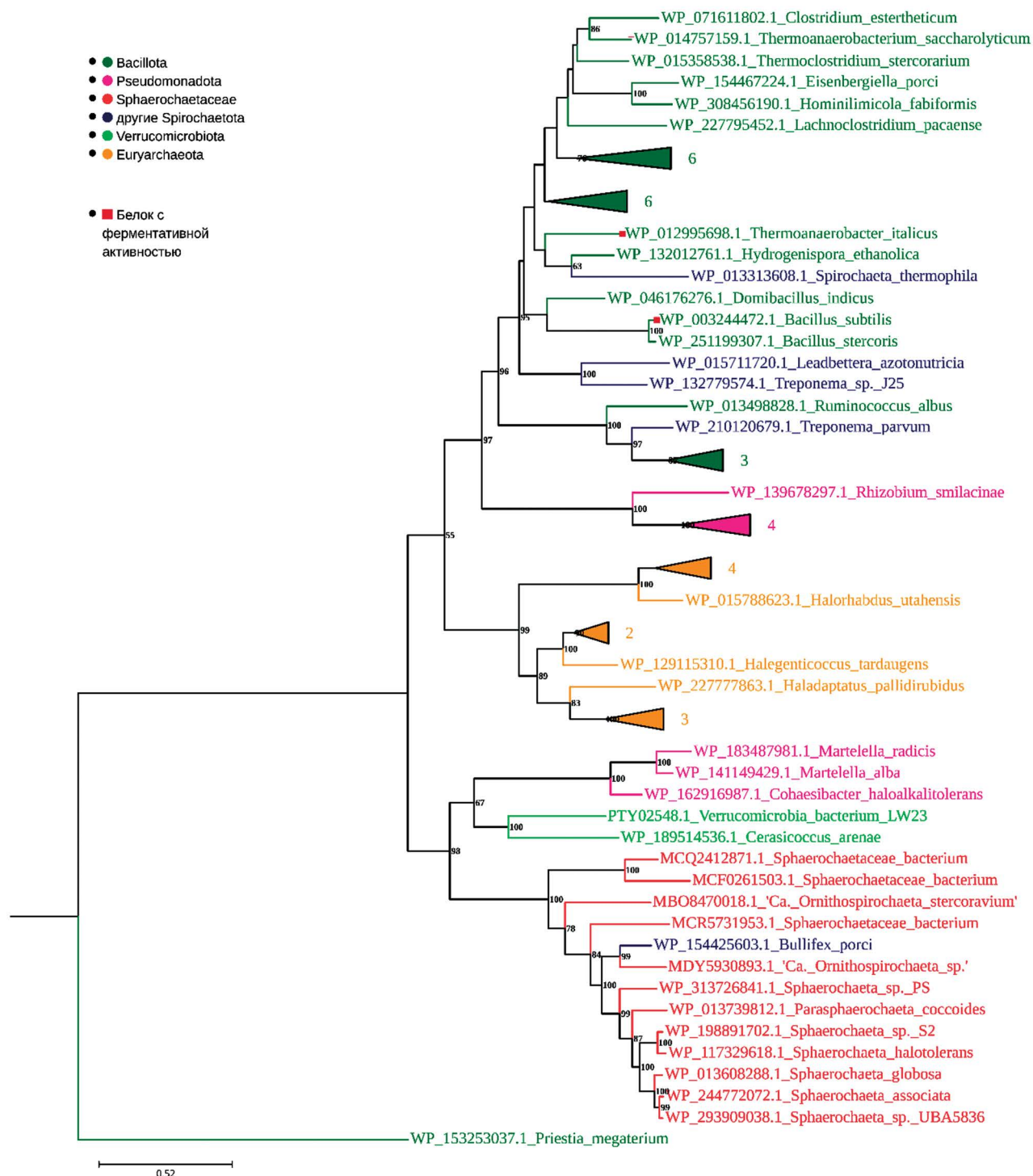


Рис. 2. Филогенетическое древо потенциальных α-галактуронидаз семейства GH4, закодированных в геномах *Sphaerochaetaceae*, построенное методом наибольшего правдоподобия. Анализ включал 67 белковых последовательностей. Значения бутстреп $\geq 50\%$ указаны в точках ветвления. Масштабная линейка указывает на количество замен на одно положение аминокислотной последовательности. Цветовые обозначения для таксонов указаны на рисунке вверху слева. Белки с активностью α-галактуронидазы WP_003244472.1 и WP_012995698.1 обозначены. Для упрощения отображения деревьев некоторые кластеры были схлопнуты в треугольники со сторонами, соответствующими средней длине ветвей в данном кластере. Количество последовательностей указано рядом с кластерами. Номера последовательностей и организмы в схлопнутых кластерах приведены в таблице S3 в приложении.

После 5-го пересева оптическая плотность OD₆₀₀ культуры *S. associata* GLS2^T достигала 0.1 на 11 сут культивирования и дальше не возрастала. Слабый рост бактерий был обусловлен, по-видимому, использованием олигогалактуронидов, присутствующих в коммерческом препарате пектина.

Анализ транспортных систем олигогалактуронидов и путей метаболизма уроновых кислот у сферохет с использованием KEGG (<https://www.kegg.jp/kegg/>) и сервиса BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) показал, что исследуемые геномы сферохет имеют необходимые наборы генов для транспорта и метаболизма уроновых кислот (табл. S4, S5). Причем *S. associata*, *S. globosa*, *S. halotolerans* 4-11^T, *Sphaerochaeta* sp. S2 имели все потенциальные ферменты для деградации уроновых кислот, в том числе ненасыщенных остатков уроновых кислот, образующихся в результате гидролиза соответствующими гидролазами (семейства GH88 и GH105). В геномах *S. pleomorpha*, *S. halotolerans* 585, *Sphaerochaeta* sp. PS и *P. coccoides* не было лишь одного белка 2-дезоксид-D-глюконат-дегидрогеназы (KduD), работающего на пути превращения ненасыщенных остатков уроновых кислот. Следует отметить, что для метаболизма уроновых кислот в геноме *S. associata* есть дополнительные копии генов, кодирующих алтронат гидролазы (К.Ф. 4.2.1.7), глюкуроноид изомеразы (К.Ф. 5.3.1.12), манноид дегидратазы (К.Ф. 4.2.1.8) (табл. S4). Эти белки имеют в качестве ближайших гомологов последовательности из таксонов *Pseudomonadota* и *Bacillota* и были получены, по-видимому, в результате горизонтальных переносов соответствующих генов. Анализ исследуемых геномов *Sphaerochaetaceae* также выявил многочисленные потенциальные транспортные системы ABC типа для разнообразных компонентов пектина (табл. S5).

В заключение следует отметить, что в геномах исследованных *Sphaerochaetaceae* закодирован умеренный по разнообразию набор ферментов деградации углеводов, среди которых наиболее представлены гены потенциальных α- и β-галактозидаз, α- и β-глюкозидаз, α- и β-ксилозидаз, ненасыщенной рамногалактуронил-гидролазы. Представители исследованных *Sphaerochaetaceae* имеют генетический потенциал для транспорта и гидролиза олигосахаридов разной природы, как растительных, например, компонентов пектина, ксиланов, ксиллоглюканов, так и олигосахаридов микробного происхождения метанохондритина, альгината. Спектр закодированных белков деградации углеводов в незначительной степени коррелировал со спецификой экологической ниши, из которой были выделены эти бактерии. В частности, геном *S. associata* содержал повышенное число генов, продукты которых, вероятно, могут участвовать в деградации метанохондритина, полисахаридного каркаса метаносарцины, из тесной ассоциации

с которой был изолирован штамм *S. associata*. Эти микроорганизмы могут представлять интерес для дальнейшего исследования как источник новых ферментов деградации углеводов. Филогенетический анализ происхождения потенциальных α-галактуронидаз и ненасыщенной рамногалактуронил-гидролазы, закодированных в геномах *Sphaerochaetaceae*, указывает на их приобретение от общего предка с *Pseudomonadota* (GH4) и предков разного таксономического положения для белков семейства GH105.

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

- Березина О.В., Лунина Н.А., Зверлов В.В., Наумов Д.Г., Либель В., Великодворская Г.А. Кластер генов *Thermotoga neopolitana*, участвующих в деградации крахмала и мальтодекстринов: молекулярная структура локуса // Мол. биология. 2003. Т. 37. С. 801–809.
- Berezina O. V., Lunina N. A., Zverlov V. V., Naumoff D. G., Liebl W., Velikodvorskaya G. A. A cluster of *Thermotoga neopolitana* genes involved in the degradation of starch and maltodextrins: the molecular structure of the locus // Mol. Biol. (Moscow). 2003. V. 37. P. 678–685.
- Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 812–817.
- Kevbrin V. V., Zavarzin G. A. The effect of sulfur compounds on growth of halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum* // Microbiology (Moscow). 1992. V. 61. P. 563–571.
- Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 764–780.
- Naumoff D. G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 622–635.
- Abt B., Han C., Scheuner C., Lu M., Lapidus A., Nolan M., Lucas S., Hammon N., Deshpande S., Cheng J.-F., Tapia R., Goodwin L. A., Pitluck S., Liolios K., Paganini I., Ivanova N., Mavromatis K., Mikhailova N., Huntemann M., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Brambilla E.-M., Rohde M.,

- Spring S., Gronow S., Goeker M., Woyke T., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.-P., Detter J.C. Complete genome sequence of the termite hindgut bacterium *Spirochaeta coccoides* type strain (SPN1^T), reclassification in the genus *Sphaerochaeta* as *Sphaerochaeta coccoides* comb. nov. and emendations of the family *Spirochaetaceae* and the genus *Sphaerochaeta* // Stand. Genom. Sci. 2012. V. 6. P. 194–209.
- Arnold B.J., Huang I.T., Hanage W.P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2022. V. 20. P. 206–218.
- Bianchini G., Sánchez-Baracaldo P. TreeViewer: Flexible, modular software to visualise and manipulate phylogenetic trees // Ecol. Evol. 2024. V. 14. Art. e10873.
- Caro-Quintero A., Deng J., Auchtung J., Brettar I., Höfle M.G., Klappenbach J., Konstantinidis K.T. Unprecedented levels of horizontal gene transfer among spatially co-occurring *Shewanella* bacteria from the Baltic Sea // ISME J. 2011. V. 5. P. 131–140.
- Caro-Quintero A., Ritalahti K.M., Cusick K.D., Löffler F.E., Konstantinidis K.T. The chimeric genome of *Sphaerochaeta*: nonspiral spirochetes that break with the prevalent dogma in spirochete biology // MBio. 2012. V. 3. Art. e00025-12.
- Chuvochina M., Mussig A.J., Chaumeil P.A., Skarszewski A., Rinke C., Parks D.H., Hugenholtz P. Proposal of names for 329 higher rank taxa defined in the Genome Taxonomy Database under two prokaryotic codes // FEMS Microbiol. Lett. 2023. V. 370. Art. fnad071.
- Drula E., Garron M.L., Dogan S., Lombard V., Henrissat B., Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature // Nucl. Acids Res. 2022. V. 50. P. D571–D577.
- Frank K., Sippl M.J. High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques // Bioinformatics. 2008. V. 24. P. 2172–2176.
- Gharechahi J., Sarikhan S., Han J.L., Ding X.Z., Saldekdeh G.H. Functional and phylogenetic analyses of camel rumen microbiota associated with different lignocellulosic substrates // NPJ Biofilms Microbiomes. 2022. V. 8. Art. 46.
- Gilchrist C.L., Booth T.J., van Wersch B., van Grieken L., Medema M.H., Chooi Y.H. cblaster: a remote search tool for rapid identification and visualization of homologous gene clusters // Bioinform. Adv. 2021. V. 1. Art. vbab016.
- Gilroy R., Leng J., Ravi A., Adriaenssens E.M., Oren A., Baker D., La Ragione R.M., Proudman C., Pallen M.J. Metagenomic investigation of the equine faecal microbiome reveals extensive taxonomic diversity // PeerJ. 2022. V. 10. Art. 13084.
- Gilroy R., Ravi A., Getino M., Pursley I., Horton D.L., Alikhan N.F., Baker D., Gharbi K., Hall N., Watson M., Adriaenssens E.M., Foster-Nyarko E., Jarju S., Sekka A., Antonio M., Oren A., Chaudhuri R.R., La Ragione R., Hildebrand F., Pallen M.J. Extensive microbial diversity within the chicken gut microbiome revealed by metagenomics and culture // PeerJ. 2021. V. 9. Art. 10941.
- Grouzdev D.S., Bidzhieva S.K., Sokolova D.S., Tourova T.P., Patutina E.O., Poltarau A.B., Nazina T.N. Draft genome sequence of a fermenting bacterium, “*Sphaerochaeta halotolerans*” 4-11^T, from a low-temperature petroleum reservoir in Russia // Microbiol. Res. Announc. 2018. V. 7. Art. e01345-18.
- Hall B.G., Pikis A., Thompson J. Evolution and biochemistry of family 4 glycosidases: implications for assigning enzyme function in sequence annotations // Mol. Biol. Evol. 2009. V. 26. P. 2487–2497.
- Itoh T., Ochiai A., Mikami B., Hashimoto W., Murata K. A novel glycoside hydrolase family 105: the structure of family 105 unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase complexed with a disaccharide in comparison with family 88 enzyme complexed with the disaccharide // J. Mol. Biol. 2006. V. 360. P. 573–585.
- 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.
- Keggi C., Doran-Peterson J. The homogalacturonan deconstruction system of *Paenibacillus amylolyticus* 27C64 requires no extracellular pectin methylesterase and has significant industrial potential // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. Art. e02275-19.
- Keggi C., Doran-Peterson J. *Paenibacillus amylolyticus* 27C64 has a diverse set of carbohydrate-active enzymes and complete pectin deconstruction system // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 46. P. 1–11.
- Klingl A., Pickl C., Flechsler J. Archaeal cell walls // Subcell Biochem. / Ed. Kuhn A. Springer Cham., 2019. V. 92. P. 471–493.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_14
- Morrison P.K., Newbold C.J., Jones E., Worgan H.J., Grove-White D.H., Dugdale A.H., Barfoot C., Harris P.A., Argo C.M. The equine gastrointestinal microbiome: impacts of weight-loss // BMC Vet. Res. 2020. V. 16. P. 78.
- Müller M., Calvert M., Hottmann I., Kluj R.M., Teufel T., Balbuchta K., Engelbrecht A., Selim K.A., Xu Q., Borisova M., Titz A., Mayer C. The exo- β -N-acetylmuramidase NamZ from *Bacillus subtilis* is the founding member of a family of exo-lytic peptidoglycan hexosaminidases // J. Biol. Chem. 2021. V. 296. Art. 100519.
- Nazina T.N., Bidzhieva S.K., Grouzdev D.S., Löffler F.E. *Sphaerochaeta* // Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey’s Manual Trust, 2021. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm02038>
- Nazina T.N., Bidzhieva S.K., Grouzdev D.S., Löffler F.E. *Sphaerochaetaceae* // Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. Trujillo M.E., Dedysh

- S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, 2022. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00390>
- Ndeh D., Rogowski A., Cartmell A., Luis A.S., Baslé A., Gray J., Venditto I., Briggs J., Zhang X., Labourel A., Terrapon N., Buffetto F., Nepogodiev S., Xiao Y., Field R.A., Zhu Y., O'Neil M.A., Urbanowicz B.R., York W.S., Davies G.J., Abbott D.W., Ralet M.C., Martens E.C., Henrissat B., Gilbert H.J. Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions // *Nature*. 2017. V. 544. P. 65–70.
- Nguyen P., Eshaque R., Garland B.A., Dang A., Suits M.D.L. Degradation of chondroitin sulfate A by a PUL-like operon in *Tannerella forsythia* // *PLoS One*. 2022. V. 17. Art. e0272904.
- O'Sullivan O., O'Callaghan J., Sangrador-Vegas A., McAuliffe O., Slattery L., Kaleta P., Callanan M., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Beresford T. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set // *BMC Microbiol*. 2009. V. 9. Art. 50.
- Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation // *Nature*. 2000. V. 405. P. 299–304.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. // MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38. P. 3022–3027.
- Tang S., Xin Y., Ma Y., Xu X., Zhao S., Cao J. Screening of microbes associated with swine growth and fat deposition traits across the intestinal tract // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 586776.
- Thompson J., Pikis A., Rich J., Hall B.G., Withers S.G. α -Galacturonidase(s): a new class of family 4 glycoside hydrolases with strict specificity and a unique CHEV active site motif // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 799–803.
- Troshina O., Oshurkova V., Suzina N., Machulin A., Ariskina E., Vinokurova N., Kopitsyn D., Novikov A., Shcherbakova V. *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01 // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 4315–4322.
- Troshina O.Y., Tepeeveva A.N., Arzamastseva V.O., Whitman W.B., Varghese N.J., Shapiro N., Woyke T., Kyrpides N.C., Vasilenko O.V. Complete genome sequence of the type strain bacterium *Sphaerochaeta associata* GLS2^T (VKM B-2742)^T // *J. Bioinform. Genom.* 2024. V. 1. Art. 23.
<http://dx.doi.org/10.18454/jbg.2024.23.1>
- Ulmer J.E., Vilén E.M., Namburi R.B., Benjdia A., Beneteau J., Malleron A., Bonnaffé D., Dri-guez P.A., Descroix K., Lassalle G., Le Narvor C., Sandström C., Spillmann D., Berteau O. Characterization of glycosaminoglycan (GAG) sulfatases from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* reveals the first GAG-specific bacterial endosulfatase // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 24289–24303.
- Zheng J., Ge Q., Yan Y., Zhang X., Huang L., Yin Y. db-CAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. P. W115–W121.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Comparative Genomics of Carbohydrates Utilization in Bacteria of the Family *Sphaerochaetaceae*: Evolutionary Origin of the Genes Encoding Galacturonidase and Unsaturated Rhamnogalacturonyl Hydrolase

O. Yu. Troshina¹*, D. G. Naumoff², V. I. Rechkina¹, and V. A. Shcherbakova¹

¹Scryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia

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

*e-mail: oltro676@yandex.ru

Abstract. A comparative analysis of carbohydrate degradation proteins encoded in currently available genomic sequences of bacteria of the family *Sphaerochaetaceae*, namely *Sphaerochaeta associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T, *S. pleomorpha* Grapes^T, *S. halotolerans* 4-11^T, *S. halotolerans* 585, *Sphaerochaeta* sp. S2, *Sphaerochaeta* sp. PS and *Parasphaerochaeta coccoides* SPN1^T was carried out. The genomes of *Sphaerochaeta* spp. encode a medium-sized and diverse set of proteins potentially involved in the degradation of different classes of carbohydrates, mainly oligosaccharides. All studied genomes encode glycoside hydrolases of the GH1, GH2, GH3, GH4, GH13, GH20, GH28, GH36, GH43, GH57, GH63, GH77 and GH105 families, as well as carbohydrate esterases of the CE8 and

CE9 families. All studied bacteria, with the exception of *P. coccoides* SPN1^T, have many proteins of the GH31 family encoded in their genomes. The studied representatives of *Sphaerochaetaceae* do not have genes coding for endo- β -acetylmuramidase (lysozyme) of the GH23 family involved in the process of peptidoglycan turnover. However, the genomes of *S. associata*, *S. globosa*, *Sphaerochaeta* sp. PS and *S. pleomorpha* contain the exo- β -acetylmuramidase gene (GH171 family). A significant part of the genes encoding carbohydrate degradation enzymes have the closest homologues among representatives of the phyla *Bacillota*, *Bacteroidota*, and *Pseudomonadota*. The genomes of the studied bacteria encode proteins that could potentially be involved in the degradation of pectin. The ability of representatives of *Sphaerochaetaceae* to use pectin for growth, as well as the evolutionary origin of genes encoding potential α -galacturonidase (GH4 family) and unsaturated glucuronyl/rhamnogalacturonyl hydrolase (GH105 family), involved in the degradation of pectin components, were studied.

Keywords: *Sphaerochaeta*, lateral gene transfer, glycoside hydrolase, polysaccharide lyase, CAZy, GH4, GH105, α -galacturonidase, unsaturated glucuronyl/rhamnogalacturonyl hydrolase

УДК 574.58+579.68:579.222

АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ НЕФТИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ДОННЫХ ОСАДКОВ РАЙОНА ЕСТЕСТВЕННОГО НЕФТЕПРОЯВЛЕНИЯ (СРЕДНИЙ БАЙКАЛ, БОЛЬШАЯ ЗЕЛЕНОВСКАЯ)¹

© 2024 г. О. Н. Павлова^{а, *}, С. В. Букин^а, О. Н. Изосимова^а, С. М. Черницына^а,
В. Г. Иванов^а, А. В. Хабуев^а, Т. В. Погодаева^а, И. С. Еловская^а, А. Г. Горшков^а, Т. И. Земская^а

^а Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033, Россия

*e-mail: pavlova@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 09.01.2024 г.

После доработки 29.02.2024 г.

Принята к публикации 18.03.2024 г.

Определено разнообразие микробных сообществ донных осадков района нефтепроявления Бол. Зеленовская (оз. Байкал) и потенциальная функциональная активность в анаэробных процессах деградации нефти. При культивировании микроорганизмов подповерхностного и глубинного осадка в накопительных культурах, содержащих нефть и различные акцепторы электронов, в течение одного года при 10°C, концентрация н-алканов снизилась в 1.2–2 раза, ПАУ – в 2.2–2.8 раза. Конверсия углеводов сопровождалась генерацией углеводородных газов (метан, этан). Микробное сообщество подповерхностного осадка характеризовалось большим бактериальным разнообразием, чем глубинного, и представлено микроорганизмами, специализирующимися на процессах разложения широкого спектра субстратов, включая нефтяные углеводороды. В глубинных слоях осадка преобладали *Atribacterota*, *Caldisericota* и *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*), а также представители “редкой биосферы” *Elusimicrobiota* и *Candidatus* *Nadarchaeota*. К числу основных участников деградации нефти в донных осадках оз. Байкал могут быть отнесены представители филумов *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Desulfobacterota*, *Atribacterota*, *Halobacteriota* и *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*).

Ключевые слова: оз. Байкал, донные осадки, анаэробное окисление нефти, микробное сообщество, углеводородные газы

DOI: 10.31857/S0026365624050044

Оз. Байкал – озеро тектонического происхождения в южной части Восточной Сибири, является крупнейшим природным резервуаром пресной воды. Три пресноводные озера в мире, включая оз. Байкал, а также рифтовое глубоководное озеро Танганьика и мелководное озеро Чапала, характеризуются природными выходами нефти. На оз. Байкал установлены два района естественных нефтепроявлений; один расположен в устье р. Большая Зеленовская (БЗ) и известен с конца XVIII века, второй – у м. Горевой Утес (ГУ) (открыт в 2005 г.) (Хлыстов и соавт., 2007).

Естественный выход нефти у устья реки Бол. Зеленовская, несмотря на свое более длительное существование, остается менее изученным в плане геологического строения донных отложений и рельефа дна в сравнении с нефтепроявлением ГУ.

Разгрузка нефти в виде всплывающих нефтяных капель обнаруживается только на водной поверхности напротив устья реки Бол. Зеленовская на расстоянии ~2 км от береговой линии (рис. 1).

Место выхода нефти на дне долгое время не было установлено. Опробование донных осадков, проведенное с целью уточнения места разгрузки нефти, выявило следы углеводов в осадках подводного каньона, который является продолжением речной долины (БЗ_К) (рис. 1). Скопления нефти и газовых гидратов были установлены также в верхнем слое донных отложений, находящихся в 3.5 км от берега в районе устья р. Бол. Зеленовская на глубине 420 м, которые обозначены как холодный нефтегазовый сип “Зеленсип” (Хлыстов и соавт., 2022).

¹ Дополнительные материалы к статье размещены по ссылке DOI: 10.31857/S0026365624050044

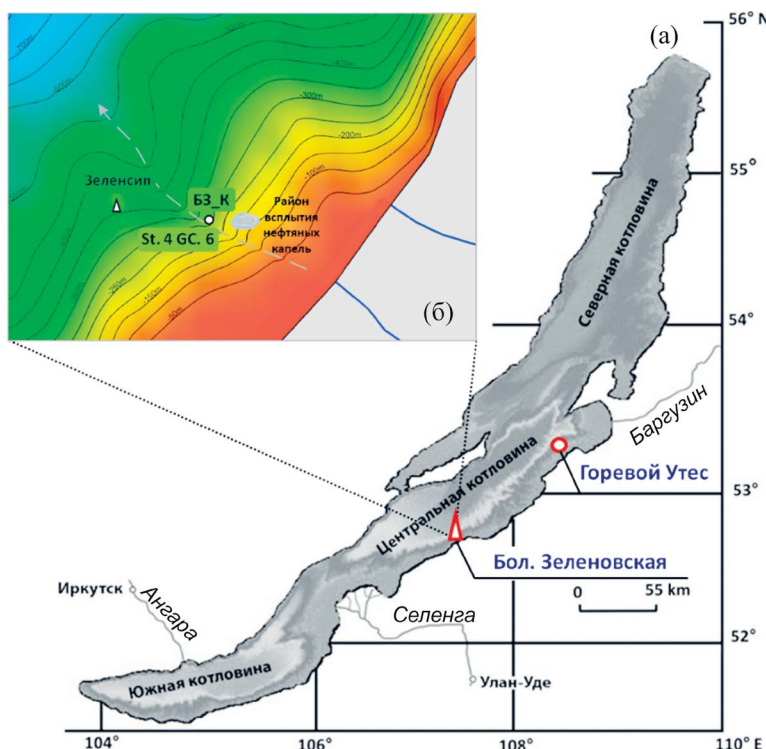


Рис. 1. Карта-схема расположения районов нефтепроявлений в оз. Байкал (а); схема района нефтепроявления напротив устья реки Бол. Зеленевская: ○ — место отбора проб; ▲ — место расположения нефтегазового сипа. Серой линией показано направление подводного каньона (б).

Образцы нефти, собранные как с поверхности озера в районе Бол. Зеленевской, так и в верхнем слое донных отложений “Зеленсип”, представляют собой биodeградированную ароматико-нафтеновую нефть (Хлыстов и соавт., 2022). В подводных каньонах, как и в осадках холодного нефтегазового сипа, где скопления углеводородов находятся длительное время и не поступают на поверхность водной толщи, может функционировать микробное сообщество, деятельность которого обуславливает высокую степень трансформации нефти в анаэробных условиях. В отсутствие кислорода нефтяные углеводороды могут окисляться микроорганизмами при использовании в качестве акцепторов электронов HCO_3^- , SO_4^{2-} , NO_3^- и Fe^{3+} (Zhang et al., 2019). Проведенные ранее исследования показали, что аэробные углеводородокисляющие микроорганизмы вносят значительный вклад в самоочищение озера от нефтяного “загрязнения” (Павлова и соавт., 2012). Вместе с тем, исследования микроорганизмов, участвующих в деградации нефти в анаэробной зоне осадочной толщи озера Байкал, находятся на начальном этапе (Pavlova et al., 2022).

Сравнение микробного разнообразия нефтяных коллекторов в разных частях мира показало корреляцию состава прокариотических сообществ с температурой и глубиной пласта

и отсутствие влияния географического расстояния между нефтяными резервуарами. Показано, что основной микробиом включает три класса бактерий (*Gammaproteobacteria*, *Clostridia* и *Bacteroidia*) и класс архей (*Methanomicrobia*), повсеместно распространенных в нефтяных коллекторах (Sierra-Garcia et al., 2017). По результатам метагеномного анализа известно, что состав микробных сообществ и их потенциальная функциональная активность меняются в зависимости от физико-химических условий нефтяных пластов и степени воздействия при эксплуатации нефтяных месторождений (Hidalgo et al., 2021; Gittins et al., 2023). Библиотеки ампликонов гена 16S рРНК и метагеномные библиотеки микроорганизмов нефтяных резервуаров не содержали общих основных таксонов на уровне вида, рода, семейства или отряда. На уровне высших таксонов только представители филумов *Pseudomonadota*, *Bacillota* и *Halobacteriota* встречались наиболее часто (75% от всех ампликонов гена 16S рРНК) в основном микробиоме нефтяных резервуаров (Gittins et al., 2023).

Естественные нефтепроявления оз. Байкал не подвергаются антропогенному воздействию. Донные осадки оз. Байкал, ассоциированные с разгрузкой углеводородов, содержат автохтонное

микробное сообщество, в котором ключевые участники деградации нефти могут быть отличными или схожими с микроорганизмами других нефтяных экосистем, не подвергшихся воздействию.

Цель исследования — изучить разнообразие и потенциальную функциональную активность микробного сообщества района нефтепроявления донных осадков в устье р. Большая Зеленовская (БЗ) в процессах анаэробного окисления нефти в присутствии различных акцепторов электронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Для исследования отобраны два образца донных осадков из керна St.4 GC. 6, полученного с помощью гравитационной трубы с борта НИС “Г.Ю. Верещагин” (~1.4 км от берега, глубина на водной толще 320 м, Средний Байкал) в 2020 г. (рис. 1). Первый интегральный образец (K1) соответствовал глубине керна 30–50 см, второй (K2) — 250–270 см.

Получение накопительных культур. Для получения накопительных культур образцы донных осадков асептически отбирали из центральной части керна и сразу помещали во флаконы объемом 116 мл, содержащие 50 мл стерильной анаэробной минеральной среды следующего состава (г/л): NaCl — 0.25, KCl — 0.1, NH₄Cl — 0.1, KH₂PO₄ — 0.1, MgCl₂ · 6H₂O — 0.2, CaCl₂ · 2H₂O — 0.1, NaHCO₃ — 1, Na₂S · 9H₂O — 0.5 мМ, резазурин — 0.001, раствор витаминов — 1 мл, раствор микроэлементов по Пфеннигу (Практикум..., 2005) — 1 мл. Флаконы закрывали резиновыми пробками и алюминевыми колпачками, продували очищенным от кислорода азотом и встряхивали 15 мин при 160–180 об./мин на орбитальном шейкере (OS-20, “BioSan”, Рига, Латвия). Полученную суспензию с помощью шприца переносили во флаконы с минеральной средой (50 мл) указанного выше состава, содержащей различные акцепторы электронов: H₂: CO₂ (80 : 10, об.); Na₂SO₄ (20 ммоль), газовая фаза N₂: CO₂ (90 : 10, об.); NaNO₃ (2.3 ммоль), газовая фаза N₂ (100%, об.). Аморфный оксид Fe(III) (10 ммоль), полученный согласно (Slobodkin et al., 1997), вносили в минеральную среду, не содержащую восстанавливающих агентов, газовая фаза CO₂ (100%, об.). Таким образом, были получены 8 накопительных культур (таблица).

В качестве источника углерода использовали 50 мкл (38 мг, ρ = 760 мкг/мкл) нефти (“Ангарская нефтехимическая компания”, Россия), стерилизованной фильтрованием через фильтр-насадку (0.2 мкм, Minisart, “Sartorius Stedim”). Эксперименты проводили в трех повторностях при температуре 10°C в темноте без перемешивания. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду с нефтью без добавления проб осадков.

Аналитические методы. Газообразные углеводороды в экспериментальных флаконах и донных осадках определяли модифицированным методом фазово-равновесной дегазации; погрешность определения концентрации метана составляла ±5% (Большаков, Егоров, 1987). Содержание полициклических ароматических углеводородов и n-алканов в модельных экспериментах определяли согласно (Pavlova et al., 2022). Химический состав поровых вод донных отложений определяли, как описано ранее (Pogodaeva et al., 2017). Исследования проводены на базе приборного центра коллективного пользования физико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН (ЦКП “Ультрамикрoанализ”).

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование гена 16S рРНК. Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование и биоинформатический анализ проводили согласно (Lomakina et al., 2023). Полученные препараты ДНК использовали для амплификации V2–V3 участка гена 16S рРНК бактерий с использованием праймеров 16S_BV2f (50-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA-30) и 16S_BV3r (50-CCGCGGCTGCTGGCAC-30) (Sahm et al., 2013) и V5–V6 участка гена 16S рРНК архей с использованием праймеров Arch-0787f (50-ATTAGATACCCSBGTAAGTCC-30) и Arch-1059r (50-GCCATGCACCCWCCTCT-30) (Yu et al., 2005). Библиотеки секвенировали с использованием стандартного набора Illumina MiSeq v.3 (“Illumina”) в ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИ-ИСХМ. Таксономия приведена согласно геномной базе GDTB (<https://gtdb.ecogenomic.org/>). Уровень покрытия для всех библиотек фрагментов гена 16S рРНК был почти максимальным (от 98.08 до 99.9%), что подтверждалось низкими значениями индекса Chao1, и свидетельствовало о полной репрезентативности библиотек (табл. S1). Полученные нуклеотидные последовательности доступны в базе данных NCBI в рамках проекта PRJNA1056780.

Таблица. Условные обозначения полученных накопительных культур

Глубина отбора проб донных осадков/ условное обозначение	Акцептор электронов			
	H ₂ : CO ₂	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	Fe ³⁺
St.4 GC.6, 30–50 см/K1	K1_HCO ₃	K1_SO ₄	K1_NO ₃	K1_Fe
St.4 GC.6, 250–270 см/K2	K2_HCO ₃	K2_SO ₄	K2_NO ₃	K2_Fe

Для сравнения разнообразия сообществ донных осадков и накопительных культур на уровне филума и рода построены пузырьковые диаграммы для операционных таксономических единиц с относительной численностью $\geq 1\%$ хотя бы в одной библиотеке с использованием программных пакетов *ggplot2* и *reshape2* для языка R (R Core Team, 2022) в среде Rstudio (<https://www.R-project.org/>). Программа iVikodak позволяет на основании таксономического состава исследуемых бактериальных сообществ предсказывать их функциональные характеристики, используя геномные базы данных. С использованием базы данных KEGG (Kanehisa, Goto, 2000) с помощью PICRUSt2 алгоритма (Douglas et al., 2020) был выполнен поиск ближайшего гомологичного аннотированного референсного генома для каждой ОТЕ_{0.03}. Визуализация полученных результатов в виде тепловой карты выполнена с использованием программных пакетов *cluster*, *vegan* и *heatmap* в R. Все ресурсоемкие операции выполнены с использованием высокопроизводительного кластера “Академик В.М. Матросов” Центра коллективного пользования “Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Литолого-химическая характеристика донных осадков. Донные осадки керна St.4 GC.6

представлены восстановленными с поверхности глинами с $Eh -146...-216$ мВ. Окисленный слой отсутствовал. На глубине 50 и 250 см присутствовали песчаные прослои со следами нефти. Осадки характеризовались низкой газонасыщенностью, концентрация метана составляла 0.08 мг/л осадка на глубине 10 см и 5.2–9.4 мг/л осадка на глубине 50–250 см. Гомологи метана в газе в глубинных слоях осадка представлены этаном в следовых количествах.

Поровые воды отложений у поверхности пресные гидрокарбонатно-кальциевые первого типа, с глубиной на пресные гидрокарбонатно-натриевые первого типа. Минерализация у поверхности осадка (105 мг/л) схожа с фоновой в Среднем Байкале (90–180 мг/л) (Pogodaeva et al., 2017). С глубиной она аномально нарастает на порядок (до 1030 мг/л на 250 см). Концентрация ионов гидрокарбоната увеличивается с глубиной от 73 мг/л, достигая максимальных значений 700 мг/л на глубине 250 см. Концентрация ионов хлора увеличивается от 0.6 до 86 мг/л на глубине 270 см (рис. S1a). Нитрат-ионы варьируют от 0.2 до 0.6 мг/л по всему профилю керна. Наибольшая концентрация сульфатов выявлена в поверхностном осадке (6.6 мг/л); по глубине керна она снижалась от 0.9 до 0.3 мг/л. Исследуемые осадки обогащены ионами Mn(II) и Fe(II), максимальные концентрации которых отмечены на глубине 50 см (1.3 и 6.7 мг/л соответственно) (рис. S1б).

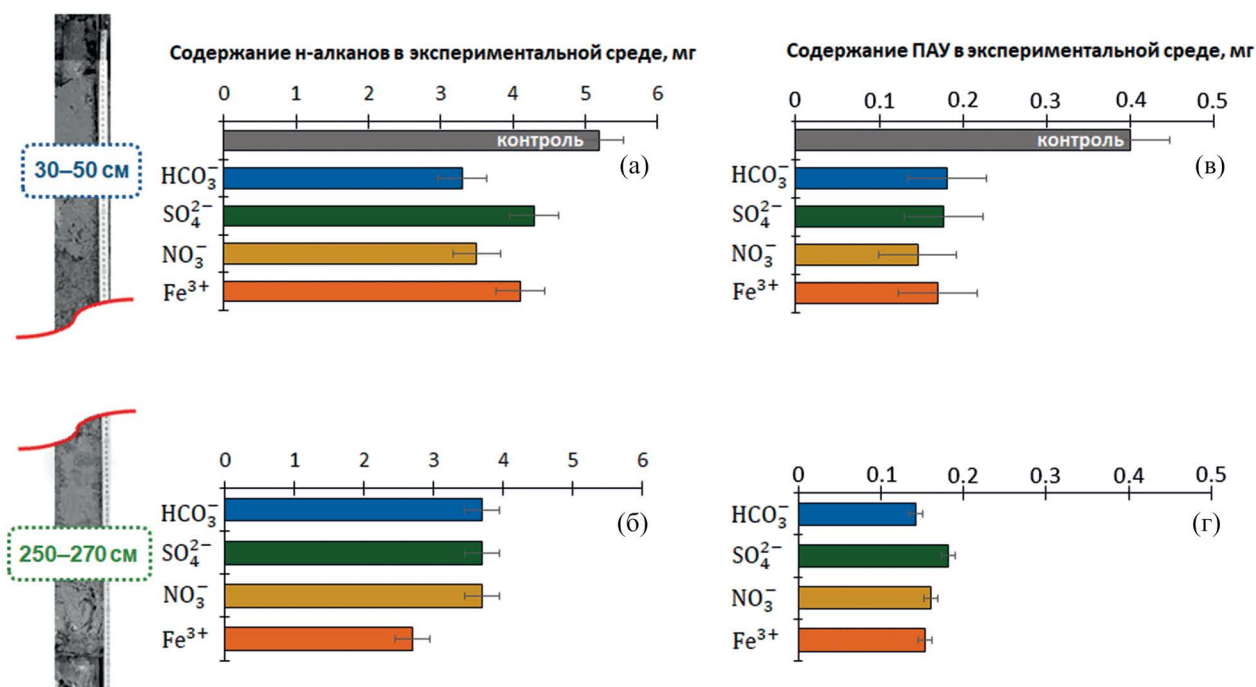


Рис. 2. Убыль н-алканов (а, б) и ПАУ (в, г) в накопительных культурах, содержащих подповерхностные и глубинные осадки, обогащенные гидрокарбонат-, сульфат-, нитрат- ионами и Fe(III).

Дегградация углеводородов в условиях эксперимента. Накопительные культуры, полученные на средах с разными акцепторами электронов и нефтью, в течение одного года показали различную степень конверсии н-алканов и ПАУ (рис. 2).

В культурах, полученных путем заражения сред подповерхностным осадком K1, наибольшая убыль н-алканов (32–36%) отмечена в среде с нитратом и H_2CO_2 в газовой фазе. В этих культурах содержание $\Sigma_{\text{алк}}$ в нефти снизилось до 3.3–3.5 мг в сравнении с контролем (5.2 мг). В сульфатредуцирующей (K1_SO_4) и железоредуцирующей культуре (K1_Fe) содержание алкановой фракции уменьшилось на 17–20%. В культурах из глубинного осадка (K2) максимальная конверсия н-алканов (48%) отмечена в среде с Fe^{3+} . В присутствии других акцепторов электронов (HCO_3^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) биодегградация н-алканов составляла 27–29% (рис. 2а, 2б).

Дегградация ПАУ (55–65%) была сопоставима в накопительных культурах K1 и K2 (рис. 2в, 2г). Наибольшая конверсия полициклических ароматических углеводородов (64–65%) зафиксирована в культурах K1_NO_3 и K2_HCO_3 , где отмечено снижение $\Sigma_{\text{ПАУ}}$ с 0.4 мг в контроле до 0.14–0.15 мг в эксперименте. Среди индивидуальных полициклических углеводородов наибольшая степень конверсии (55–79%) отмечена для нафталина, 1-метилнафталина, 2-метилнафталина, флуорена, антрацена, бензо[а]антрацена, бензо[б]флуорена, бензо[к]флуорена, бензо[а]пирена и бензо[ghi]перилена в культурах K1 и K2, вне зависимости от присутствующих в среде акцепторов электронов. Наименьшей дегградации (1–14%) подверглись 1-метилфенантрен, 9-метилфенантрен, пирен и бензо[е]пирен в накопительных культурах K1. Добавление нитрат-иона увеличивало степень конверсии до 25%. В культурах K2 дегградация этих соединений составила 12–29%.

В накопительной культуре K1_HCO_3 выявлено образование метана. Концентрация метана

в начале эксперимента составляла 0.04 мг/л осадка. Через двенадцать месяцев культивирования содержание метана увеличилось до 37.9 мг/л. К концу эксперимента концентрация CH_4 составляла 27.2 мг/л (рис. 3а). В накопительных культурах K2_HCO_3 концентрация метана в течение всего эксперимента оставалась практически неизменной (0.02–0.05 мг/л осадка), что свидетельствует об отсутствии метаногенеза (рис. 3б).

Образование этана выявлено в накопительных культурах как с подповерхностным, так и с глубинным осадком (рис. 3). В культуре K1_HCO_3 через 6 мес. культивирования концентрация C_2H_6 увеличилась в 7 раз в сравнении с исходной (0.002 мг/л осадка) и составила 0.014 мг/л осадка. К концу эксперимента содержание этана снизилось до 0.003 мг/л. В культуре K2_HCO_3 концентрация этана увеличилась в 2 раза. Максимальное его содержание (0.02 мг/л осадка) зафиксировано по истечении 6 мес. от начала эксперимента. К концу эксперимента концентрация этана в накопительных культурах K1_HCO_3 и K2_HCO_3 составляла 0.003–0.01 мг/л осадка соответственно.

Филогенетическое разнообразие микробного сообщества подповерхностного осадка и накопительных культур K1. В составе микробного сообществ донного осадка с глубины 30–50 см были обнаружены представители 41 филума домена *Bacteria* и 10 филумов домена *Archaea*, среди которых только 17 и 6 филумов, соответственно, включали более 1% последовательностей в составе библиотек. В сообществе доминировали бактерии филумов *Chloroflexota*, *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Nitrospirota*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota* и *Desulfobacterota* (рис. 4а).

Культивирование подповерхностного осадка в присутствии разных акцепторов электронов привело к увеличению доли представителей некоторых таксонов, в частности, *Bacillota* и *Pseudomonadota* (рис. 4а). В контрольном осадке доля представителей *Bacillota* составляла 0.3%

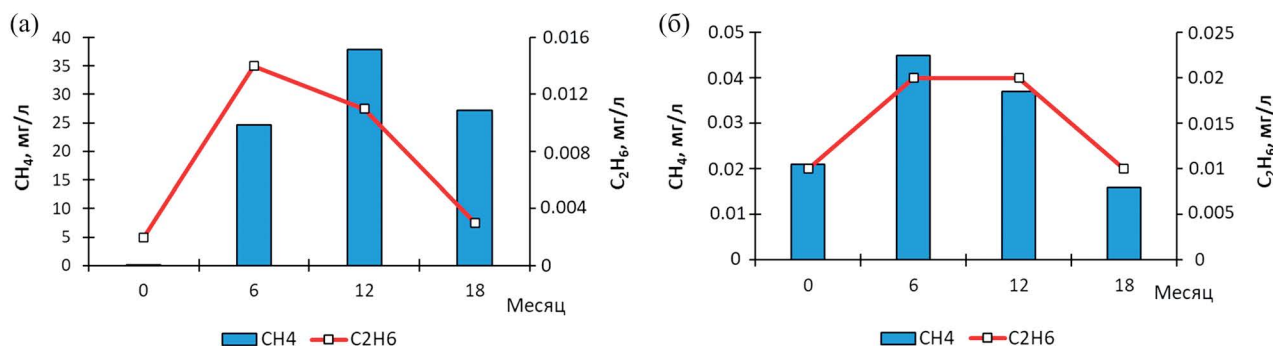


Рис. 3. Динамика образования метана и этана в накопительных культурах, содержащих подповерхностные (а) и глубинные (б) осадки, обогащенных гидрокарбонат-ионом.

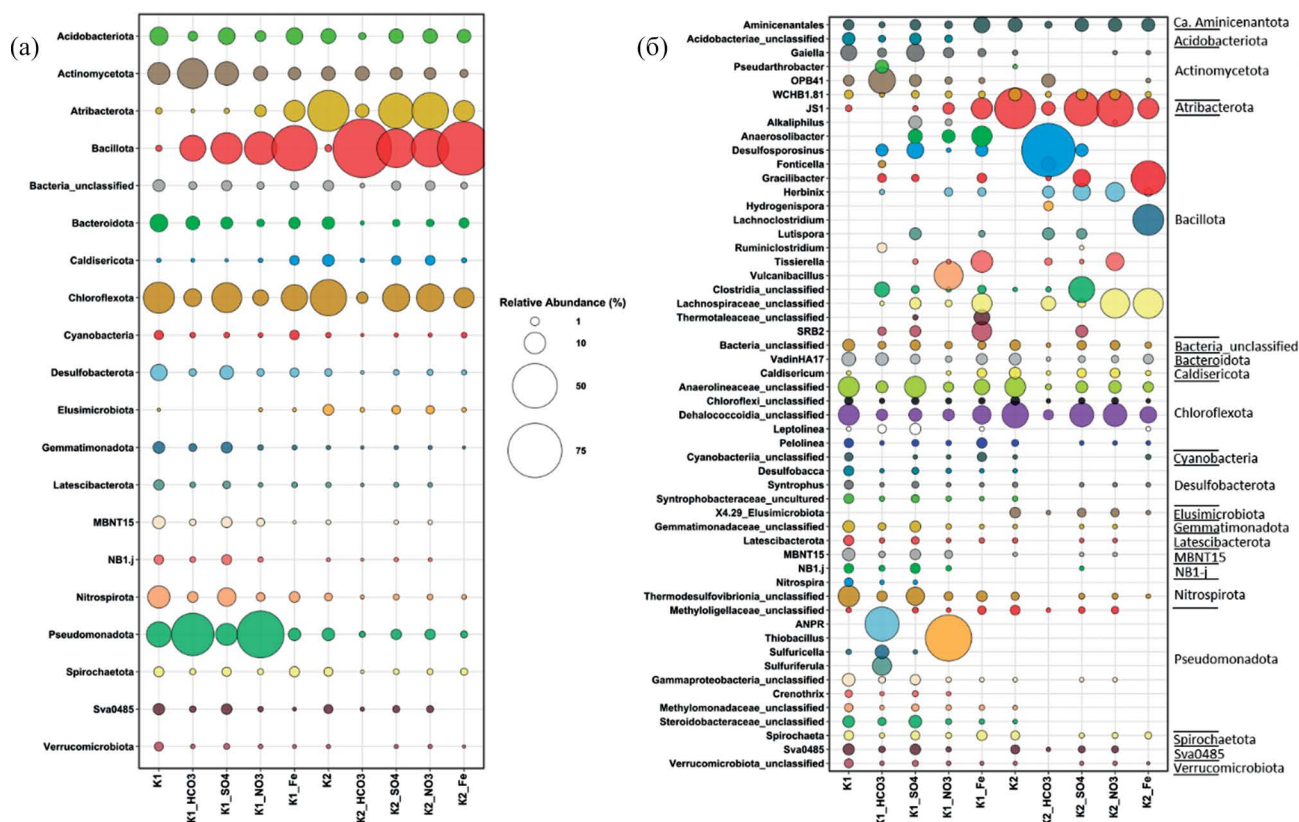


Рис. 4. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Bacteria*, представленных на уровне филумов (а) и родов (б) в библиотеках из донных осадков и накопительных культур. Перечислены таксоны, составляющие >1% хотя бы в одной из библиотек.

от всех последовательностей гена 16S рРНК, филум представлен не идентифицированными родами семейства *Clostridiaceae*. В культуре K1_HCO₃ доля *Bacillota* увеличивалась до 15.3%. Доминирующее положение в ней занимали представители родов *Desulfosporosinus* (2.5%), *Gracilibacter* (1%), *Ruminiclostridium* (1.4%) и неидентифицированные *Clostridia* (4.4%) (рис. 4б). В культуре K1_SO₄ доля бактерий рода *Desulfosporosinus* возрастала до 5.8% в сравнении с K1_HCO₃. В числе доминирующих ОТЕ выявлены последовательности бактерий родов *Anaerosolibacter* (3.6%), *Alkaliphilus* (3%), *Lutispora* (2.4%), неклассифицируемых бактерий семейства *Lachnospiraceae* (2.2%) и SRB2 (2%). В культуре K1_Fe доля *Bacillota* составляла 51.5% и была самой большой в сравнении с другими культурами K1. Наряду с последовательностями *Anaerosolibacter* и *Desulfosporosinus* выявлены последовательности бродильных бактерий рода *Tissierella* и неидентифицированных *Lachnospiraceae*. Бактерии рода *Anaerosolibacter* способны осуществлять анаэробное дыхание, восстанавливая трехвалентное железо, сульфат, тиосульфат и элементную серу за счет окисления органических соединений (Hong et al.,

2015). Сульфатвосстанавливающие бактерии рода *Desulfosporosinus* используют углеводы, короткоцепочечные жирные кислоты и ароматические соединения, способны расти хемолитотрофно, окисляя водород (Spring, Rosenzweig, 2006). Бактерии родов *Gracilibacter*, *Ruminiclostridium*, *Alkaliphilus* и *Lutispora* характеризуются как строго анаэробные хемоорганотрофные термотолерантные микроорганизмы. В культуре K1_NO₃ основную долю (19.5%) составляли последовательности строго анаэробных хемоорганотрофных бактерий рода *Vulcanibacillus*, использующих нитрат в качестве единственного акцептора электронов (L'Haridon et al., 2006).

Филум *Pseudomonadota* в контрольном осадке K1 был представлен неидентифицированными представителями класса *Gammaproteobacteria* и семейств *Methylomonadaceae* и *Steroidobacteraceae*. Культивирование осадка K1 с H₂:CO₂ в газовой фазе привело к увеличению содержания сероокисляющих бактерий родов *Sulfuricella*, *Sulfuriferula* и ANPR. В базе данных рРНК SILVA последовательности, связанные с *Allorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium* и *Rhizobium*, помещены в отдельный род ANPR в пределах семейства *Rhizobiaceae*. Бактерии этого

семейства характеризуются как хемоорганогетеротрофы, способные к биодegradации нефтяных углеводов в почве (Wang et al., 2021). В накопительной культуре K1_NO₃ доля *Pseudomonadota* составляла 56%. Наиболее многочисленная ОТЕ (54%) отнесена к роду *Thiobacillus* и имела 97.2% сходства с геном 16S рРНК хемолитотрофной бактерии *Thiobacillus denitrificans*, сочетающей окисление соединений серы с денитрификацией (Robertson, Kuenen, 2006).

Филумы *Acidobacteriota*, *Actinomycetota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota*, *Nitrospirota* и *Desulfobacterota*, как в контрольном осадке, так и накопительных культурах, были представлены одними и теми же родами бактерий. Наблюдались количественные изменения в составе доминирующих родов в накопительных культурах. Филум *Acidobacteriota* состоял из неидентифицированных представителей семейств *Acidobacteriaceae* и анаэробных, хемоорганогетеротрофных бактерий порядка *Candidatus Aminicenantes* (OP8), которые в настоящее время отнесены к *Candidatus Aminicenantes* (Oren, Goker, 2023). Последовательности *Ca. Aminicenantes* наиболее часто выявляются при анализе обогащенных углеводородами биотопов, включающих нефтяные резервуары, глубоководные морские гидротермальные экосистемы и др. (Kadnikov et al., 2019). ОТЕ из филума *Actinomycetota* в основном принадлежали бактериям группы OPB₄₁ и хемоорганотрофным бактериям рода *Gaiella*. Представители рода *Pseudarthrobacter* (*Actinomycetota*) выявлены только в культуре K1_HCO₃. Филотипы OPB₄₁ были обнаружены в нефтеносных, осадочных и подповерхностных средах. Культивируемые представители группы OPB₄₁ являются анаэробными литотрофами, фиксирующими CO₂ через восстановительный глициновый путь и использующими тиосульфат, элементарную серу, либо Fe(III) в качестве акцепторов электронов (Khomyakova et al., 2022). Для психрофильных бактерий рода *Pseudarthrobacter* показана способность к биодegradации фенолов и других ПАУ (Asimakoula et al., 2023).

Филум *Chloroflexota* состоял из неклассифицируемых представителей семейств *Anaerolineaceae* и *Dehalococcoidaceae*. Микроорганизмы, отнесенные к этим семействам, обнаружены в широком диапазоне анаэробных сред обитания, включая донные отложения, горячие источники, анаэробные реакторы, экотопы, загрязненные углеводородами, где они способны осуществлять синтрофное окисление углеводов (*Anaerolineaceae*) с образованием метана при участии метаногенных архей или восстановительное дехлорирование хлорированных углеводов и галогенорганическое дыхание (*Dehalococcoidia*) (Liang et al., 2015; Löffler et al., 2015). Филум *Bacteroidota* представлен семейством VadinHA17, протеолитическими бактериями, ферментирующими углеводы с образованием летучих

жирных кислот (Kampmann et al., 2012). ОТЕ, отнесенные к филуму *Desulfobacterota*, принадлежали анаэробным бактериям, окисляющим органические субстраты (*Syntrophaceae*, *Syntrophobacteraceae*) или ацетат (*Desulfobacca*) в процессе синтрофного роста с метаногенными археями. Нуклеотидные последовательности бактерий филума *Nitrospirota* составляли от 1 до 11% в анализируемых библиотеках образца K1 и принадлежали неклассифицированным бактериям класса *Thermodesulfobacteria*, известным способностью восстанавливать сульфат до сульфида за счет окисления органических субстратов или водорода (Umezawa et al., 2021).

Архейная компонента контрольного осадка K1 была представлена филумами *Halobacteriota*, *Methanobacteriota*, *Thermoproteota*, *Thermoplasmata*, *Nanoarchaeota* и *Ca. Hadarchaeota* (рис. 5а).

Доминирующее положение в контрольном осадке и в накопительных культурах K1_SO₄, K1_NO₃ и K1_Fe занимали гидрогенотрофные археи рода *Methanoregula* (*Halobacteriota*), где они составляли от 37.8 до 51.7% от состава сообщества, за исключением K1_HCO₃ (3.9%) (рис. 5б). Культивирование осадка K1 с H₂:CO₂ в газовой фазе привело к увеличению доли гидрогенотрофных архей родов *Methanobacterium* (*Methanobacteriota*, ранее *Euryarchaeota*) (20.1%), *Methanosphaerula* (64.7%) и *Methanocella* (2.3%) (*Halobacteriota*) в сравнении с контрольным осадком (до 0.2%). В накопительных культурах K1_SO₄, K1_NO₃ и K1_Fe их доля не превышала 0.3–1.1%. В K1_SO₄ и K1_NO₃ филум *Halobacteriota* был представлен ацетокластическими археями рода *Methanotherix* (7.0–9.5%), метанол, моно-, ди- и триметиламин-использующими археями рода *Methanomethylivorans* (1.3–3.8%) и археями рода *Methanosarcina* (0.4–1.4%), осуществляющими все известные пути метаногенеза. Среди ОТЕ, отнесенных к филуму *Halobacteriota*, также выявлены последовательности, принадлежащие *Ca. Methanoperedens* – археям, осуществляющим анаэробное окисление метана (АОМ) в сочетании с восстановлением нитратов, железа и марганца (Haroony et al., 2013; Cai et al., 2018; Leu et al., 2020). Их представленность была наибольшей в накопительной культуре K1_Fe – 5.2%, наименьшей в K1_HCO₃ – 0.2%.

Филум *Thermoproteota* (ранее *Crenarchaeota*) представлен классами *Bathyarchaeia*, *Nitrososphaeria* (род *Nitrosopumilus*) и неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei*. Наибольшая доля *Bathyarchaeia* выявлена в культуре K1_Fe – 32.7%, наименьшая в K1_HCO₃ – 2.8%. В контрольном осадке, K1_SO₄ и K1_NO₃ их доля варьировала от 17.1 до 21.9%. На основе анализа геномов, космополитным археям *Bathyarchaeia* предсказана способность осуществлять ацетогенез, метаногенез и брожение (Zhou et al., 2018; Hou et al., 2023). Анализ фенотипических и геномных свойств первого

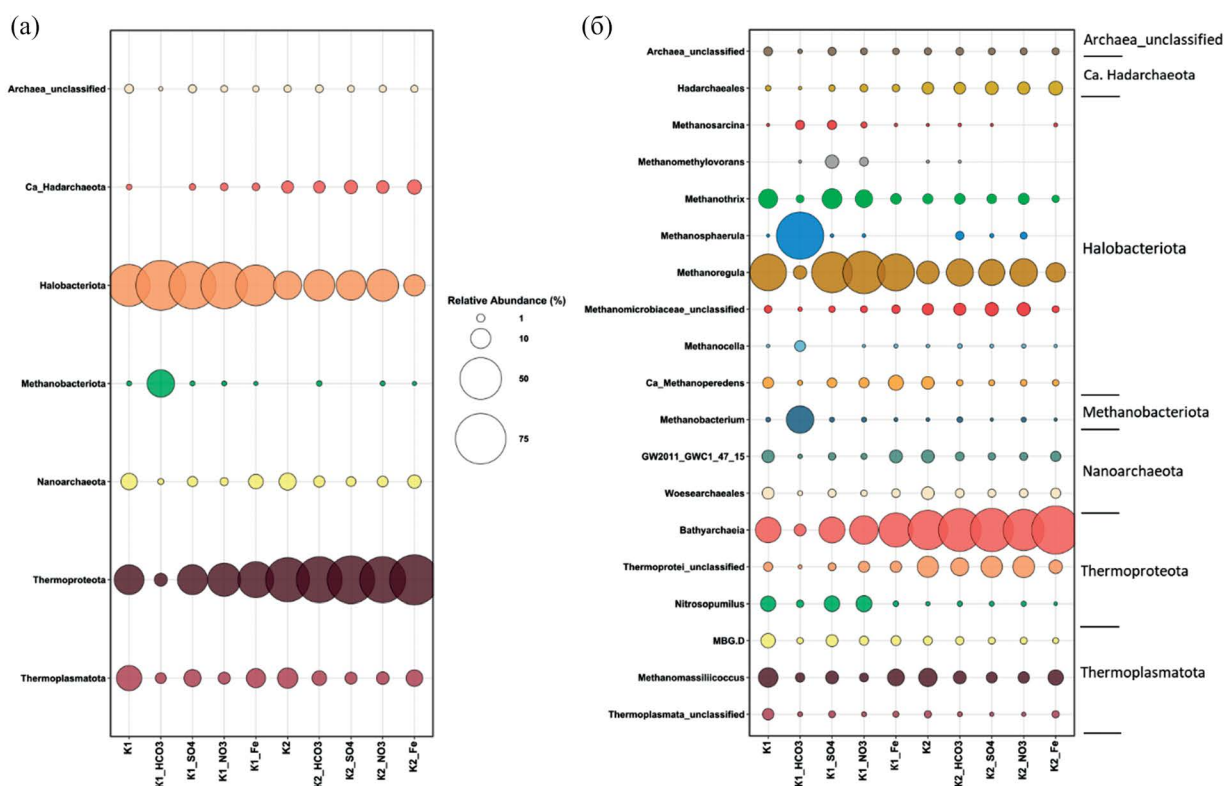


Рис. 5. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК *Archaea*, представленных на уровне филумов (а) и родов (б) в библиотеках из донных осадков и накопительных культур. Перечислены таксоны, составляющие >1% хотя бы в одной из библиотек.

культивируемого штамма M17C^{Ts}, отнесенного к *Candidatus Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., показал его способность к использованию сложных белковых субстратов и метоксилированных ароматических соединений (Khomyakova et al., 2023). В накопительных культурах K1_SO₄ и K1_NO₃ выявлена наибольшая доля (5.5–5.9%) последовательностей архей рода *Nitrosopumilus*, окисляющих аммиак и осуществляющих автотрофную фиксацию углерода через 3-гидроксипропионат/4-гидроксипропионатный путь (Liu et al., 2021).

Филум *Thermoplasmatota* был представлен археями рода *Methanomassiliicoccus* и Marine Benthic Group D (MBG-D), восстанавливающих метанол и окисляющих водород, характеризующихся как космополиты донных осадков, со специфическим миксотрофным метаболизмом, включающим гетеротрофию и автотрофную фиксацию CO₂ (Zhou et al., 2019). Наибольшая доля *Methanomassiliicoccus* выявлена в K1 (9.4%), K1_SO₄ (3.5%) и K1_Fe (6.7%); MBG-D – в K1_SO₄ (2.9%). Филум *Nanoarchaeota* состоял, в основном, из ОТЕ, отнесенных к семействам GW2011_GWC1_47_15 и *Woesearchaeales* – археям, выявленным в различных

средах обитания, среди которых нефтяные резервуары и серные источники. Эти археи являются частью консорциума с бактериями, где бактерии участвуют в круговороте углерода, а археи – в фиксации азота, денитрификации и восстановлении сульфата в анаэробных условиях (Liu et al., 2021; Köhler et al., 2023). Их наибольшая доля выявлена в K1 (6.4%), наименьшая – в K1_HCO₃ – 0.4%.

Филогенетическое разнообразие микробного сообщества глубинного осадка и накопительных культур K2. В составе микробного сообществ донного осадка с глубины ядра 250 см обнаружены представители 27 филумов домена *Bacteria* и 10 филумов домена *Archaea*. Последовательности архей, составляющие более 1% в составе библиотек, выявлены в 11 высших таксонах домена *Bacteria* и 5 филумах *Archaea* (рис. 4, 5). Доминирующее положение занимали представители филумов *Atribacterota* (41.5%) и *Chloroflexota* (32%). Около 2.2–3.6% последовательностей принадлежало представителям *Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Caldiseriicota*, *Bacteroidota* и *Pseudomonadota*. Доля *Elusimicrobiota*, *Spirochaetota*, Sva0485 и неклассифицируемых *Bacteria* не превышала 1.6%.

Архейная компонента представлена филумами *Thermoproteota*, *Halobacteriota*, *Thermoplasmatota*, *Nanoarchaeota* и *Ca. Hadarchaeota*. Филум *Thermoproteota* представлен классом *Bathyarchaeia* (44%) и неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei* (12%); филум *Halobacteriota* — родом *Methanoregula* (13%), *Ca. Methanoperedens* (3.3%) и родом *Methanosaeta* (2%); филум *Thermoplasmatota* — неидентифицированными *Methanomassiliicoccaceae* (8%) и MBG-D (1.3%). Последовательности филума *Ca. Hadarchaeota* составляли 2.8–4.3% от общего числа последовательностей в каждой из библиотек K2, в сравнении с библиотеками из образцов K1, где доля этих архей не превышала 0.8%.

Несмотря на различные условия культивирования, накопительные культуры K2, содержащие сульфат- и нитрат-ионы, не отличались значительно по составу бактерий, варьировало соотношение микроорганизмов различных таксономических групп. Общими для этих накопительных культур были последовательности бактерий порядка *Aminicenantales* (*Acidobacteriota*), группы WCHB1-81 (*Actinomycetota*) и рода *Caldisericum* (*Caldisericotota*). В трех накопительных культурах (K2_HCO₃, K2_SO₄, K2_NO₃) присутствовали *Atribacterota* (3.1–32%); неидентифицированные представители филума *Chloroflexota*, семейств *Dehalococcoidiaceae* и *Anaerolineaceae* (1.65–13.5%) и филума *Bacillota*, род *Herbinix* (6.2–27.4%). Представители группы OPB₄₁ (*Actinomycetota*) и рода *Fonticella* (*Bacillota*) выявлены только в культуре K2_HCO₃, а неклассифицируемые бактерии семейства *Clostridiaceae*, рода *Gracilibacter* и группы SRB₂ — только в культурах K2_SO₄ и K2_Fe. Последовательности бактерий родов *Desulfosporosinus* (2.8–74.5%) и *Lutispora* (1.8–2.3%), обнаружены в библиотеках накопительных культур K2_SO₄ и K2_HCO₃. В накопительных культурах, содержащих железо, доминирующее положение занимали представители родов *Gracilibacter*, *Lachnoclostridium* и неклассифицированные *Lachnospiraceae*. Как и в случае с бактериальной компонентой, культивирование осадка K2 в присутствии различных акцепторов электронов незначительно повлияло на состав архей в накопительных культурах в сравнении с природным осадком. Варьировала доля представителей различных таксонов. Доминирующее положение в библиотеках всех четырех накопительных культур занимали последовательности представителей класса *Bathyarchaeia*, которые составляли 48.5–67.7% от общего количества прочтений в каждой библиотеке. Филум *Thermoproteota* также был представлен неклассифицируемыми представителями класса *Thermoprotei* (8–12.4%). Метаногенные археи были представлены родами *Methanoregula*, *Methanosaeta*, *Methanomassiliicoccus* и неклассифицируемыми

представителями семейства *Methanomicrobiaceae*. Последовательности *Woesearchaeales* и MBG-D составляли 0.62–1.4% в K2 библиотеках.

Анализ потенциальных функциональных характеристик микробных сообществ с использованием базы данных KEGG (рис. S2) показал, что, бактерии, входящие в сообщество подповерхностного донного осадка K1, обладали потенциальной способностью осуществлять основные пути метаболизма углеводов, липидов и энергетического метаболизма, а также деградацию бифенола, стероидов, толуола, этилбензола и аминокислот. Изменение условий, в частности, культивирование микробного сообщества в присутствии H₂: CO₂, привело к экспрессии генов, участвующих в метаболизме серы и азота, а также ответственных за деградацию ПАУ, ксенобиотиков, стирола, солей бензойной кислоты, нафталина и хлорированных углеводородов, в дополнение к функциональным характеристикам, приведенным выше. У архей, входящих в исследуемое сообщество, предсказано наличие ферментов метаболизма метана, фиксации углерода, цикла азота и серы, деградации стеранов, ксилола, ксенобиотиков, толуола, хлоралканов, нафталина, хлорциклогексана, хлорбензола и фторбензоата. Бактерии из глубинного осадка K2 характеризовались, в основном, присутствием генов “домашнего хозяйства” и отсутствием потенциальной способности деградировать углеводороды. Для архей предсказаны функции деградации бензоата, этилбензола, бутирата. Потенциальная способность осуществлять деградацию ксилола, диоксинов, хлоралканов, хлоралкенов и нитротолуола выявлена у бактерий, культивируемых в присутствии H₂: CO₂ (рис. S2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Состав нефти в водной толще и донных осадках исследуемого района указывает на ее биотрансформацию и может быть обусловлен деятельностью микробных сообществ. Об этом свидетельствуют результаты культуральных исследований, показавших биodeградацию компонентов нефти 35% (для n-алканов) и 65% (для ПАУ) анаэробными углеводородоокисляющими сообществами, а также молекулярно-экологический анализ филогенетического и функционального разнообразия микробных сообществ. В подповерхностном осадке K1 доминирующее положение занимали микроорганизмы, способные хемогетеротрофно использовать различные соединения посредством аэробного и анаэробного дыхания (*Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Nitrospirota*, Sva0485, MBNT15), анаэробно окислять метан (*Methylomonadaceae*, *Ca. Methanoperedens*), а также синтрофно окислять углеводороды нефти (бактерии филумов *Bacillota*,

Chloroflexiota, *Desulfobacterota*, *Bacteroidota* и археи *Halobacteriota* и *Methanobacteriota*). Культивирование подповерхностного осадка в различных условиях приводило к увеличению доли бактерий некоторых таксонов, в частности, *Bacillota*, *Pseudomonadota* и *Actinomycetota* в составе накопительных культур. Исследуемый керн К1 имел повышенную минерализацию за счет гидрокарбонат-, сульфат-, нитрат-ионов и ионов хлора (рис. S1). Компонентный состав поровых вод исследуемого керна, вероятно, нивелировал действие добавленных акцепторов электронов в накопительные культуры, что выражалось в доминировании микроорганизмов, сочетающих окисление соединений серы с денитрификацией (*Thiobacillus denitrificans*) в культурах, содержащих нитрат-ион, или доминирование восстанавливающих соединения азота микроорганизмов в культурах, содержащих сульфат-ион или железо. Об этом свидетельствует обнаружение *Ca. Methanoperedens* — архей, первоначально описанных, как анаэробно окисляющие метан в сочетании с восстановлением нитрата (Haroony et al., 2013). В настоящее время показано, что в геномах этих архей присутствуют гены, кодирующие путь “обратного метаногенеза”, мультигеновые цитохромы C-типа, которые, как предполагается, способствуют диссимиляционному восстановлению Fe(III), а также гены для окисления водорода и восстановления сульфата при синтрофном взаимодействии с *Desulfobacterota* (Cai et al., 2018; Bell et al., 2022).

Несмотря на то, что бактерии глубинного осадка К2 характеризовались отсутствием потенциальной способности деградировать углеводороды, сырая нефть, добавленная в накопительные культуры, подвергалась биodeградации, о чем свидетельствует убыль n-алканов и ПАУ. Значимое влияние на биodeградацию n-алканов имело только добавление Fe^{3+} . В накопительных культурах, содержащих H_2 : CO_2 , SO_4^{2-} и NO_3^- , степень конверсии n-алканов была одинаковой, так же как и состав микробных сообществ, отличающийся незначительным варьированием процентного содержания микроорганизмов различных систематических групп. В глубинном осадке конверсия углеводородов, вероятно, может проходить при участии представителей филумов *Bacillota*, *Atribacterota*, *Chloroflexota* и класса *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*). В настоящее время, на основе метаболической реконструкции геномов *Atribacterota* и *Bathyarchaeia* показано, что микроорганизмы могут осуществлять не только ферментацию углеводов, но и окислять короткоцепочечные n-алканы и ароматические соединения до жирных кислот, которые затем потребляются вторичными деструкторами. Окисление n-алканов происходит путем гидроксирования, добавления фумарата к углеводородам, а также деградации анаэробных ароматических соединений с использованием

бензоил-КоА-редуктазы I класса (Dong et al., 2019; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2021). В библиотеках генов 16S рРНК из образца К2 в значимых количествах (1.8–4.3%), выявлены последовательности представителей филумов *Elusimicrobiota* и *Ca. Hadarchaeota*, которые обычно составляют менее 1% в составе микробных сообществ и являются представителями “редкой биосферы” или “микробной темной материи” (Pascoal et al., 2021). На основании реконструкции геномов этих прокариот показано, что бактерии обладают ферментативным метаболизмом, магнитотаксисом и участвуют в круговороте железа и серы, в то время как археи являются автотрофами, способными осуществлять фиксацию углерода через восстановительный ацетил-КоА путь, метаногенез и метаболизм алканов (Hua et al., 2019; Wang et al., 2019; Uzun et al., 2023). Термофильные облигатные анаэробные гетеротрофы филума *Caldisericota*, восстанавливающие соединения серы, также входили в число доминирующих таксонов в глубинных осадках. В настоящее время последовательности бактерий этого филума выявляются при анализе гидротермальных экосистем, водоносных горизонтов, загрязненных углеводородами, содовых озер, биореакторов и т.д. (Mori et al., 2009).

Биodeградация нефти накопительными культурами сопровождалась образованием метана в значимых количествах ($37.9 \text{ мг/л CH}_4 = 2.37 \text{ ммоль/л CH}_4 = 54 \text{ мл/л CH}_4$), что было сравнимо с диапазоном концентрации метана в донных осадках оз. Байкал (от нескольких мкл/л до 20 мл/л) (Pogodaeva et al., 2017). Образование метана при биodeградации нефти показано во многих нефтяных резервуарах (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Назина и соавт., 2006; Jones et al., 2008). Расширение геохимической базы данных о газах и нефтях из неглубоких нефтяных скоплений и естественных нефтепроявлений привело к признанию того, что газы, ранее считавшиеся имеющими первичное микробное происхождение, на самом деле образовались из нефти в ходе вторичного метаногенеза (Milkov, 2011).

Схожие процессы образования углеводородных газов происходят и в донных осадках озера Байкал, где в настоящее время установлено более 60 участков, содержащих газогидраты, расположенных в южной и центральной котловине озера (Khlystov et al., 2022). Газ, образующийся в донных осадках озера Байкал, на основе характеристик молекулярного и изотопного состава, отнесен к трем основным типам: термогенный газ, образуемый из сырой нефти, в некоторых случаях сопровождаемый вторичным микробным газом; термогенный газ, поднимающийся из глубоких осадочных слоев через разломы, смешанный с микробным газом в неглубоких слоях; микробный газ, образовавшийся в неглубоких осадочных слоях. Из 60 участков в 21 выявлены газогидраты, содержащие

микробный этан (Nachikubo et al., 2023). На эмпирической диаграмме, основанной на классификации Милкова и Этиопа (Milkov, Etiopa, 2018), газ из района Бол. Зеленовская имеет $\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_1}$ — 45‰ и $\delta^2\text{H}_{\text{C}_1}$ — 308‰ и находится за пределами термогенной зоны с соотношением $\text{C}_1/(\text{C}_2 + \text{C}_3)$ равным 274 и небольшим содержанием C_2 и C_3 , что указывает на влияние вторичного микробного газа, который образуется при анаэробной биodeградации более тяжелых углеводородов (Nachikubo et al., 2023).

Образование углеводородных газов в экспериментальных условиях установлено не только для осадков из районов нефтепроявлений (Pavlova et al., 2022). В накопительных культурах, содержащих микробное сообщество донных осадков метанового сипа Посольская Банка (Средний Байкал), доля образовавшегося этана в пересчете на углеводородные газы составляла от 1.5 до 26.8% (Павлова и соавт., 2014). Экспериментально доказано образование вторично-микробного газа при разложении углей Танхойской свиты олигоцен-плиоценового возраста, находящихся вдоль южного берега озера Байкал и погружающихся под его Южную котловину, в которой обнаружено несколько зон разгрузки углеводородных флюидов (Крылов и соавт., 2023).

Таким образом, микробное сообщество донных осадков, функционирующее в анаэробных условиях в длительно существующем районе нефтепроявления Бол. Зеленовская, является важным звеном в процессах самоочищения озера от нефтяного “загрязнения”. Микробное сообщество донных осадков представлено бактериями и археями, специализирующимися на процессах разложения широкого спектра субстратов, включая углеводы, пептиды, жирные кислоты и нефтяные углеводороды. В числе основных участников деградации нефти в донных осадках оз. Байкал могут быть синтрофно окисляющие углеводороды нефти бактерии (*Bacillota*, *Gammaproteobacteria*, *Chloroflexota*, *Actinomyceota*, *Desulfobacterota*) и археи (*Halobacteriota*, *Bathyarchaeia*), входящие в “ядро углеводородоокисляющего микробиома”, сходное по составу с микроорганизмами-деструкторами в нефтяных экосистемах в разных частях мира. Генерация метана и этана при биodeградации нефти в экспериментальных условиях может объяснить нахождение газа из района Бол. Зеленовская за пределами термогенной зоны на эмпирической диаграмме по изотопным данным углерода и водорода (Nachikubo et al., 2023) за счет добавления вторичного микробного газа к термогенному.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках темы госзадания № 0279-2021-0006 (121032300223-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Большаков А. М., Егоров А. В. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометрических исследованиях в акваториях // Океанология. 1987. Т. 27. С. 861–862.
- Крылов А. А., Хлыстов О. М., Семенов П. Б., Сагидуллин А. К., Малышев С. А., Букин С. В., Видищева О. Н., Манаков А. Ю., Исмагилов З. Р. Источники углеводородных газов в грязевом вулкане Кедр, южная котловина озера Байкал: результаты экспериментальных исследований // Литология и полезные ископаемые. 2023. Т. 6. С. 542–553.
- Krylov A. A., Khlystov O. M., Semenov P. B., Sagidullin A. K., Malyshev S. A., Bukin S. V., Vidischeva O. N., Manakov A. Yu., Ismagilov Z. R. Sources of hydrocarbon gases in the Kedr mud volcano, Southern Basin of Lake Baikal: results of experimental studies // Lithol. Miner. Resour. (Moscow). 2023. V. 58. P. 534–543.
- Назина Т. Н., Шестакова Н. М., Григорьян А. А., Михайлова Е. М., Турова Т. П., Полтараус А. Б., Фен Ц., Ни Ф., Беляев С. С. Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 70–81.
- Nazina T. N., Shestakova N. M., Grigor'yan A. A., Mikhailova E. M., Tourova T. P., Poltaraus A. B., Feng C., Ni F., Belyaev S. S. Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang oil field (P. R. China) // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 55–65.
- Павлова О. Н., Ломакина А. В., Горшков А. Г., Суслова М. Ю., Лихошвай А. В., Земская Т. И. Микробные сообщества и их способность окислять n-алканы в районе разгрузки газо-нефте содержащих флюидов в Среднем Байкале (мыс Горевого утес) // Изв. РАН. Сер. биол. 2012. С. 540–545.
- Pavlova O. N., Lomakina A. V., Gorshkov A. G., Suslova M. Yu., Likhoshvai A. V., Zemskaya T. I. Microbial communities and their ability to oxidize n-alkanes in the area of release of gas- and oil-containing fluids in Mid-Baikal (Cape Gorevoi Utes) // Biol. Bull. (Moscow). 2012. V. 39. P. 458–463.

- Павлова О.Н., Букин С.В., Ломакина А.В., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Морозов И.В., Погодаева Т.В., Пименов Н.В., Земская Т.И. Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков оз. Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 694–702.
- Pavlova O.N., Bukin S.V., Lomakina A.V., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Morozov I.V., Pogodaeva T.V., Pimenov N.V., Zemskaya T.I. Production of gaseous hydrocarbons by microbial communities of Lake Baikal bottom sediments // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 798–804.
- Практикум по микробиологии. Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр “Академия”, 2005. С. 577–578.
- Хлыстов О.М., Горшков А.Г., Егоров А.В., Земская Т.И., Гранин Н.Г., Калмычков Г.В., Воробьева С.С., Павлова О.Н., Якуп М.А., Макаров М.М., Москвин В.И., Грачев М.А. Нефть в озере мирового наследия // ДАН. 2007. Т. 414. С. 656–659.
- Khlystov O.M., Gorshkov A.G., Egorov A.V., Zemskaya T.I., Granin N.G., Kalmychkov G.V., Vorob'eva S.S., Pavlova O.N., Yakup M.A., Makarov M.M., Moskvina V.I., Grachev M.A. Oil in the Lake of world heritage // Dokl. Earth Sci. (Moscow). 2007. V. 45. P. 682–685.
- Хлыстов О.М., Изосимова О.Н., Hachikubo A., Minami H., Макаров М.М., Горшков А.Г. Новый нефтегазовый сип озера Байкал // Нефтехимия. 2022. Т. 62. С. 328–335.
- Khlystov O.M., Izosimova O.N., Hachikubo A., Minami H., Makarov M.M., Gorshkov A.G. A new oil and gas seep in Lake Baikal // Pet. Chem. (Moscow). 2022. V. 62. P. 475–481.
- Asimakoula S., Marinakos O., Tsagogiannis E., Koukoku A.-I. Phenol degradation by *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 524.
- Bell E., Lamminmaki T., Alneberg J., Qian C., Xiong W., Hettich R.L., Fruttschi M., Bernier-Latmani R. Active anaerobic methane oxidation and sulfur disproportionation in the deep terrestrial subsurface // ISME J. 2022. V. 16. P. 1583–1593.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu. P., Perov A.N., Mirzabekov A.D., Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon C. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 6143–6151.
- Cai C., Leu A.O., Xie G.J., Guo J., Feng Y., Zhao J.-X., Tyson G.W., Yuan Z., Hu S.A. methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction // ISME J. 2018. V. 2. P.1929–1939.
- Dong X.Y., Greening C., Rattray J.E., Chakraborty A., Chuvochina M., Mayumi D., Dolfig J., Li C., Brooks J.M., Bernard B.B., Groves R.A., Lewis I.A., Hubert C.R.J. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments // Nat. Commun. 2019. V. 10. Art. 1816.
- Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J.R., Yurgel S.N., Brown J.R., Taylor C.M., Huttenhower C., Langille M.G.I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions // Nat. Biotechnol. 2020. V. 38. P. 685–688.
- Gittins D.A., Bhatnagar S., Hubert C.R.J. Environmental selection and biogeography shape the microbiome of subsurface petroleum reservoirs // MSystems. 2023. V. 8. Art. e00884-22.
- Hachikubo A., Minami H., Sakagami H., Yamashita S., Krylov A., Kalmychkov G., Poort J., Batist M., Manakov A., Khlystov O. Characteristics and varieties of gases enclathrated in natural gas hydrates retrieved at Lake Baikal // Sci. Rep. 2023. V. 13. Art. 4440.
- Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // Nature. 2013. V. 500. P. 567–570.
- Hidalgo K.J., Sierra-Garcia I.N., Zafra G., de Oliveira V.M. Genome-resolved meta-analysis of the microbiome in oil reservoirs worldwide // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 1812.
- Hong H., Kim S.J., Min U.G., Lee Y.J., Kim S.G., Roh S.W., Kim J.G., Na J.G., Rhee S.K. Anaerobacter carboniphilus gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic iron-reducing bacterium isolated from coal-contaminated soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 1480–1485.
- Hou J., Wang Y., Zhu P., Yang N., Liang L., Yu T., Niu M., Konhauser K., Woodcroft B.J., Wang F. Taxonomic and carbon metabolic diversification of *Bathymicrobia* during its coevolution history with early Earth surface environment // Sci. Adv. 2023. V. 9. Art. eadf5069.
- Hua Z.-S., Wang Y.-L., Evans P.N., Qu Y.-N., Goh K.M., Rao Y.-Z., Qi Y.-L., Li Y.-X., Huang M.-J., Jiao J.-Y., Chen Y.-T., Mao Y.-P., Shu W.-S., Hozzein W., Hedlund B.P., Tyson G.W., Zhang T., Li W.-J. Insights into the ecological roles and evolution of methyl-coenzyme M reductase-containing hot spring *Archaea* // Nat. Commun. 2019. V. 10. Art. 4574.
- Jones D.M., Head I.M., Gray N.D., Adams J.J., Rowan A.K., Aitken C.M., Bennett B., Huang H., Brown A., Bowler B.F.J., Oldenburg T., Erdmann M., Larter S.R. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs // Nature. 2008. V. 451. P. 176–180.
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Genome of the candidate phylum *Aminicenantes* bacterium from a deep subsurface thermal aquifer revealed its fermentative saccharolytic lifestyle // Extremophiles. 2019. V. 23. P. 189–200.
- Kampmann K., Ratering S., Kramer I., Schmidt M., Zerr W., Schnell S. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 2106–2119.
- Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 27–30.

- Khlystov O.M., Batist M., Minami H., Hachikubo A., Khabuev A.V., Kazakov A.V. The position of gas hydrates in the sedimentary strata and in the geological structure of Lake Baikal // World atlas of submarine gas hydrates in continental margins / Eds. J. Mienert, C. Berndt, A.M. Tréhu, A. Camerlenghi, C.S. Liu. Cham: Springer, 2022. P. 465–515.
- Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhtereva V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 1047580.
- Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Mamiy D.D., Klyukina A.A., Slobodkin A.I. Phenotypic and genomic characterization of *Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., a cultivated representative of the archaeal class *Bathyarchaeia* // Front. Microbiol. 2023. V. 14. Art. 1214631.
- Köhler J.M., Ehrhardt L., Günther P.M. Archaeal and extremophilic bacteria from different archaeological excavation sites // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Art. 5519.
- Leu A.O., Cai C., McIlroy S.J., Southam G., Orphan V.J., Yuan Z., Hu S., Tyson G.W. Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the *Methanoperedenaceae* // ISME J. 2020. V. 14. P. 1030–1041.
- L'Haridon S., Miroshnichenko M.L., Kostrikina N.A., Tindall B.J., Spring S., Schumann P., Stackebrandt E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Jeanthon C. *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 1047–1053.
- Liang B., Wang L.-Y., Mbadinga S.M., Liu J.-F., Yang S.-Z., Gu J.-D., Mu B.-Z. *Anaerolineaceae* and *Methanosaeata* turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation // AMB Express. 2015. V. 5. Art. 37.
- Liu Y.F., Qi Z.Z., Shou L.B., Liu J.-F., Yang S.-Z., Gu J.-D., Mu B.-Z. Anaerobic hydrocarbon degradation in candidate phylum 'Atribacteria' (JS1) inferred from genomics // ISME J. 2019. V. 13. P. 2377–2390.
- Liu L., Schubert D.M., Könneke M., Berg I.A. (S)-3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from the autotrophic 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle in *Nitrosopumilus maritimus* // Front. Microbiol. 2021. V. 5. Art. 712030.
- Liu X., Wang Y., Gu J.-D. Ecological distribution and potential roles of *Woesearchaeota* in anaerobic biogeochemical cycling unveiled by genomic analysis // CSB J. 2021. V. 19. P. 794–800.
- Löffler F.E., Yan J., Ritalahti K.M., Adrian L., Edwards E.A., Konstantinidis K.T., Müller J.A., Fullerton H., Zinder S.H., Spormann A.M. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 625–635.
- Lomakina A., Bukin S., Shubenkova O., Pogodaeva T., Ivanov V., Bukin Y., Zemskaya T. Microbial communities in ferromanganese sediments from the Northern Basin of Lake Baikal (Russia) // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 1865.
- Milkov A.V. Worldwide distribution and significance of secondary microbial methane formed during petroleum biodegradation in conventional reservoirs // Org. Geochem. 2011. V. 42. P. 184–207.
- Milkov A.V., Etiope G. Revised genetic diagrams for natural gases based on a global dataset of >20,000 samples // Org. Geochem. 2018. V. 125. P. 109–120.
- Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y., Urabe T., Suzuki K. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia classis* nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 2894–2898.
- Oren A., Goker M. *Candidatus* List. Lists of names of prokaryotic *Candidatus* phyla // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2023. V. 73. № 5.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005821>
- Pascoal F., Costa R., Magalhães C. The microbial rare biosphere: current concepts, methods and ecological principles // FEMS Microbiol. Ecol. V. 97. Art. fiae227.
- Pavlova O.N., Izosimova O.N., Chernitsyna S.M., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Khabuev A.V., Gorshkov A.G., Zemskaya T.I. Anaerobic oxidation of petroleum hydrocarbons in enrichment cultures from sediments of the Gorevoy Utes natural oil seep under methanogenic and sulfate-reducing conditions // Microb. Ecol. 2022. V. 83. P. 899–915.
- Pogodaeva T.V., Lopatina I.N., Khlystov O.M., Egorov A.V., Zemskaya T.I. Background composition of pore waters in Lake Baikal bottom sediments // J. Great Lakes Res. 2017. V. 43. P. 1030–1043.
- Robertson L.A., Kuenen J.G. The Genus *Thiobacillus*. The Prokaryotes / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. NY: Springer, 2006. P. 812–827.
- Sahm K., John P., Nacke H., Wemheuer B., Grote R., Daniel R., Antranikian G. High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods // Extremophiles. 2013. V. 17. P. 649–662.
- Sierra-Garcia I.N., Dellagnezze B.M., Santos V.P., Chaves M.R., Capilla R., Neto E.V.S., Gray N., de Oliveira V.M. Microbial diversity in degraded and non-degraded petroleum samples and comparison across oil reservoirs at local and global scales // Extremophiles. 2017. V. 21. P. 211–229.
- Slobodkin A., Wiegel J. Fe(III) as an electron acceptor for H₂ oxidation in thermophilic anaerobic enrichment

- cultures from geothermal areas // *Extremophiles*. 1997. V. 1. P. 106–109.
- Spring S., Rosenzweig F. The Genera *Desulfotobacterium* and *Desulfosporosinus*: Taxonomy // *The Prokaryotes* / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. NY: Springer, 2006. P. 771–786.
- Umezawa K., Kojima H., Kato Y., Fukui M. *Dissulfurispira thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic chemolithoautotroph growing by sulfur disproportionation, and proposal of novel taxa in the phylum *Nitrospirota* to reclassify the genus *Thermodesulfobacterium* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2021. V. 44. Art. 126184.
- Uzun M., Koziaeva V., Dziuba M., Alekseeva L., Krutkina M., Sukhacheva M., Baslerov R., Grouzdev D. Recovery and genome reconstruction of novel magnetotactic *Elusimicrobiota* from bog soil // *ISME J.* 2023. V. 17. P. 204–214.
- Wang Y., Wegener G., Hou J., Wang F., Xiao X. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of *Archaea* // *Nature Microbiol.* 2019. V. 4. P. 595–602.
- Wang B., Kuang S., Shao H., Wang L., Wang H. Anaerobic-petroleum degrading bacteria: Diversity and biotechnological applications for improving coastal soil // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. V. 224. Art. 112646.
- Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 89. P. 670–679.
- Zhang K., Hu Z., Zeng F.F., Yang X.Y., Wang J.J., Jing R., Zhang H.N., Li Y.T., Zhang Z. Biodegradation of petroleum hydrocarbons and changes in microbial community structure in sediment under nitrate-, ferric-, sulfate-reducing and methanogenic conditions // *J. Environ. Manag.* 2019. V. 249. Art. 109425.
- Zhang C., Meckenstock R.U., Weng S., Wei G., Hubert C.R.J., Wang J.H., Dong X. Marine sediments harbor diverse archaea and bacteria with potential for anaerobic hydrocarbon degradation via fumarate addition // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2021. V. 97. Art. fiab045.
- Zhou Z., Pan J., Wang F., Gu J.D., Li M. *Bathyarchaeota*: globally distributed metabolic generalists in anoxic environments // *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. V. 42. P. 639–655.
- Zhou Z., Liu Y., Lloyd K.G., Pan J., Yang Y., Gu J.D., Li M. Genomic and transcriptomic insights into the ecology and metabolism of benthic archaeal cosmopolitan, *Thermoproteales* (MBG-D archaea) // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 885–901.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Anaerobic Oxidation of Oil by Microbial Communities of Bottom Sediments of a Natural Oil Seepage Site (Bolshaya Zelenovskaya, Middle Baikal)

O. N. Pavlova¹*, S. V. Bukin¹, O. N. Izosimova¹, S. M. Chernitsyna¹, V. G. Ivanov¹, A. V. Khabuev¹, T. V. Pogodaeva¹, I. S. Elovskaya¹, A. G. Gorshkov¹, and T. I. Zemskaya¹

¹Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, 664033, Russia

*e-mail: pavlova@lin.irk.ru

Abstract. The diversity of microbial communities and potential functional activity in anaerobic processes of oil degradation of bottom sediments was determined in the area of the Bolshaya Zelenovskaya oil seepage site (lake Baikal). When microorganisms of subsurface and deep sediment were cultivated in enrichment cultures containing oil and various electron acceptors for one year at 10°C, the concentration of n-alkanes decreased by 1.2–2 times, and PAHs by 2.2–2.8 times. The conversion of hydrocarbons was accompanied by the generation of hydrocarbon gases (methane, ethane). The microbial community of the subsurface sediment was characterized by greater bacterial diversity than that of the deep sediment and was represented by microorganisms specialized in the decomposition of a wide range of substrates, including petroleum hydrocarbons. The deep layers of sediment were dominated by *Atribacterota*, *Caldiseriicota* and *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*), as well as representatives of the “rare biosphere” *Elusimicrobiota* and *Candidatus* Hadarchaeota. Among the main participants in the degradation of oil in bottom sediments of the lake. Representatives of the phyla *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Chloroflexota*, *Actinomycetota*, *Desulfobacterota*, *Atribacterota*, *Halobacteriota* and *Bathyarchaeia* (*Thermoproteota*) can be classified as Baikal.

Keywords: lake Baikal, bottom sediments, anaerobic oxidation of oil, microbial community, hydrocarbon

УДК 579.222

ДЕГРАДАЦИЯ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ РИЗОСФЕРНЫМ ШТАММОМ *ACHROMOBACTER INSOLITUS* LCU2

© 2024 г. Е. В. Крючкова^{а, *}, Е. С. Морозова^б, В. С. Гринев^{а, с}, Г. Л. Бурегин^{а, с},
Н. Е. Гоголева^{д, е}, Ю. В. Гоголев^{д, ф}

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,
Саратов, 410049, Россия

^бСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

^сСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского,
Саратов, 410012, Россия

^дКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

^еИнститут клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, 460000, Россия

^фКазанский институт биохимии и биофизики Казанского НЦ РАН, Казань, 420008, Россия

*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

Штамм *Achromobacter insolitus* LCU2, изолированный с корней люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), утилизировал коричную кислоту, а также ее метокси-производные — ванилиновую и феруловую кислоты — в качестве единственного источника углерода. Слабый рост был отмечен на м-кумаровой, но не на о- и п-кумаровых кислотах. Рост на коричной кислоте был медленным и диауксичным. Убыль субстрата из среды культивирования составила 53%, деструктивная эффективность — 30 мкг/мг сырой биомассы в течение 14 сут. Несмотря на бактерицидное действие коричной кислоты, культура *A. insolitus* LCU2 длительное время сохраняла жизнеспособность. Геномный анализ позволил выявить два генных кластера *hca* и *mhp*, отвечающих за дигидроксилирование фенильного кольца (*hcaA1A2CDB*) и его последующее расщепление до продуктов центрального метаболизма (*mhpACDE*), а также транскрипционный регулятор (*hcaR*) и предполагаемый транспортер (*hcaT*). Предположительный биохимический путь деградации коричной кислоты штаммом *A. insolitus* LCU2 был предсказан с использованием геномных данных.

Ключевые слова: коричная кислота, диоксигеназа, бактерии-деструкторы, *hca*, *mhp*, *Achromobacter insolitus*

DOI: 10.31857/S0026365624050053

Фенольные кислоты (ФК) — это соединения с химической структурой (C6—C3), синтезируемые в основном растениями, как структурные компоненты предшественников лигнина (Croteau et al., 2000; Kefeli et al., 2003), как защитные молекулы в ответ на биотические факторы, а также как соединения, обеспечивающие сигналинг в растительно-микробных симбиозах (Siqueira et al., 1991; Mandal et al., 2010). В почву ФК попадают с корневыми экссудатами, в процессе разложения растительных остатков, в стоках винодельческих, маслоэкстракционных, целлюлозно-бумажных предприятий (Monisha et al., 2018), в качестве интермедиатов катаболизма полиароматики, например, нафталина (Анохина и соавт., 2020). Коричная кислота (КК) — основной предшественник синтеза растительных

фенольных компонентов (Croteau et al., 2000). Она обладает аллелопатическими свойствами, ингибирует рост бактерий и образование биопленок, а в определенных концентрациях негативно влияет на развитие растений (Ye et al., 2006; Salvador et al., 2013; Rajkumari et al., 2018). Бактериальные штаммы, способные к деградации КК, перспективны не только с точки зрения естественного цикла разложения ароматических компонентов, оздоровления почвы и повышения ее плодородия, но также могут использоваться как модельные объекты, которые преодолевают неспецифическую защиту растений и колонизируют их.

На сегодняшний день описано несколько путей бактериальной трансформации и деградации КК: а) β-окисление трехуглеродного хвоста

с образованием бензоата у *Cupriavidus necator* JMP134 (Perez-Pantoja et al., 2008); б) восстановление двойной связи в трехуглеродном хвосте с последующим гидроксилированием бензольного кольца монооксигеназами до протокатеховой кислоты у *Stenotrophomonas* sp. TRMK2 (Monisha et al., 2018); в) дигидроксилирование бензольного кольца диоксигеназой (ДО) типа Риске с дальнейшим расщеплением кольца у *Escherichia coli* K-12 (Diaz et al., 1998). Лишь диоксигенолитический путь деградации КК описан полностью, указаны все ферменты и биохимические реакции с соответствующими субстратами и продуктами.

Цель данного исследования — изучить возможность утилизации коричной кислоты и ее производных ризосферным штаммом *Achromobacter insolitus* LCu2 и с помощью геномного анализа предсказать биохимический путь деградации КК у исследуемых бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Используемый в работе штамм *A. insolitus* LCu2 выделен с корней люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) и депонирован в двух микробных коллекциях под номерами IBPPM 631 (<http://collection.ibppm.ru/>) и RCAM 04723 (<http://www.arriam.spb.ru/eng/lab10/>).

Рост бактерий на фенольных кислотах. Бактерии культивировали в минеральной среде MS1 (Ермакова и соавт., 2008) с некоторыми модификациями. В качестве источника фосфора использовали 0.5 г/л KH_2PO_4 . Коричную, *o*-, *m*-, *p*-кумаровую, ванилиновую и феруловую кислоты добавляли в автоклавируемую среду (1 атм, 30 мин) в качестве единственного источника углерода (0.5–1.0 г/л), предварительно растворив их в небольшом объеме диметилсульфоксида (ДМСО). Стерилизованный фильтрованием 0.22 мкм раствор витаминов (мг/100 мл): тиамин — 1.0; биотин — 0.2; никотиновая кислота — 2.0; пиридоксамин — 5.0 добавляли в MS1 (2 мл/л); pH среды доводили 1М раствором NaOH до 6.8–7.0.

Для инокулята одну полную петлю бактериальной культуры засеивали в MS1 с яблочной кислотой (0.5 г/л) и выращивали в течение 1 сут. Клетки осаждали при 5000 *g* в течение 10 мин, ресуспендировали свежей средой без источника углерода и вносили в экспериментальные варианты до начальной оптической плотности 0.02 или 0.09 при 420 нм. Бактерии культивировали в колбах, содержащих 50 мл жидкой MS1, на шейкере при 140 об./мин и температуре 35°C.

Для получения адаптированной к КК культуры LCu2 осуществляли серию многократных последовательных пересевов на среды, содержащие КК

(0.5 или 1.0 г/л) в качестве единственного источника углерода.

Контроль ростовых характеристик. Рост бактерий контролировали по изменению оптической плотности (ОП) на спектрофотометре Specol 221 (Германия) при длине волны 420 нм в кювете с длиной оптического пути 0.2 см. Удельную скорость роста (μ) и время генерации (*g*) рассчитывали по формулам:

$$\mu = \lg X_t - \lg X_0 \times 2.303 / (t - t_0),$$

где X_t и X_0 — начальная и конечная плотность культуры в моменты времени *t* и t_0 ;

$$g = 0.693 / \mu.$$

Деструктивную активность (*Q*) культур определяли как отношение потребленной коричной кислоты к сырой биомассе бактерий (мг/г).

Жизнеспособность бактериальных культур. Количество живых клеток в суспензиях определяли, высевая и подсчитывая значения колониеобразующих единиц (КОЕ). 100 мкл бактериальной суспензии добавляли к 900 мкл физраствора, готовили серию разведений от 10^{-1} до 10^{-6} . Из разведений 10^{-5} и 10^{-6} по 200 мкл высевали на плотные среды LB, а также на MS1 с коричной кислотой (0.5 и 1 г/л). Высевы производились в пяти повторностях. Учет КОЕ проводили после 5 сут культивирования на LB и после 14 сут на MS1 с коричной кислотой.

Аналитические методы. Возможную трансформацию ФК определяли методом УФ-спектрометрии на спектрофотометре Specord 250 ("Analytik Jena", Германия). Бактерии осаждали центрифугированием при 5000 *g* в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирали, разбавляли дистиллированной водой (1 : 10) и измеряли спектры в диапазоне от 200 до 400 нм.

Остаточное содержание КК в супернатантах определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Dionex UltiMate 3000 с колонкой C18 и УФ-детектором, при 240 нм. Элюент ацетонитрил– H_2O –уксусная кислота (30 : 69.5 : 0.5, по объему) использовали для анализа. Скорость потока 0.6 мл/мин, объем образца 5 мкл.

Значения pH супернатантов доводили до 7 ед. раствором 0.25 М NaOH; ФК экстрагировали этилацетатом трижды из каждого варианта в пропорции 1 : 1 (200 мкл надосадочной жидкости к 200 мкл этилацетата). Полученные экстракты упаривали, осадки растворяли в ацетонитриле и объединяли. Для построения калибровочного графика 1 мг КК растворяли в 1 мл ДМСО, а затем 500 мкл этого раствора растворяли в 500 мкл дистиллированной воды, получая концентрацию 500 мкг/мл.

Фитотоксичности бактериальных супернатантов. В эксперименте использовали мягкую

яровую пшеницу (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29. Зерновки отбирали, калибровали по размеру, отмывали детергентом 5 мин, затем тщательно промывали проточной водой до исчезновения мыльной пены и замачивали в 0.2% растворе диацита на 15 мин. Стерилизованные семена трижды отмывали стерильной H₂O_d по 15 мин. Семена по 10 шт. выкладывали в чашки Петри на поверхность фильтровальной бумаги, смоченной 5 мл среды для растений Мурасиге–Скуга с добавлением 100 мкл бактериальных супернатантов до конечного содержания коричной кислоты 1 мг на чашку. В каждом варианте было по 30 семян. Измерение длины корня и стебля у проростков производилось на 3 и 5 сут.

Геномный анализ. Геном *A. insolitus* LCu2 аннотирован в NCBI под номером (CP038034). Аминокислотные последовательности ферментов, по литературным данным участвующие в деградации коричной кислоты, были экстрагированы из Uniprot (The UniProt Consortium, 2023) или PDB (Berman et al., 2000) и использованы для поиска гомологов в геноме LCu2 с BLASTP алгоритмом (protein-protein BLAST) (Johnson et al., 2008). Для дальнейшей работы отбирали аминокислотные последовательности, удовлетворяющие следующим критериям: покрытие >80%; E-value <10⁻¹⁰; идентичность >20%, а также имеющие соответствующее геномное окружение. На основании геномного анализа был сконструирован предположительный биохимический путь деградации коричной кислоты штаммом *A. insolitus* LCu2. В качестве референсного использовали диоксигенолитический путь, приведенный для *E. coli* K-12 в KEGG (Kanehisa, Goto, 2000), подтвержденный экспериментальными данными (Diaz et al., 1998).

Статистический анализ данных. Все эксперименты проводили три раза в трех повторностях. Для полученной выборки рассчитывали значения ошибки средней и доверительного интервала, со степенью достоверности $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост *A. insolitus* LCu2 на фенольных кислотах.

На начальном этапе мы протестировали способность *A. insolitus* LCu2 к росту на коричной кислоте (КК) и ее гидроксигированных и метоксилированных производных. Ростовые параметры представлены в табл. 1.

A. insolitus LCu2 рос на КК и на ее окси-производных: феруловой и ванилиновой кислотах. Слабый рост наблюдался на *m*-кумаровой кислоте и полное отсутствие роста — на *o*- и *n*-кумаровых кислотах в течение 96 ч культивирования. В целом, рост культур был медленным, что можно объяснить бактерицидными свойствами фенольных кислот, в частности, КК (Malheiro et al., 2019). Время генерации для растущих культур составило более 12 ч (табл. 1).

Анализ литературы показал, что бактериальные способы трансформации или деградации КК различны и не всегда сопряжены с увеличением биомассы. Отсутствие роста в анаэробных условиях отмечено для *Clostridium glycolicum*, который использовал молекулы КК в качестве акцептора протонов, восстанавливая их до фенилпропионовой кислоты (ФпК) (Chamkha et al., 2001). Штамм *E. coli* K-12, для которого выявлены *hca* и *mhp* генные кластеры диоксигенолитического пути, не мог расти на КК. Для индукции роста *E. coli* K-12 на КК необходимо было предварительное культивирование бактерий на ФпК. Примечательно, что клонирование *hca* генов K-12 в *Salmonella typhimurium* LT2 индуцировало рост на КК и образование 2,3-дигидроксикоричной кислоты, в то время как у дикого типа сальмонеллы эти признаки отсутствовали (Diaz et al., 1998). Способность использовать КК в качестве источника углерода показана для нескольких видов *Pseudomonas*, но ростовые характеристики не приводятся (Andreoni, Bestetti, 1986). Единственный штамм, который достигал стационарной фазы

Таблица 1. Ростовые параметры *A. insolitus* LCu2 на средах с различными фенольными кислотами

Источник углерода, г/л	Плотность засева	μ , ч ⁻¹	g, ч
Коричная кислота, 0.5	0.02	0.041	16.9
Коричная кислота, 1.0	0.02	0.045	15.4
Коричная кислота, 0.5	0.09	0.034	20.4
Коричная кислота, 1.0	0.09	0.035	19.8
<i>m</i> -Кумаровая кислота, 0.5	0.02	0.020	34.6
<i>o</i> -Кумаровая кислота, 0.5	0.02	—	—
<i>n</i> -Кумаровая кислота, 0.5	0.02	—	—
Феруловая кислота, 0.5	0.09	0.043	16.1
Ванилиновая кислота, 0.5	0.09	0.043	16.1

Примечание. μ — удельная скорость роста; g — время генерации; указаны для периода 48 ч.

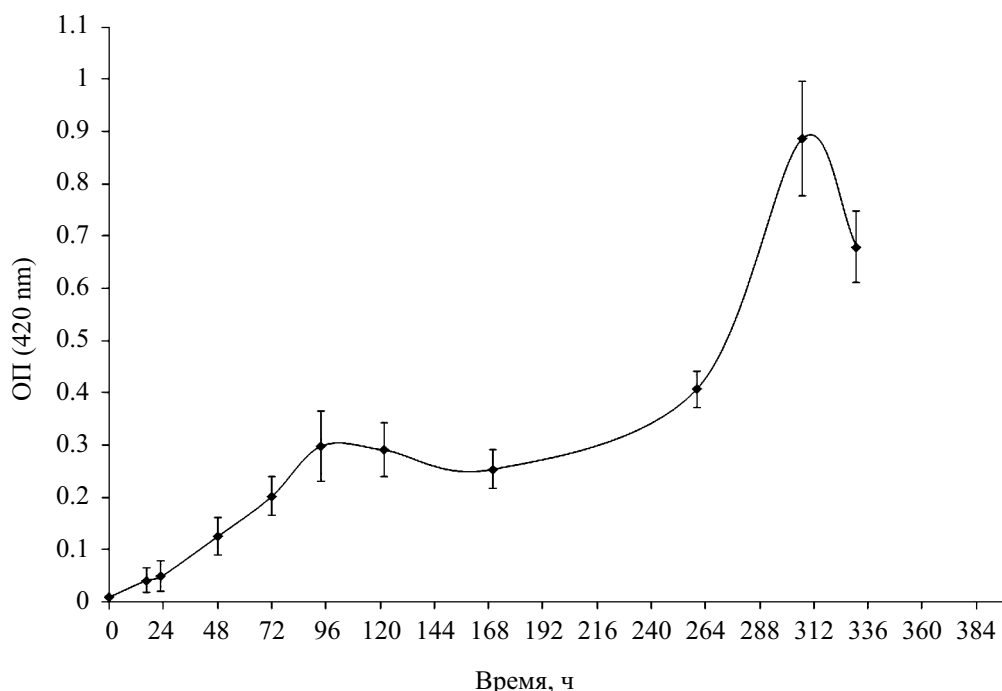


Рис. 1. Двухфазная кривая роста *A. insolitus* LCu2 на 0.5 г/л коричной кислоты. Каждая точка является средней из трех повторностей; погрешности показывают доверительный интервал для $p \leq 0.05$.

роста на КК уже через 19 ч, — *Stenotrophomonas* sp. TRMK2 (Monisha et al., 2018).

На следующем этапе мы попытались получить адаптированную к КК культуру LCu2, осуществив серию последовательных пересевов. Кривая роста такой культуры представлена на рис. 1.

Рост не был сбалансированным: кривая имела два пика. Как правило, диауксический рост свидетельствует о наличии в среде двух разных источников углерода и энергии. В этом случае бактерии утилизируют сначала один субстрат, а когда он исчерпан, происходит синтез ферментов, позволяющих утилизировать другой. В нашей работе подобный рост может быть связан с образованием нескольких интермедиатов КК, последовательно используемых бактериями для роста.

Первая стационарная фаза роста зарегистрирована через 96 ч, вторая — через 307 ч. Скорость роста для обоих пиков была одинаковой и составила $0.017\text{--}0.018\text{ ч}^{-1}$, а время генерации $38.5\text{--}41.0\text{ ч}$ соответственно (рис. 1). Максимальное значение ОП₄₂₀ было в 2.3 раза выше, чем у исходной культуры LCu2. Прирост сырой биомассы за 307 ч составил 9 мг/мл.

Жизнеспособность бактерий, культивируемых длительное время на коричной кислоте. Чтобы проверить устойчивость *A. insolitus* LCu2 к биоцидному действию КК, бактерии в течение 1 мес. культивировали на КК, добавленной в среду в качестве единственного источника углерода и энергии

(0.5–1.0 г/л). Затем бактериальные суспензии высевали на два типа сред — богатую LB без добавления КК и синтетическую MS1 с КК (0.5 г/л). Жизнеспособность культур сохранялась. На обоих типах сред значения колониеобразующих единиц (КОЕ) статистически достоверно не отличались друг от друга, но КОЕ культур, высеянных из среды с КК (0.5 г/л), было на один порядок выше, чем у культур из среды с концентрацией КК (1 г/л) (рис. 2). Внешний вид колоний на разных средах значительно отличался. Колонии на MS1 с КК были мелкими и прозрачными. На богатой среде LB без КК вырастали крупные слизистые колонии.

Убыль и трансформация коричной кислоты. Чтобы оценить возможную трансформацию КК в процессе бактериального роста, были измерены УФ-спектры супернатантов (рис. 3а). УФ-спектр КК в химическом контроле имел два диапазона поглощения: первый от 200 до 230 нм, содержащий несколько максимумов абсорбции λ_{max1} 205, 209, 215, 222 нм; и второй с λ_{max2} 270 (269) нм. После роста бактерий существенное снижение интенсивности абсорбции в 3 и более раза (примерно на 69%) наблюдалось в районе обоих диапазонов поглощения, что свидетельствует о пропорциональном снижении концентрации КК в среде.

Для количественного определения остаточного содержания в среде КК использовали ВЭЖХ анализ.

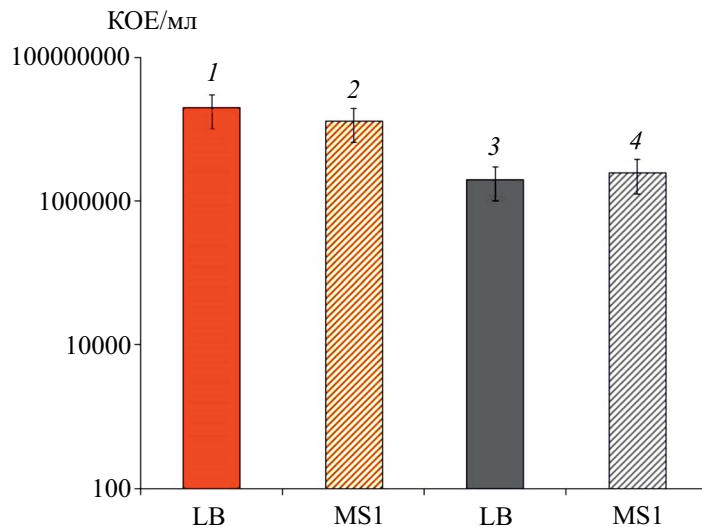


Рис. 2. Жизнеспособность бактерий, культивируемых в течение месяца на коричневой кислоте: 1, 2 – культуры, выращенные на 0.5 г/л; 3, 4 – на 1.0 г/л коричневой кислоты, высеванные на минерально-синтетическую (MS1) и LB среды; доверительный интервал для $p \leq 0.05$.

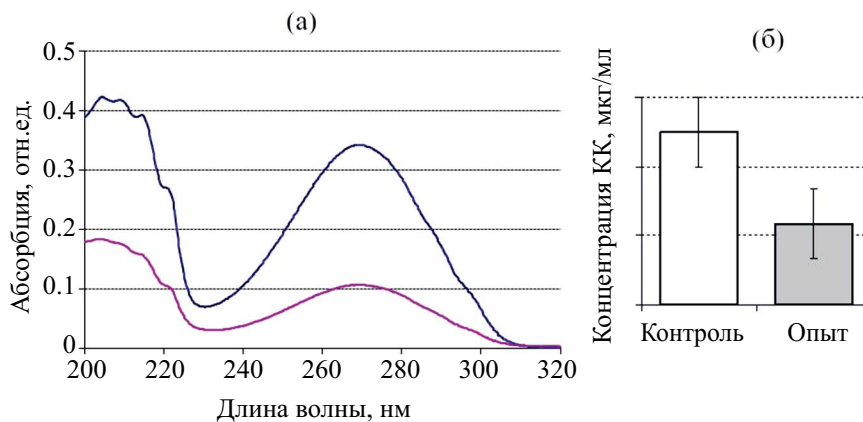


Рис. 3. УФ спектры (а) и ВЭЖХ анализ (б) коричневой кислоты до и после культивирования *A. insolitus* LCu2. Синяя кривая – химический контроль, красная – после культивирования бактерий.

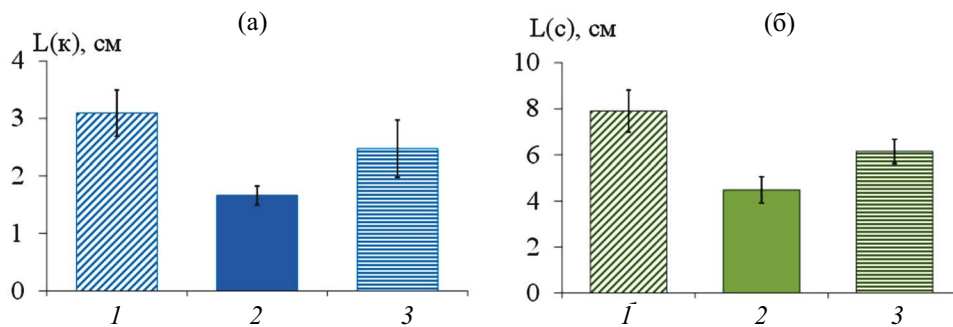


Рис. 4. Фитотоксичность супернатантов с коричневой кислотой по отношению к проросткам пшеницы сорта Саратовская 29: а – средняя длина корня; б – средняя длина стебля; 1 – биологический контроль; 2 – химический контроль; 3 – культуральная жидкость LCu2. Погрешности показывают доверительный интервал для $p \leq 0.05$; в каждом варианте $n = 25$; возраст растений 5 сут; содержание коричневой кислоты 1 мг.

Таблица 2. Гены, кодирующие ферменты диоксигенолитического пути катаболизма коричной кислоты, в геноме *A. insolitus* LCu2

Белок запроса ID в Uniprot	Ген	ID белка в геноме штамма LCu2 в GenBank	Покрытие, %	E-value	Id, %
Гидроксилирование субстрата					
P0ABR53 фенилпропионат/циннамат ДО субъединица α	<i>hcaA1</i>	QEK92585 фенилпропионат/циннамат ДО субъекдиница α	90	4e-33	26.62
Q47140 фенилпропионат/циннамат ДО субъекдиница β	<i>hcaA2</i>	QEK92584 фенилпропионат/циннамат ДО субъекдиница β	84	1e-13	23.0
P0ABW0 субъединица ферредоксина 3-фенилпропионат/циннамат ДО	<i>hcaC</i>	QEK92586 железосодержащий ферредоксин	68	8e-26	48.65
P77650 NAD ⁺ ферредоксин редуктаза 3-фенилпропионат/циннамат ДО	<i>hcaD</i>	QEK95941 ферредоксин редуктаза	95	5e-61	34.24
P0C131 фенилпропионат/циннамат дигидродиол дегидрогеназа	<i>hcaB</i>	QEK92582 дегидрогеназа	—	—	—
Разрыв фенильного кольца					
2PHD_A салицилат 1,2-ДО	<i>sdoA</i>	QEK92583 гипотетический протеин	30	1e-10	31.58
AAQ91293.1 салицилат 1,2-ДО			30	1e-11	32.46
2D40_A гентизат 1,2-ДО	<i>gdoA</i>		35	2e-10	34.34
Q330M9.1 гентизат 1,2-ДО			50	6e-09	29.66
AFC47847 1-гидрокси-2-нафтоат ДО	<i>phdI</i>		88	1e-12	26.21
BAA31235 1-гидрокси-2-нафтоат ДО			77	8e-12	23.87
ARB18233 5-аминосалицилат-1,2 ДО	<i>mabB</i>		75	1e-11	24.36
P0ABR9 2,3-дигидроксифенилпропионат/ 2,3-дигидроксициннамат 1,2-ДО	<i>mhpB</i>		—	—	—
Образование центральных метаболитов ЦТК					
B7N8Q6 2-гидрокси-6-оксоноадиендиоат/ 2-гидрокси-6-оксоноатриендиоат гидроксилаза	<i>mhpC</i>	QEK92296.1 альфа/бета складчатая гидролаза	86	2e-14	26.17
P77608 2-кето-4-пентаноат гидратаза	<i>mhpD</i>	QEK92581 2-кето-4-пентаноат гидратаза	13	0,003	36.36
P51020 4-гидрокси-2-оксовалериат альдолаза	<i>mhpE</i>	QEK93369	80	4e-08	25.57
Регуляция транскрипции и транспорт					
Q47141 траснкрипционный активатор LysR	<i>hcaR</i>	QEK94968.1 транскрипционный регулятор LysR	92	7e-39	34.78
Q47142.2 транспортер 3-фенилпропионовой кислоты	<i>hcaT</i>	QEK93400 MFS транспортер	94	2e-25	26.45

Примечание. ID — идентификационный номер в базах данных; Id — идентичность между двумя аминокислотными последовательностями.

Убыль КК после культивирования LCu2 составила 266 мг или 53% по сравнению с химическим контролем (рис. 36). С учетом результатов ВЭЖХ анализа

и прироста биомассы рассчитывали эффективность деградации (Q) для адаптированной культуры, которая составила 30 мкг/мг.

Фитотоксичность бактериальных супернатантов. Влияние остаточного содержания КК в супернатантах до и после культивирования L_{Cu2} на морфометрические параметры растений мягкой яровой пшеницы Саратовская 29 показано на рис. 4.

У проростков, выращенных на чашках с добавлением химического контроля, на 46% ингибировалась длина корня L(к) и на 43% длина стебля L(с) (рис. 4). После культивирования бактерий фитотоксичность среды значительно снижалась. Процент ингибирования морфометрических показателей составил всего 20% для корней и 22% для стеблей по отношению к биологическому контролю. По сравнению с химическим контролем L(к) была больше на 33%, а L(с) на 27%. Кроме того, у проростков, выращенных с добавлением культуральной жидкости L_{Cu2}, наблюдался активный рост корневых волосков, который отсутствовал в биологическом контроле.

Биоинформатический поиск генов катаболизма коричной кислоты. Поскольку диоксигенолитический путь — единственный полностью описанный

путь деградации КК (Diaz et al., 1998), а ферменты, кодирующие биохимические реакции, аннотированы в Uniprot, мы использовали его в качестве референсного. Диоксигенолитический путь описан для двух субстратов: фенилпропионовой и коричной кислот. Начинается он с дигидроксирования ароматического кольца в положениях 2, 3 ферментным комплексом, состоящим из четырех белков: α - и β -субъединиц 3-фенилпропионат/циннамат диоксигеназы (HcaA1A2) [EC 1.14.12.19] и соответствующих ферредоксина (HcaC) и ферредоксин редуктазы (HcaD) [EC 1.18.1.3]. В геноме L_{Cu2} найдены все четыре гена, кодирующие ферментный комплекс, отвечающий за дигидроксирование кольца ФпК и КК (табл. 2). Гены *hcaA1A2CDB* расположены рядом и транскрибируются с одной цепи (рис. 5а).

За дальнейшее расщепление кольца образовавшихся дигидродидолов у *E. coli* K-12 отвечает MhpB диоксигеназа [EC 1.13.11.16] семейства LigB/MhpB экстрадиольных диоксигеназ, катализирующая негемовое Fe(II)-зависимое расщепление кольца

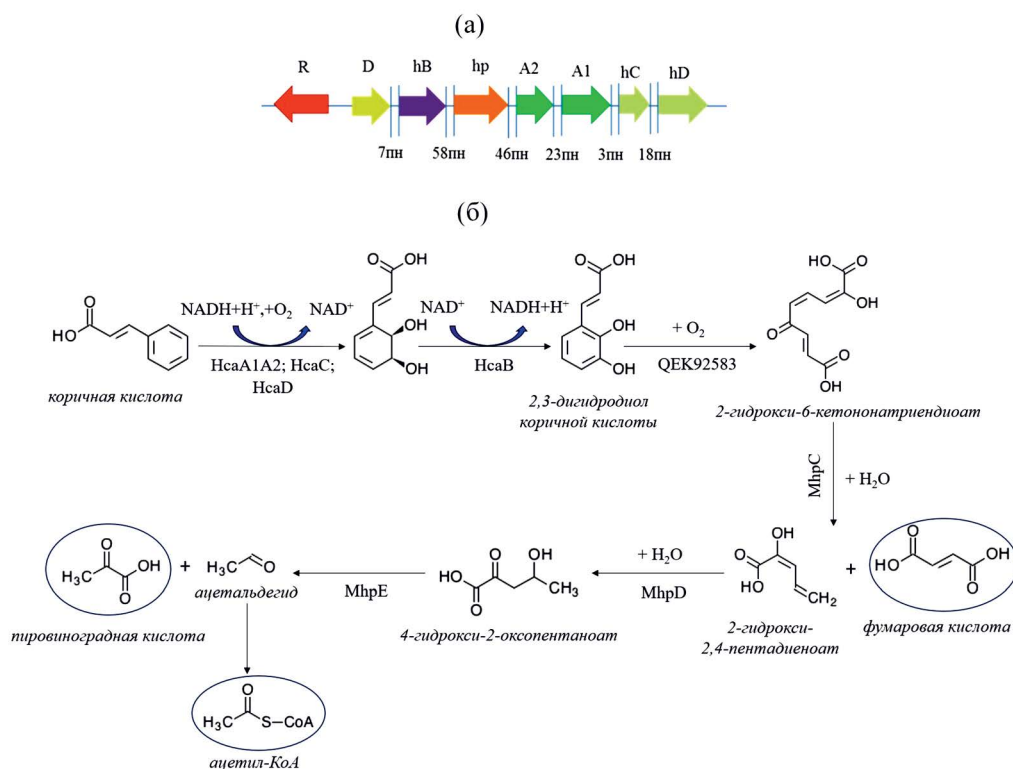


Рис. 5. Структурная организация генного кластера, содержащего *hca*- и *mhp*-гены, и предполагаемый биохимический путь деградации коричной кислоты штаммом *A. insolitus* L_{Cu2}. а: **R** — *gniR* (транскрипционный регулятор); **D** — *mhpD*; **hB** — *hcaB*; **hp** — QEK92583; **A2** — *hcaA2*; **A1** — *hcaA1*; **hC** — *hcaC*; **hD** — *hcaD*; б: **HcaA1A2** — α - и β -субъединицы транс/циннамат диоксигеназы; **HcaC** — ферредоксин; **HcaD** — ферредоксинредуктаза; **HcaB** — 2,3-дигидрофенилпропионат дегидрогеназа; **QEK92583** — гипотетический белок — предположительно, экстрадиольная диоксигеназа; **MhpC** — 2-гидрокси-6-оксопентатриендиоат/2-гидрокси-6-оксопентатриендиоат гидроксилаза; **MhpD** — 2-кетотетрапентаноат гидратаза; **MhpE** — 4-гидрокси-2-оксопентатриендиоат альдолаза. Овалами обозначены центральные метаболиты.

в молекулах 2,3-дигидроксикоричной и 2,3-дигидроксибензилпропионовой кислот (Bugg, 1993; Mendel et al., 2004).

В геноме *A. insolitus* LCu2 не обнаружено гомологичных MhpV последовательностей. Однако рядом с дегидрогеназой (QEK92582) штамма LCu2 расположен гипотетический белок (QEK92583), демонстрирующий родство с белковым суперсемейством бикупиновых экстрадиольных диоксигеназ III класса, расщепляющих химическую связь в бензольном кольце между карбоксилированным и гидроксильным углеродами (табл. 2). Представителями семейства являются: гентизат 1,2-ДО [ЕС 1.13.11.4]; салицилат 1,2-ДО [ЕС 1.13.11.-]; 1-гидрокси-2-нафтоат ДО [ЕС 1.13.11.38]; гомогентизат ДО [ЕС 1.13.11.5] (Chen et al., 2008; Ferraroni et al., 2012). BLASTP анализ гипотетического белка (QEK92583) с представителями купинового суперсемейства показал слабую гомологию в каталитической области (табл. 2). На филогенетическом дереве (рис. 6б) QEK92583 располагался ближе к кластеру с 1-гидрокси-2-нафтоат ДО, но не к гентизат 1,2-ДО. Также белок LCu2 продемонстрировал эволюционное родство с последовательностью Q330M9, для которой показана экспрессия, индуцируемая коричной и фенилпропионовой

кислотами, а также 3-гидроксибензоатом (Fairley et al., 2006).

Попарное выравнивание QEK92583 с наиболее изученным представителем семейства-салицилат 1,2-ДО (AAQ91293.1) выявило наличие трех остатков гистидина, которые координируют Fe(II) в каталитическом центре (рис. 6а). Таким образом, биоинформатический анализ позволяет предположить, что гипотетический протеин (QEK92583) имеет потенциал к разрыву химической связи между 1 и 2 атомами углерода фенильного кольца. Безусловно, данное предположение требует дальнейших исследований.

Гены кластера *mhpCDE*, отвечающие за последующий катаболизм образовавшихся интермедиатов до продуктов ЦТК, и транскрипционный регулятор *hcaR* и транспортер *hcaT* также найдены в геноме LCu2 (табл. 2; рис. 5). На основании геномного анализа предсказан предположительный биохимический путь катаболизма КК штаммом *A. insolitus* LCu2, который сходен с описанным для *E. coli* K-12 (Diaz et al., 1998), кроме ключевого белка, расщепляющего связь в фенильном кольце (рис. 5б).

Полученные результаты отражают метаболический потенциал бактерий рода *Achromobacter*, а также

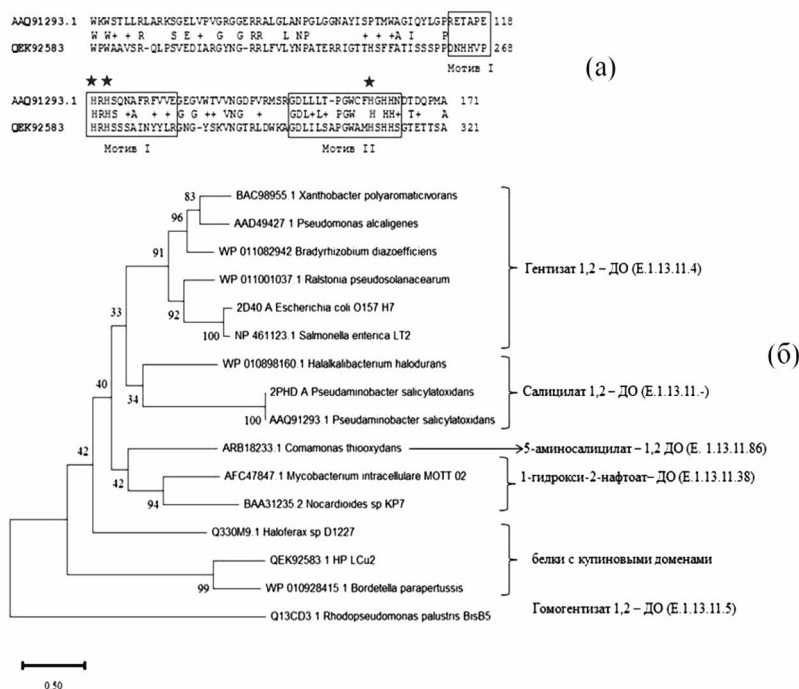


Рис. 6. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности (QEK92583) из *A. insolitus* LCu2: а – сравнение фрагментов аминокислотных последовательностей салицилат 1,2-диоксигеназы из *P. salicylatoxidans* BN12 (AAQ91293.1) и гипотетического белка *A. insolitus* LCu2 (QEK92583). Купиновый домен с тремя остатками гистидина (His₁₁₉; His₁₂₁ и His₁₆₀), координирующими Fe²⁺ в каталитическом центре (Matera et al., 2008), отмечен голубыми прямоугольниками и звездами, и обозначен как Мотив I и Мотив II; б – филогенетический анализ белков с купиновыми доменами методом Maximum-Likelihood в Mega X (Kumar et al., 2018), бутстрэп 1000, последовательности выровнены в ClustalOmega W с настройками по умолчанию; корень – гомогентизат 1,2-диоксигеназа.

важны для подбора условий биохимических экспериментов и оптимизации деструктивной активности бактерий по отношению к фенилпропаноидам.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хроматографический анализ проводили на оборудовании ЦКП “Симбиоз” Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания 1022040700974-4. Работа поддержана Российским научным фондом (полное геномное секвенирование, проект № 22-14-00317).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анохина Т.О., Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Полищев В.Н., Баскунов Б.П., Соляникова И.П. Альтернативный путь метаболизма нафталина у штамма *Rhodococcus opacus* 3D, включающий образование орто-фталевой и производных коричной кислоты // Биохимия. 2020. Т. 85. Р. 412–427.
- Anokhina T.O., Esikova T.Z., Gafarov A.B., Polivtseva V.N., Baskunov B.P., Solyanikova I.P. Alternative naphthalene metabolic pathway includes formation of ortho-phthalic acid and cinnamic acid derivatives in the *Rhodococcus opacus* strain 3D // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 355–368.
- Ермакова И.Т., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А. Микробная деструкция органофосфонатов почвенными бактериями // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 689–695.
- Ermakova I.T., Shushkova T.V., Leont'evskii A.A. Microbial degradation of organophosphonates by soil bacteria // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 615–620.
- Andreoni V., Bestetti G. Comparative analysis of different *Pseudomonas* strains that degrade cinnamic acid // Appl. Environ. Microbiol. 1986. V. 52. P. 930–934.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bugg T.D.H. Overproduction, purification and properties of 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta. Protein Struct. Mol. Enzymol. 1993. V. 1202. P. 258–264.
- Chamkha M., Labat M., Patel B.K., Garcia J.L. Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 2049–2054.
- Chen J., Li W., Wang M., Zhu G., Liu D., Sun F., Zhang X.C. Crystal structure and mutagenic analysis of GDOsp, a gentisate 1, 2-dioxygenase from *Silicibacter pomeroyi* // Protein Sci. 2008. V. 17. P. 1362–1373.
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. Natural products (secondary metabolites) // Biochemistry and molecular biology of plants / Eds. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. Ch. 24. 2000. P. 1250–1319.
- Díaz E., Ferrández A., García J.L. Characterization of the *hca* cluster encoding the dioxygenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionic acid in *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 2915–2923.
- Fairley D.J., Wang G., Rensing C., Pepper I.L., Larkin M.J. Expression of gentisate 1,2-dioxygenase (*gdoA*) genes involved in aromatic degradation in two haloarchaeal genera // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 691–695.
- Ferraroni M., Matera I., Steimer L., Bürger S., Scozzafava A., Stolz A., Briganti F. Crystal structures of salicylate 1,2-dioxygenase-substrates adducts: a step towards the comprehension of the structural basis for substrate selection in class III ring cleaving dioxygenases // J. Struct. Biol. 2012. V. 177. P. 431–438.
- Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezhuk Y., McGinnis S., Madden T.L. NCBI BLAST: a better web interface // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. Suppl. 2. P. W5–W9.
- Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 27–30.
- Kefeli V.I., Kalevitch M.V., Borsari B. Phenolic cycle in plants and environment // J. Cell Mol. Biol. 2003. V. 2. P. 13–18.
- 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.
- Malheiro J.F., Maillard J.Y., Borges F., Simões M. Evaluation of cinnamaldehyde and cinnamic acid derivatives in microbial growth control // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2019. V. 141. P. 71–78.
- Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses // Plant Signal. Behav. 2010. V. 5. P. 359–368.
- Mendel S., Arndt A., Bugg T.D.H. Acid-base catalysis in the extradiol catechol dioxygenase reaction mechanism: site-directed mutagenesis of His-115 and His-179 in *Escherichia coli* 2,3-dihydroxyphenylpropionate

- 1,2-dioxygenase (MhpB) // *Biochem.* 2004. V. 43. P. 13390–13396.
- Monisha T.R., Ismailsab M., Masarbo R., Nayak A.S., Karegoudar T.B. Degradation of cinnamic acid by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas* sp. TRMK2 // *3 Biotech.* 2018. V. 8. P. 1–8.
- Perez-Pantoja D., De la Iglesia R., Pieper D.H., González B. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134 // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. P. 736–794.
- Rajkumari J., Borkotoky S., Murali A., Suchiang K., Mohanty S.K., Busi S. Cinnamic acid attenuates quorum sensing associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // *Biotechnol. Lett.* 2018. V. 40. P. 1087–1100.
- Salvador V.H., Lima R.B., dos Santos W.D., Soares A.R., Böhm P.A.F., Marchiosi R., Ferrarese-Filho O. Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth // *PLoS One.* 2013. V. 8. Art. e69105.
- Siqueira J.O., Nair M.G., Hammerschmidt R., Safir G.R., Putnam A.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems // *Crit. Rev. Plant Sci.* 1991. V. 10. P. 63–121.
- The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. Iss. D1. P. D523–D531.
- Ye S.F., Zhou Y.H., Sun Y., Zou L.Y., Yu J.Q. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt // *Environ. Exp. Bot.* 2006. V. 56. P. 255–262.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Degradation of Cinnamic Acid by the Rhizosphere Strain *Achromobacter insolitus* LCu2

E. V. Kryuchkova^{1, *}, E. S. Morozova², V. S. Grinev^{1, 3}, G. L. Burygin^{1, 3},
N. E. Gogoleva^{4, 5}, and Yu. V. Gogolev^{4, 6}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, FRCenter “Saratov Scientific Center RAS”,
Saratov, 410049, Russia*

²*St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia*

³*Saratov National Research State University named after N. G. Chernyshevsky, Saratov, 410012, Russia*

⁴*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008, Russia*

⁵*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Orenburg, 460000, Russia*

⁶*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
Kazan, 420008, Russia*

*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Abstract. The *Achromobacter insolitus* LCu2 strain, isolated from the roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.), utilized cinnamic acid, as well as its methoxy derivatives – vanillic and ferulic acids – as the only carbon source. Weak growth was observed on m-coumaric acid, but not on o- and p-coumaric acids. Growth on cinnamic acid was slow and diauxic. The loss of substrate from the cultivation medium was 53%, the destructive efficiency was 30 µg/mg of raw biomass for 14 days. Despite the bactericidal effect of cinnamic acid, the *A. insolitus* LCu2 culture remained viable for a long time. Genomic analysis revealed two gene clusters, *hca* and *mhp*, responsible for dihydroxylation of the phenyl ring (*hcaA1A2CDB*) and its subsequent cleavage to central metabolic products (*mhpACDE*), as well as a transcriptional regulator (*hcaR*) and a putative transporter (*hcaT*). A putative biochemical pathway for cinnamic acid degradation by *A. insolitus* strain LCu2 was predicted using genomic data.

Keywords: cinnamic acid, dioxygenase, decomposer bacteria, *hca*, *mhp*, *Achromobacter insolitus*

УДК 579.222.4+57.083.18+579.69

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНАЭРОБНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ КОНТАКТЕ С ОТХОДАМИ ИЗ ПЕНОПОЛИСТИРОЛА¹

© 2024 г. Л. И. Ширинкина^{а, *}, Ю. В. Тактарова^а, М. А. Гладченко^а,
А. Ю. Меркель^б, И. Б. Котова^а

^аМосковский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

^бИнститут микробиологии им. С. Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

*e-mail: pro100tilka@gmail.com

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 12.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Растущее загрязнение пластиками представляет собой серьезную экологическую проблему, поскольку широкое производство и неадекватная утилизация пластиковых материалов приводят к неблагоприятному воздействию на экосистемы. В работе исследованы структурно-функциональные особенности анаэробного микробного сообщества при контакте с отходами из пенополистирола (ВПС) в метаногенных (МГ), нитрат- (НР) и сульфатредуцирующих (СР) условиях. Показано, что присутствие ВПС в микробном сообществе не оказывает негативного влияния на процессы образования биогаза, а наоборот, приводит к увеличению выхода метана и летучих жирных кислот и изменению их соотношения. В культуральной жидкости вариантов с ВПС обнаружены микрочастицы разного размера: в НР условиях – 2.4×10^6 /мл, в СР условиях – 1.2×10^6 /мл и в МГ условиях – 0.4×10^6 /мл, тогда как в контрольных вариантах без клеток микрочастицы обнаружены не были. Методом сканирующей электронной микроскопии выявлено, что во всех опытных вариантах поверхность полимера стала более рыхлой, рельефной, появились неровности, трещины и отверстия. Рост разнообразия в микробном сообществе, связанный с увеличением числа микробных морфотипов, коррелирует с результатами высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. При внесении ВПС в анаэробное сообщество, инкубируемое в разных донорно-акцепторных условиях, повысилось число входящих в него групп микроорганизмов и увеличилась доля представителей гидролитических и ацидогенных бактерий (*Sedimentibacter*, *Lentimicrobium*), ацетогенных синтрофов (*Syntrophomonas*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*) и метаногенных архей (*Methanosarcina*, *Methanobacterium*). Наше исследование показывает, что отходы из ВПС не являются инертными для микробного сообщества, и контакт с ними приводит к существенным перестройкам в его структуре и функционировании. Обнаруженные изменения поверхности образца, появление микрочастиц и различия в составе промежуточных и конечных продуктов метаболизма сообщества могут свидетельствовать о медленной частичной деструкции путем фрагментации этого вида отходов. Однако поскольку для опытов был взят бытовой ВПС, содержащий кроме основного полимера различные наполнители, то есть вероятность, что наряду с полистиролом деградации подвергаются и входящие в его состав дополнительные вещества (пластификаторы, красители и т.д.). Способность микроорганизмов к деструкции самого полимера требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: вспененный полистирол, анаэробное микробное сообщество, метаногенез, нитратредукция, сульфатредукция

DOI: 10.31857/S0026365624050068

Со времен промышленной революции антропогенная нагрузка на окружающую среду неуклонно растет. Среди важных факторов следует выделить

загрязнение отходами и отдельный его вид – загрязнение полимерными ксенобиотиками. В течение 2019–2020 гг. в мире было произведено в среднем

¹Дополнительные материалы к статье размещены по ссылке DOI: 10.31857/S0026365624050068

от 368 до 415 млн. тонн пластика (с ожидаемым приростом 4% в ближайшие годы), что привело к возрастающим масштабам поступления пластиковых отходов в окружающую среду (Billard, Boucher, 2019; Plastics Europe, 2021). Создатели пластиков исходили из того, что изделия будут инертны для окружающей среды. Однако оказалось, что под воздействием абиотических факторов — ультрафиолета, колебаний температуры и влажности, ветровой эрозии — пластик разрушается на свалках и распадается на микропластик, который мигрирует со сточными и грунтовыми водами, загрязняя почву, водные ресурсы и заканчивая свой путь в океане. Показано, что микропластик отрицательно влияет на структуру почвы, ухудшая ее водоудерживающую способность и аэрацию, а также оказывает негативное влияние на круговорот органического углерода и азота в почве, микробную активность почвы и перенос питательных веществ (Cao et al., 2017; Liu et al., 2017; Rillig, 2018; Ruimin et al., 2020).

Микропластик попадает в пищевые цепи, обнаруживается в крови и легких человека, проникает через плацентарный барьер, приводит к риску воспаления сосудов (Ragusa et al., 2021; Vethaak, Legler, 2021; Vlacil et al., 2021; Field et al., 2022).

Значительная доля объемов мирового производства пластика приходится на полистирол (ПС), так как это легкий, дешевый, термостойкий материал, широко используемый в строительстве, упаковке, изделиях бытового назначения, электротехнике, лабораторном оборудовании. ПС получают полимеризацией стирола. Молекула содержит фенильную группу (рис. 1).

В производстве изделий из ПС используются красители, пластификаторы, стабилизаторы (Бакирова, Зенитова, 2009). Для переработки ПС во вспененный полистирол (ВПС) широко применяют метод экструзии, заключающийся в продавливании насыщенного газом расплава полимера через формующую головку (Ярцев и соавт., 2010). Производство также включает стадию отстаивания для удаления вспенивающего агента и замещения его воздухом. Таким образом достигается объемное

соотношение газовой и полимерной фаз от 30 : 1 до 1 : 10. Для утилизации полистирола используют сжигание, термодеструкцию и термоокислительную деструкцию, однако минусом данных методов является образование токсичных продуктов (паров стирола, бензола, этилбензола, толуола, оксида углерода). Перспективной альтернативой является вторичная переработка, однако легкость и дешевизна материала делают сбор отходов из полистирола экономически нецелесообразным, и зачастую компании отдают приоритет переработке других видов пластиков (Клинков и соавт., 2010). Поэтому отходы из вспененного ПС постоянно присутствуют на свалках, в компостируемых массах и в природных местообитаниях.

Биодеградация ПС может быть перспективным решением, однако она осложняется следующими структурными особенностями материала, такими как: молекулярная масса, достигающая 100000–400000 г/моль; гидрофобность; случайное расположение фенильных групп по обеим сторонам полимерной цепи, что обуславливает аморфность полимера; сложность деполимеризации, связанная с тем, что вновь образованная σ -связь “углерод—углерод” прочнее, чем π -связь винильной группы.

В литературе приводятся различные и противоречивые данные о микробной деградации ПС (Котова и соавт., 2021). Большинство исследователей отмечают крайне медленную скорость этого процесса (Плакунов и соавт., 2020). Так, известный деструктор органических соединений *Rhodococcus ruber* в аэробных условиях показал снижение массы ПС 0.8% за 8 нед. культивирования, штаммы *Exiguobacterium sibiricum* и *E. undae* достигли убыли 0.4% массы ПС за 30 сут (Mor, Sivan, 2008; Chauhan et al., 2018).

Процесс микробного разложения ПС природными сообществами проходил быстрее: в образцах с мусорной свалки Саримукти в Индонезии убыль массы ВПС за 7 нед. инкубации в присутствии кислорода составила 18.23% (Hidayat et al., 2020).

В литературе имеется значительно меньше данных об изменениях в составе и функционировании микробных сообществ при контакте с ПС, хотя именно они могут свидетельствовать о существенных экологических сдвигах в отдельных местообитаниях и в биосфере в целом. Например, в опыте Zhang et al. (2020) показана сукцессия сообщества активного ила в анаэробных условиях в присутствии микропластика ПС размером 80 нм и 5 мкм в количестве 0.25 г/л с сопутствующим снижением продукции метана на 19.3–17.9% соответственно. Wei et al. (2020) продемонстрировали, что наночастицы полистирола в количестве 20 и 50 мкг/л также угнетают процесс анаэробного сбраживания сточных вод и снижают выработку метана на 19.0–28.6% в анаэробном реакторе с восходящим потоком. Изучение воздействия частиц

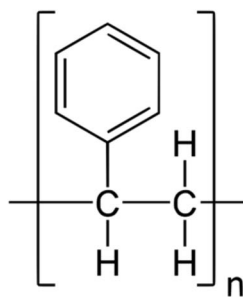


Рис. 1. Структурная формула ПС (Малкин и соавт., 1975).

ПС различного размера на микробное сообщество в образцах почвы показало значительное снижение микробной биомассы, уменьшение скорости нитрификации и рост относительной численности микроорганизмов филума *Proteobacteria* (Ko et al., 2023).

Физико-химические свойства материала во многом определяют методы анализа, применимые для обнаружения признаков деструкции материала в процессе биodeградации. ВПС отличается хрупкостью, пористостью, низкой устойчивостью к растворителям и высоким температурам, по объему содержит до 98% газа, что значительно сужает спектр применимых методик для анализа его состояния.

Целью нашего исследования является изучение изменений состава и функциональных характеристик анаэробного микробного сообщества в присутствии отходов ВПС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический материал. В работе использовали метаногенное сообщество ЕРа, выделенное из ила очистных сооружений (EGSB-реактора) стоков пивоваренного завода “Efes Pilsener” (Москва) и адаптированное к полной минерализации 2-аминобензойной кислоты (2-АБК) (Линькова и соавт., 2011).

Образец вспененного полистирола. В экспериментах применяли бытовой ВПС темно-серого цвета, используемый для изготовления подложек для овощей и кондитерских изделий (лоток подложка, 175 × 85 × 20 мм; артикул 1363). Подложку нарезали на пластинки размером 1.5 × 4 см (масса 71.7 ± 7.0 мг), взвешивали, стерилизовали в течение 1 ч в 70% этиловом спирте и сушили в чашках Петри в течение 24 ч.

Среды и условия культивирования. Инкубацию осуществляли в герметичных стеклянных флаконах объемом 100 мл с резиновыми пробками, зажатými алюминиевыми колпачками, и аргонном в качестве газовой фазы с 50 мл минеральной среды (мг/л): NH_4Cl – 280, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 10, K_2HPO_4 – 250, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 100, ЭДТА – 1, NaHCO_3 – 5000, H_3BO_3 – 0.05, $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 2, ZnCl_2 – 0.05, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; дрожжевой экстракт – 100; начальный pH 7.0 (Sklyar, 2000). Инкубацию проводили при температуре 30°C в статичных условиях в темноте.

В качестве дополнительных акцепторов электронов в среду вносили растворы солей натрия до конечной концентрации 10 мМ: для создания нитратредуцирующих (НР) условий – NaNO_3 , для создания сульфатредуцирующих (СР) условий – Na_2SO_4 . Для метаногенных (МГ) условий

внешние акцепторы не добавляли. Вносили следующие источники углерода и энергии: 2-АБК 1 мМ (в МГ условиях), пируват 1 г/л (в МГ и НР условиях) и лактат натрия 2 г/л (в СР условиях). Субстраты и другие добавки хранили в виде концентрированных анаэробных растворов и вносили во флаконы стерильным шприцем до нужной концентрации. В качестве инокулята использовали суспензию клеток микробного сообщества (ОП₆₀₀ 1.0), предварительно выращенного на минеральной среде с 2-АБК и пируватом в течение 9 сут. Посевной материал составлял 10% от объема среды. В качестве контролей использовали минеральную среду без и с дополнительными акцепторами электронов, в которую был помещен ВПС, без микробных клеток (химический контроль), и минеральную среду без ВПС, содержащую микробное сообщество (биологический контроль, контроль роста клеток).

Методы анализа. В культуральной жидкости отслеживали изменения pH, содержания общего белка и летучих жирных кислот (ЛЖК), а в газовой фазе следили за соотношением основных газов. Для регистрации возможной деструкции ВПС отслеживали визуальные изменения поверхности и целостности пластика, определяли присутствие микропластика в культуральной жидкости и фиксировали убыль массы образцов ВПС. Морфологические особенности микроорганизмов исследовали микроскопически, а изменения в составе микробного сообщества – с помощью высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S рРНК.

Измерение pH культуральной жидкости проводили с помощью тест-полосок (“Johnson”, Великобритания).

Определение белка. Измерение общего белка в культуральной жидкости проводили по Бредфорд (Bradford, 1976). Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием при 15000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант в объеме 50 мкл помещали в микропробирки, смешивали с 950 мкл красителя Кумасси, избегая образования пены. Измеряли оптические плотности испытуемого раствора и растворов сравнения с известным содержанием белка на спектрофотометре Shimadzu UV-1202 (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 595 нм, с использованием в качестве контрольного раствора смеси 50 мкл дистиллированной воды и 950 мкл красителя Кумасси.

Определение содержания летучих жирных кислот. Содержание ЛЖК в культуральной жидкости определяли с помощью газо-жидкостной хроматографии на хроматографе Кристалл 5000М (“Хроматэк”, Россия), используя капиллярную колонку 50 м × 0.32 мм, НР-FFAP, 0.5 мкм, пламенно-ионизационный детектор. Пробу предварительно осаждали центрифугированием при 15000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант объемом 1 мкл вводили

в прибор. Определение концентрации компонентов смеси осуществляли на основе вычисления отношения площадей пиков компонентов к соответствующим площадям пиков веществ в стандартных растворах.

Определение содержания газов. Каждые 30–40 сут шприцем отбирали 1 мл пробы газовой фазы флакона и определяли содержание метана, углекислого газа и сопутствующих газов на газовом хроматографе ЛХМ 8 МД — модель 3 с катарометром (“Хроматограф”, Россия), газ-носитель — аргон, скорость газа-носителя — 20 мл/мин. Колонки длиной 2 м были заполнены порпаком QS. Количественное определение компонентов проводили на основе вычисления площади под хроматографическим пиком. Избыточное давление во флаконах измеряли с помощью манометра 332.30 (“Wika”, Германия) и учитывали эти данные при расчете конечных концентраций газовых метаболитов. Для преобразования численного значения объемной концентрации газа, выраженной в процентах, в молярную концентрацию (мМ) применяли следующую формулу:

$$Y = \frac{(P_1 \times P_{\text{общ.}} \times T_0 \times V_{\text{г.ф.}})}{(P_0 \times 22.4 \times T_1 \times V_{\text{ж.ф.}})} \times 1000,$$

где P_1 — парциальное давление газа, (%/100); $V_{\text{ж.ф.}}$ — объем жидкой фазы во флаконе, мл; $V_{\text{г.ф.}}$ — объем газовой фазы во флаконе, мл; T_0 — температура при нормальных условиях, 273°K; T_1 — рабочая температура, °K; P_0 — давление при нормальных условиях, 1 атм.; $P_{\text{общ.}}$ — общее давление во флаконе, атм.; 22.4 — объем 1 моль газа при 273°K, л·моль⁻¹. При этом делали допущение, что весь газ, образовавшийся в культуральной жидкости, выходит в газовую фазу флакона.

Гравиметрия. Образцы пластика извлекали из флаконов, трижды промывали дистиллированной водой, помещали в 2% раствор додецилсульфата натрия на 1 ч на ротационный шейкер со 160 об./мин при 30°С, после чего снова трижды промывали водой и сушили 24 ч в открытых чашках Петри в термостате при температуре 55°С. Отмытые и высушенные образцы взвешивали на электронных весах ER-60A (“A&D”, Япония).

Световая микроскопия. Морфологию микроорганизмов исследовали путем приготовления препаратов живых и фиксированных окрашенных фуксином клеток (ФОП) и их просмотра в световом микроскопе Биолам 2 (“ЛОМО”, Россия). Количество частиц микропластика определяли подсчетом в камере Горяева—Тома при просмотре в том же световом микроскопе при увеличении $\times 40$ с последующим пересчетом на объем культуральной жидкости.

Сканирующая электронная микроскопия. Препараты клеток для сканирующей электронной микроскопии подвергали фиксации 2.5% глутаровым альдегидом на фосфатном буфере в течение 30 мин, затем дегидрировали в этиловом спирте с постепенным увеличением концентрации (30, 50, 70, 80 и 99.5%) и последующим погружением в смеси абсолютного спирта и ацетона в пропорциях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3. Препараты выдерживали в абсолютном ацетоне на протяжении 12 ч, затем высушивали в критической точке с использованием оборудования HCP-2 Critical Point Dryer (“Hitachi”, Япония) и покрывали смесью Au—Pd в ионно-распылительной установке Eiko IB-3 Ion Coater (“Hitachi”, Япония).

Образцы ВПС подвергали напылению смесью Au—Pd без процедуры сушки, в связи с неустойчивостью материала к используемым в методике растворителям. Анализ образцов проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (“Jeol”, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме регистрации вторичных электронов.

Определение состава микробного сообщества. Состав микробного сообщества анализировали с помощью высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S рРНК. Следуя инструкциям производителя, выделяли из проб тотальную ДНК (набор FastDNA Spin Kit for Soil; “MP Biomedicals”, США) и оценивали концентрацию и чистоту препаратов ДНК спектрофотометрически на приборе NanoDrop 2000C (“Thermo Fisher Scientific”, США) при λ 260 и 280 нм. Амплификацию фрагментов генов 16S рРНК проводили с помощью ПЦР, используя “универсальные” праймеры для участка V4 по методике Fadrosch et al. (2014). Применяли систему праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Hugert et al., 2014) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3') (Merkel et al., 2019). Полученные ПЦР-фрагменты секвенировали на платформе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реактивов для считывания 150 нуклеотидов с каждого конца. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили при помощи программного пакета QIIME2 (Bolyen et al., 2019). Относительное количество прочтений, входящих в ту или иную ОТЕ, соответствует относительной представленности данного таксона микроорганизмов в исследуемом микробном сообществе. Статистические подсчеты осуществляли с помощью Microsoft Excel. Тепловые карты для сравнительного анализа филогенетического состава микробных сообществ генерировали с помощью платформы ClustVis — <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/> (Metsalu, Vilo, 2015).

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Для каждой точки вычисляли среднее значение, которое сравнивали по показателям стандартного отклонения и доверительного интервала при $P \leq 0.005$. На графиках представлены значения в виде “среднее $\pm$ среднее отклонение”. Вычисления проводили в программе Microsoft Excel 2007 (“Microsoft”, США) и STATISTICA (StarSoft Россия, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех донорно-акцепторных условиях в вариантах с ВПС наблюдали помутнение среды (доп. материалы, рис. S1), тогда как в контрольных вариантах без пластика среда оставалась прозрачной.

В МГ условиях во флаконах с ВПС формировался мелкий рыхлый черный осадок, в то время как без ВПС образовавшийся осадок в виде плотных агрегатов клеток имел светло-бежевый цвет.

В НР условиях в присутствии ВПС наблюдали образование мелкого плотного бежевого осадка и его последующее превращение в черный рыхлый осадок, в то время как в контрольном варианте без пластика осадок в виде плотных агрегатов сначала имел яркий рыжий цвет, а затем стал бежевым.

В СР условиях в присутствии ВПС образование мелкого черного рыхлого осадка происходило в большем количестве, чем в контрольном варианте без пластика.

В вариантах микробного сообщества, инкубируемых без пластика, значение pH составляло 7.7–8.2 и существенно не изменялось на протяжении всего времени эксперимента. В вариантах с добавлением ВПС во всех донорно-акцепторных условиях на 99-е сут происходило некоторое снижение pH (до 6.3–7.0), вероятно, связанное с образованием ЛЖК. Схожее снижение pH с 7.0 до 6.8 было показано Naz et al. (2013) при культивировании активного ила очистных сооружений с фрагментами упаковочного материала на основе ПС в стеклянных флаконах объемом 2892 мл в анаэробных условиях в течение 9 нед., что авторы также связывают с накоплением кислых продуктов.

Содержание белка в вариантах с ВПС на протяжении эксперимента немного превышало содержание в вариантах без ВПС, к 267 сут в вариантах с СР и МГ условиями разница резко увеличилась, в случае НР условий разница увеличилась к 307 сут эксперимента (рис. 2).

Сходный характер кривой содержания белка получен в исследовании процесса формирования биопленки аэробным штаммом *Bacillus megaterium* на поверхности ПС. К третьему дню культивирования в опыте содержание белка достигло пика в 91.1 мкг/мл, но к десятому дню резко снизилось до минимального значения в 46.4 мкг/мл. Последующее культивирование в течение 40 сут показало устойчивый медленный рост содержания белка до 64.7 мкг/мл. Авторы связывают

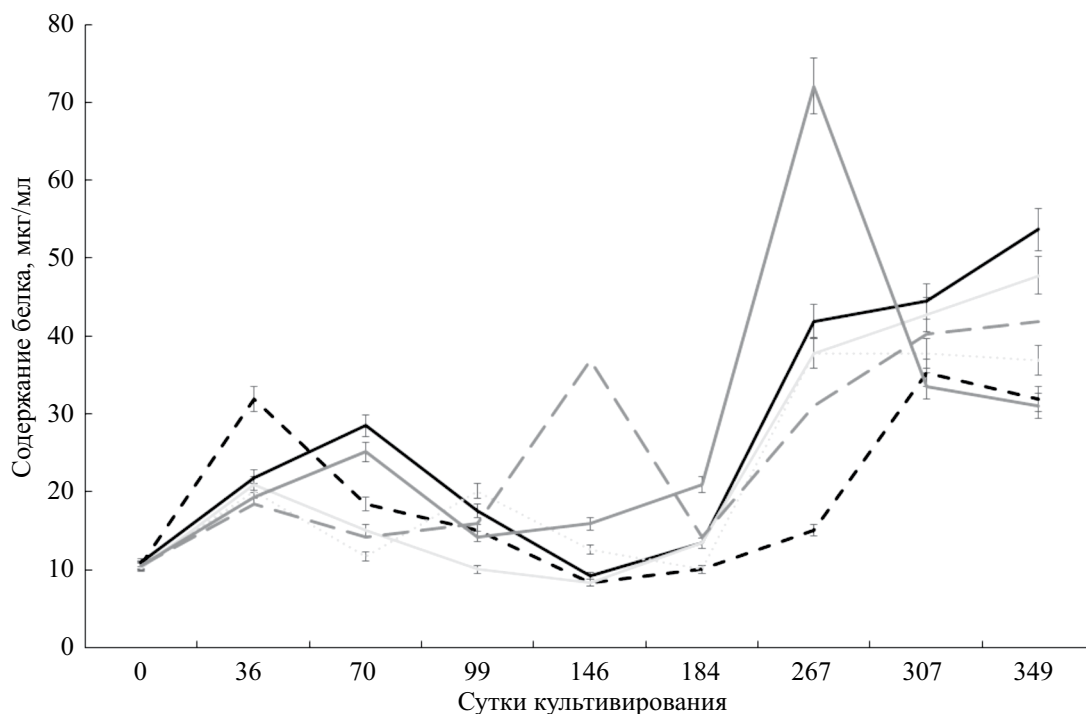


Рис. 2. Содержание белка в сообществе ЕР в МГ (черный цвет), НР (светло-серый цвет) и СР условиях (темно-серый цвет); сплошная линия — опыт в присутствии ВПС; пунктирная линия — биологический контроль.

колебания в содержании белка с быстрой пролиферацией клеток при прикреплении к поверхности пластика, гибелью клеток в процессе адаптации к ПС в качестве единственного источника углерода и медленным ростом адаптированных клеток (Tan et al., 2021).

Определение промежуточных летучих продуктов в анаэробных микробных сообществах, контактирующих с ВПС, показало, что в МГ условиях с ВПС образуется на 120.3% больше формиата по сравнению с аналогичным микробным сообществом без добавления пластика. В НР и СР условиях с ВПС разница в образовании формиата составила до 39.8 и 13.8% соответственно (доп. материалы, рис. S2). Образование ацетата в присутствии ВПС превышало показатели по сравнению с аналогичным микробным сообществом без добавления пластика в МГ условиях на 18.7%, в НР — до 23.5%, в СР — до 21.6% (доп. материалы, рис. S3). Продукция пропионата в контакте с ВПС отличалась на 10.2% в МГ условиях, до 8.1% в НР и до 61.3% в СР условиях (доп. материалы, рис. S4). Разница в образовании валерата в присутствии ВПС по сравнению с аналогичным микробным сообществом без добавления пластика составляла до 113.6% в МГ, до 49.4% в НР и до 43.2% в СР условиях (доп. материалы, рис. S5).

Также во всех донорно-акцепторных условиях сообщества, контактировавшие с ВПС, в отличие от контрольных образцов показали наличие следов изобутирата и бутирата.

Можно отметить, что присутствие ВПС вызывает значимые отклонения в содержании и соотношении ЛЖК по сравнению с контрольными образцами без пластика. На 340 сут в опытных образцах наблюдали большее количество формиата, ацетата, пропионата и валерата. Это соответствует результатам измерения pH, показывающим закисление среды. Сходная тенденция показана в работе Zhang et al. (2021b) по изучению влияния пластмасс на производительность реактора и микробные сообщества при ацидогенной ферментации пищевых отходов. В опыте длительностью 25 сут добавление полиэтилена высокого давления и ВПС увеличили общий выход ЛЖК на 28 и 47% соответственно, в то время как добавление полипропилена и полиэтилентерефталата снижало общую продукцию ЛЖК на 6 и 2%. Наибольший выход в присутствии ВПС авторы связывают с высокопористой структурой материала, обеспечивающей эффект иммобилизации клеток микроорганизмов. Также существуют работы, демонстрирующие индуцирующее влияние наночастиц ПС на продукцию ЛЖК

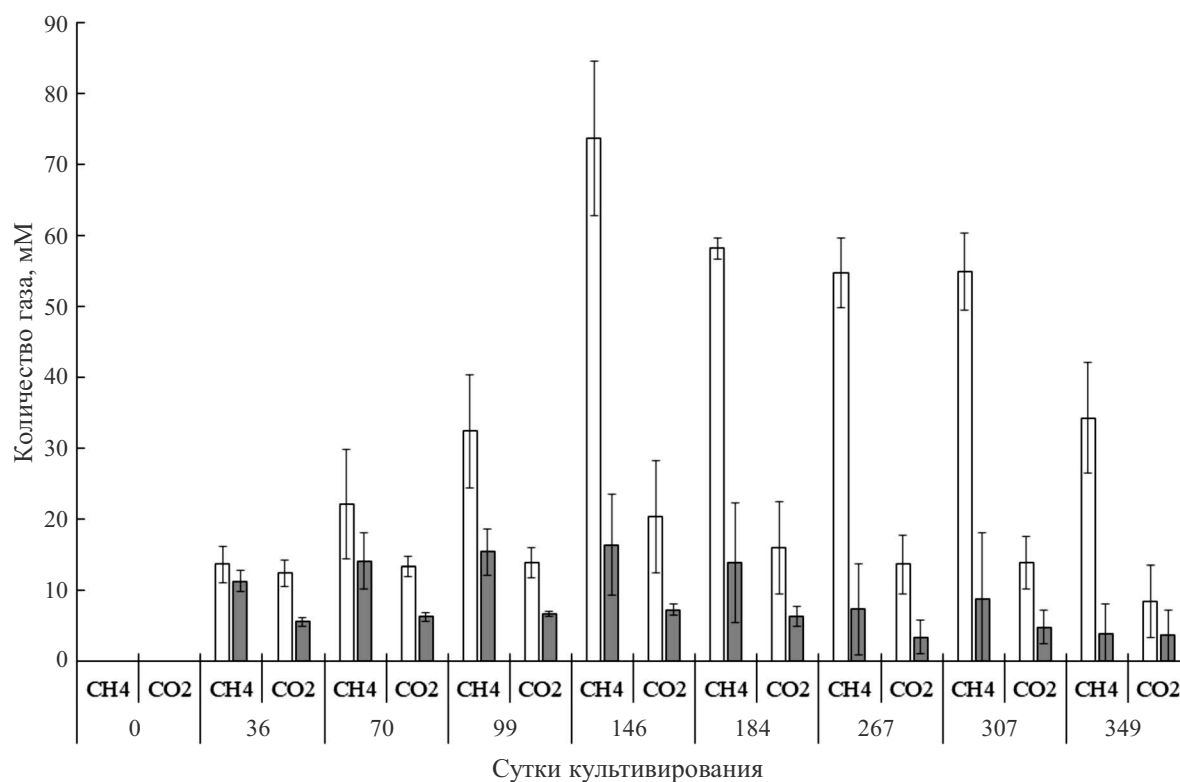


Рис. 3. Динамика образования газов во флаконах с сообществом ЕРa в МГ условиях: белые столбики — опыт в присутствии ВПС, серые — биологический контроль.

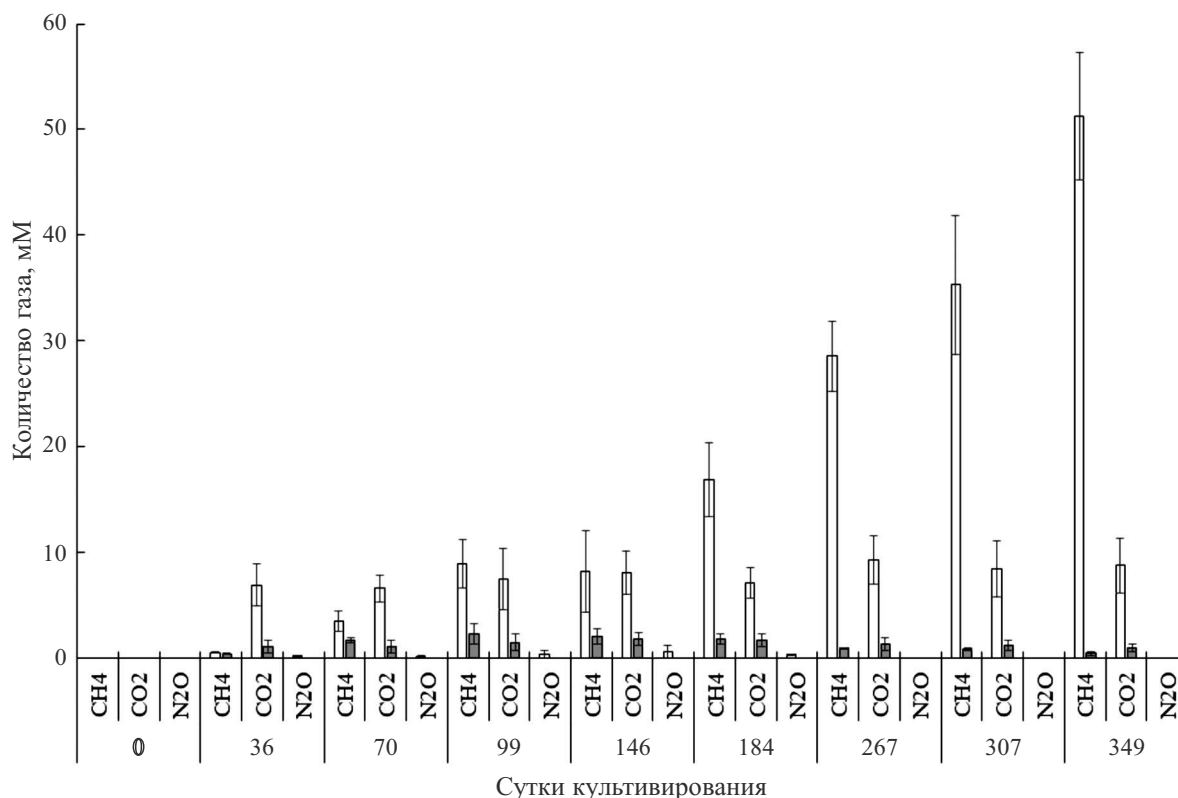


Рис. 4. Динамика образования газов во флаконах с сообществом ЕР в НР условиях: белые столбики — опыт в присутствии ВПС, серые — биологический контроль.

в анаэробных реакторах на величины порядка 22.6% с сопутствующим падением выхода биогаза на 67.1% (Wei et al., 2020). В работе Wang et al. (2022) показаны обратные результаты, согласно которым присутствие микро- и наночастиц ПС в реакторе приводит к снижению суммарной продукции ЛЖК до 38.3% и снижению уровня метана на 67.1%.

Обнаружено, что в присутствии ВПС у анаэробного микробного сообщества изменяется количество образованных конечных газообразных продуктов. Показано, что микробное сообщество в МГ условиях в контакте с пластиком продуцирует в 9 раз больше CH_4 и в 2.3 раза — CO_2 , чем в контрольных флаконах. Наибольшую разницу наблюдали на 146 сут культивирования, однако впоследствии она сократилась (рис. 3).

В НР условиях разница в продукции CH_4 для сообщества с ВПС составила до 100 раз, а CO_2 — до 8.8 раза. Наибольшая разница в содержании метана возникла на 349 сут культивирования и составила 50 мМ этого газа. Также в вариантах с пластиком был обнаружен предположительно N_2O в количестве до 0.6 мМ. Содержание N_2O росло до 146-х сут, затем стало падать, и с 267 сут этот газ перестал определяться в пробах из-за истощения нитрата в среде (рис. 4).

В СР условиях в первые 2 мес. количество CH_4 во флаконах с ВПС было в 1.6 раза меньше по сравнению с его количеством в контрольных флаконах, однако в конце опыта наблюдали образование CH_4 на 70% выше, чем в контроле (рис. 5).

Наибольшая разница возникла на 349-е сут культивирования и составила 22.9 мМ метана. Продукция CO_2 в СР условиях с ВПС превышала данные показатели для вариантов без пластика на 10% и это соотношение сохранялось на протяжении всего опыта. Сероводород появился в пробах только после 70 сут культивирования, и его количество во флаконах с ВПС продолжало расти за время опыта. В среднем содержание сероводорода в образцах с пластиком было в 2.5–3 раза выше, чем в контрольных вариантах.

Выход биогаза используется в качестве аналитического параметра для определения конечной биоразлагаемости полимеров в международных стандартах. На количественный выход биогаза влияет множество факторов, таких как время культивирования, закисление среды вследствие накопления ЛЖК, избыточное содержание белка, приводящее к ингибированию метаногенов аммонием (Ножевникова и соавт., 2016). Воздействие ПС и ВПС на продукцию биогаза изучено недостаточно.

Большее внимание уделяется влиянию микро- и нанопластиков, однако существующие литературные данные противоречивы. Воздействие микрочастиц ПС размером 80 нм и 5 мкм в концентрации 0.2 г/л и менее не влияло на кумулятивную продукцию CH_4 , но концентрации выше 0.25 г/л снижали выход метана на 19.3 и 17.9% соответственно (Zhang et al., 2020). При этом анализ влияния наночастиц ПС показал подавление ацидогенеза в микробном сообществе путем ингибирования активности ацетаткиназы с последующим уменьшением выработки CH_4 (Wang et al., 2022). Выдвигаются предположения о дозозависимом эффекте ПС, например, добавление 20–40 микрочастиц ПС на 1 г веса сухого анаэробного ила увеличило выход метана на 3.38–8.22%, но в дозе 80–160 микрочастиц привело к снижению продукции метана на 4.78–11.04% (Zhao et al., 2023).

В нашей работе показано, что присутствие ВПС в микробном сообществе не оказывает негативного влияния на процесс метанообразования. Напротив, наблюдающееся увеличение количества газов, как конечных продуктов в вариантах с добавлением пластика по сравнению с вариантами без него, в разных донорно-акцепторных условиях может свидетельствовать о частичной деструкции ВПС и возможности его минерализации до CH_4 и CO_2 .

Также это говорит о функциональных изменениях анаэробного микробного сообщества при контакте с данными пластиковыми отходами.

По результатам гравиметрии убыль массы образца ВПС составила 2.3% в НР условиях на 349 сут эксперимента. Для вариантов в СР и МГ условиях показатели были нестабильными, в связи с чем невозможно достоверно подтвердить убыль массы данных образцов. Это вызвано такой особенностью гравиметрического метода, как низкая чувствительность при маленьких значениях измерений. Исследователи также отмечают сложность достижения необходимой степени очистки образца, особенно для таких пористых материалов, как ВПС (Muller, 2005). Также потеря массы может быть связана с исчезновением летучих и растворимых примесей (Lucas et al., 2008). Следует отметить, что гравиметрия затрагивает только ранние стадии процесса биоразложения, но не дает информации о степени минерализации (Zee, 2005). По литературным данным для ПС характерна малая скорость разложения. Syranidou et al. (2017) показали убыль массы ПС на 0.19–4.7% спустя 12 мес. инкубации с различными морскими микробными сообществами и пленками ПС в качестве единственного источника углерода и энергии. В реакторе с анаэробным микробным

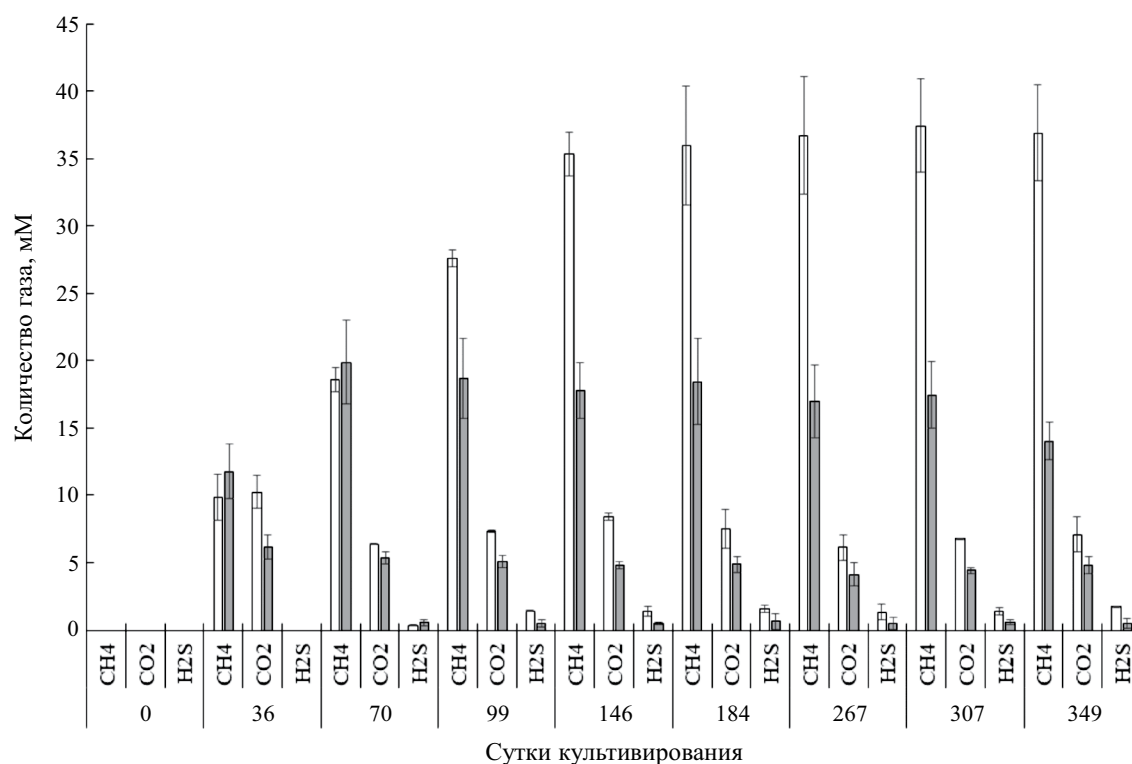


Рис. 5. Динамика образования газов во флаконах с сообществом ЕР в СР условиях: белые столбики — опыт в присутствии ВПС, серые — биологический контроль.

сообществом удалось достичь биодеструкции ВПС до 6.3% за 25 сут (Zhang et al., 2021b).

Для первоначальной оценки биоразложения также используют визуальное наблюдение за структурой поверхности полимера (появление шероховатости, образование отверстий и трещин, изменение цвета) и методы микроскопии — сканирующей электронной, атомно-силовой, поляризационной (Ва Но, 2018). В эксперименте с микробным сообществом ЕРа показано, что поверхность пластика во всех опытных вариантах стала более рыхлой, рельефной, появились неровности, трещины и отверстия (рис. 6).

Различия на поверхности полимеров также обнаружены при сравнении необработанных и обработанных микроорганизмами морского сообщества пленок ПС (Syranidou et al., 2017). Образцы, выветренные естественным путем, имели более гладкую поверхность без трещин и отверстий, в то время как инкубация с морскими консорциумами привела к увеличению шероховатости и появлению

множества трещин. Naz et al. (2013) показали образование биопленки сообществом активного ила на поверхности ПС спустя 9 нед. инкубации как в аэробных, так и в анаэробных условиях, сопровождаемое структурными изменениями поверхности материала. Отмечено, что на частицах ПС образуется более толстая микробная биопленка, чем на других пластиках, таких как полиэтилен и полипропилен. Авторы связывают это с пористостью материала и большим количеством складок (Shi et al., 2022).

В культуральной жидкости вариантов с ВПС присутствовало довольно большое количество микрочастиц черного цвета и разного размера (рис. 7): в НР условиях — 2.4×10^6 /мл, в СР условиях — 1.2×10^6 /мл и в МГ условиях — 0.4×10^6 /мл. В большинстве случаев они обнаруживались в составе скоплений клеток, но иногда встречались и в свободном состоянии. В контрольных вариантах (без клеток) микрочастицы обнаружены не были.

Известно, что микро- и наночастицы пластика образуются в результате фрагментации

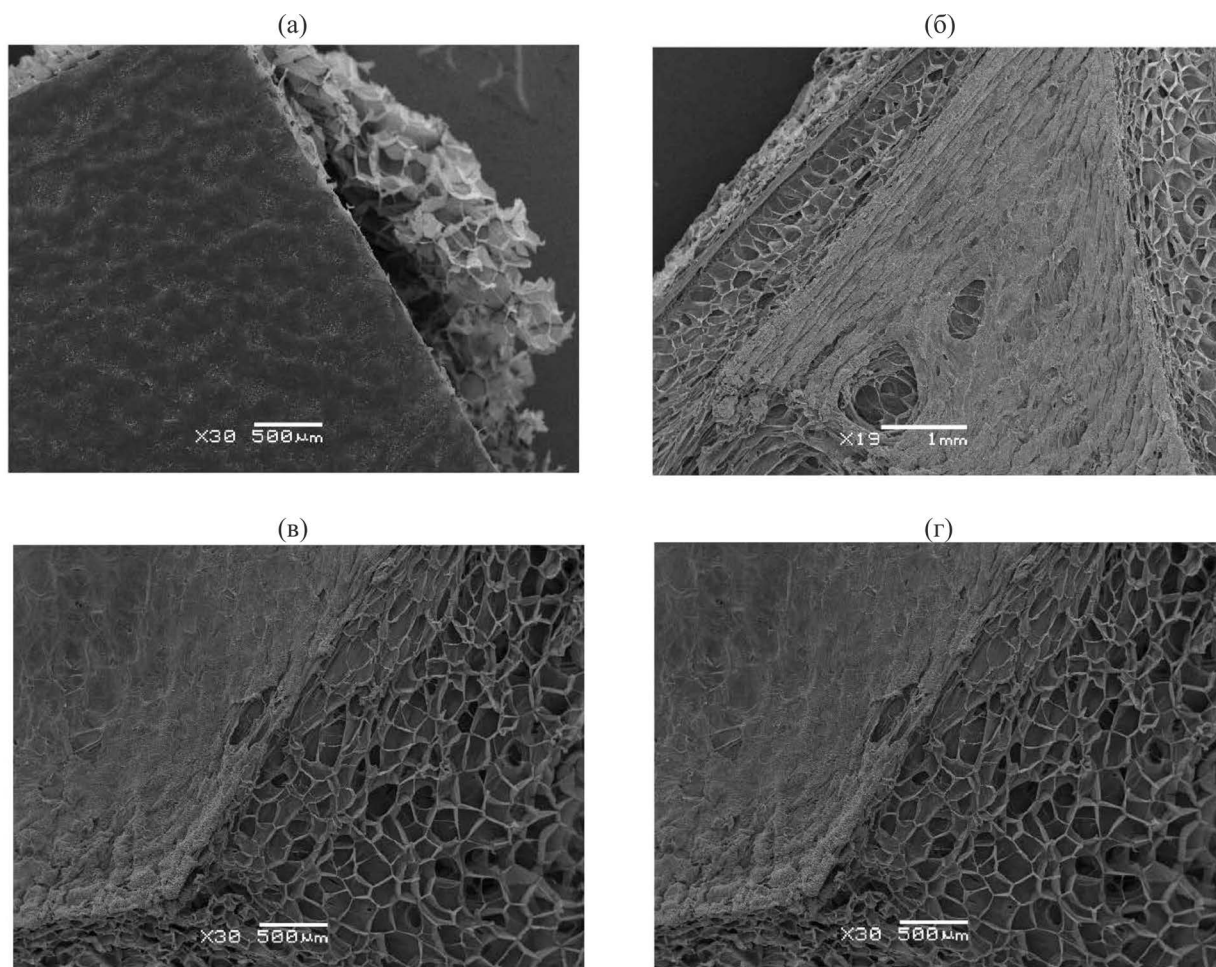


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия поверхности ВПС: а — химический контроль (среда без клеток); б — МГ условия; в — НР условия; г — СР условия. Увеличение $\times 30$.

пластикового мусора, происходящей под действием абиотических и биотических факторов (Zhang et al., 2021a). Однако свидетельства образования микропластика в процессе микробной биodeградации недостаточно представлены в литературе. Мы полагаем, что под действием анаэробного микробного сообщества происходит медленная частичная деструкция пластинки ВПС путем фрагментации с образованием микрочастиц данных отходов, что еще раз показывает экологическую опасность пластикового загрязнения. Поскольку на начальных стадиях процесса производства вспененного полистирола образуется гомогенная масса, состоящая из стирола и различных красителей и добавок, которая затем подвергается полимеризации и отверждению, то обнаруженные твердые микрочастицы могут содержать все эти вещества и/или интермедиаты их деструкции. Для определения химического состава микрочастиц требуются дальнейшие исследования, однако,

так как в химическом контроле (варианте без клеток) микрочастиц не обнаружено, то их наличие в опытных вариантах свидетельствует, что такая фрагментация пластинки ВПС — это результат деятельности микроорганизмов.

В процессе культивирования микробного сообщества в контакте с ВПС наблюдали его морфологические изменения. Так, по данным световой и сканирующей электронной микроскопии исходное сообщество было представлено различными типами палочек и кокков, объединенных в агрегаты темного цвета, с преобладанием крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек и коккобацилл, лежащих попарно (доп. материалы, рис. S6). В МГ условиях в присутствии пластика отмечено исчезновение крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек, появление значительно количества крупных кокков в скоплениях и по

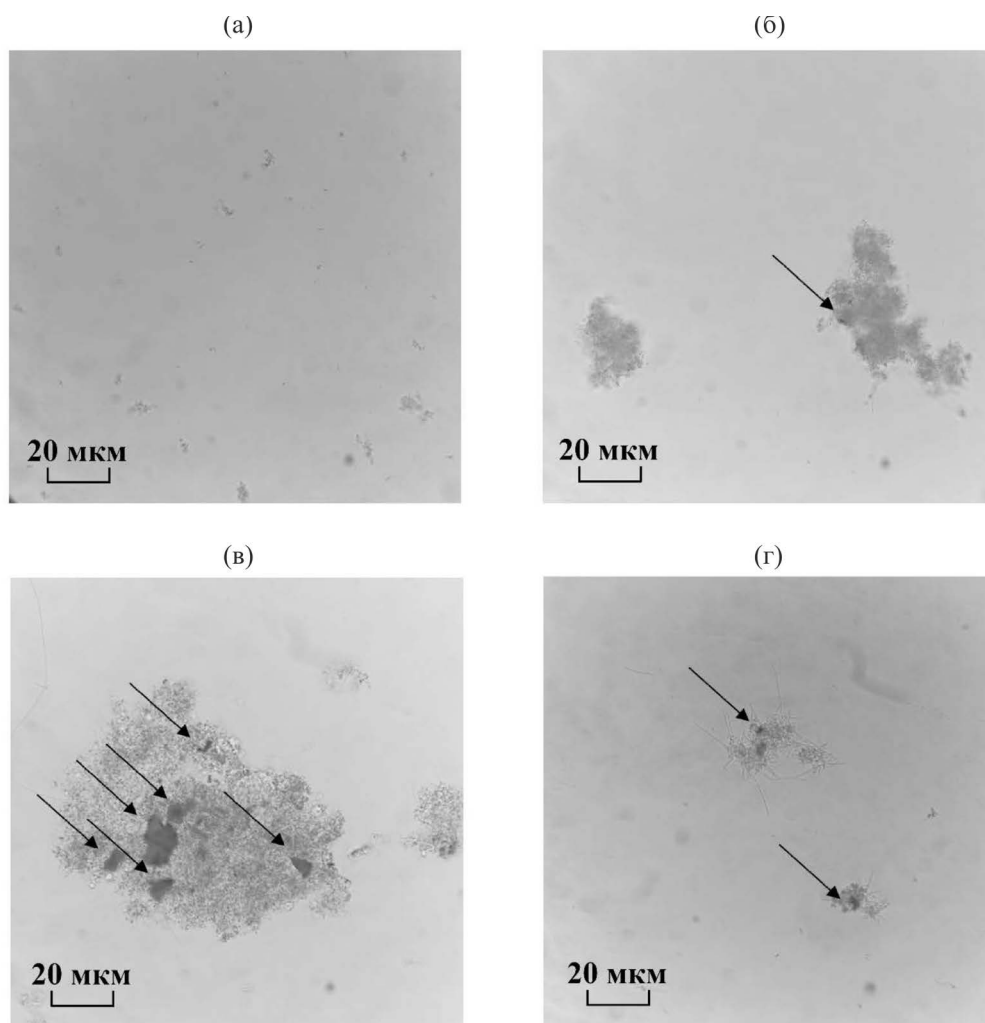


Рис. 7. Световая микроскопия культуральной жидкости микробного сообщества в присутствии ВПС: а — химический контроль; б — МГ условия; в — НР условия; г — СР условия. Увеличение $\times 400$.

отдельности, а также крупных, среднего размера и коротких палочек (доп. материалы, рис. S7). В НР условиях с ВПС в микробном сообществе также отмечено исчезновение крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек. Обнаружено большое количество изогнутых палочек, кокки среднего и маленького размера, отдельные короткие палочки (доп. материалы, рис. S8). В варианте, инкубировавшемся в СР условиях с пластиком, было отмечено наличие изогнутых клеток, а также крупных палочек, крупных и мелких кокков, расположенных отдельно и в скоплениях (доп. материалы, рис. S9). Рост разнообразия в микробном сообществе, представленный увеличением числа микробных морфотипов, коррелирует с результатами профилирования по гену 16S рРНК.

Анализ филогенетического разнообразия микробных сообществ до и после контакта с ВПС, проведенный с помощью высокопроизводительного секвенирования, показал, что в исходном

метаногенном сообществе, адаптированном к 2-АБК, значительно преобладают представители родов *Lysinibacillus* (48.0%), *Brevibacillus* (19.9%), *Clostridium* (5.6%), и *Sedimentibacter* (5.2%) (рис. 8).

Домен *Bacteria* при пороге отсека 1% представлен 20-ю таксономическими группами. Представители домена *Archaea* совокупно составляют 0.025%. При внесении ВПС во всех вариантах (НР, МГ, СР) повысилась степень разнообразия сообщества, при этом доля домена *Archaea* выросла до 1.7–6.0%, а бактерий родов *Lysinibacillus* и *Brevibacillus* — упала до 0.1–0.3%. В сообществе в МГ, НР и СР условиях выявлено 29, 35 и 35 групп соответственно. В МГ условиях преобладающими стали *Sedimentibacter* (15.6%), в НР — *Lentimicrobium* (19.3%), в СР — новая группа *Desulfovibrio* (36.1%). Кроме того, зафиксировано появление новых групп: рода *Syntrophomonas* (10.2%) и сем. *Spirochaetaceae* (8.0%) в МГ условиях, рода *Desulfotobacterium* (6.9%), сем. *Spirochaetaceae* (5.8%), *Geobacteraceae* (7.5%) и *Rikenellaceae*

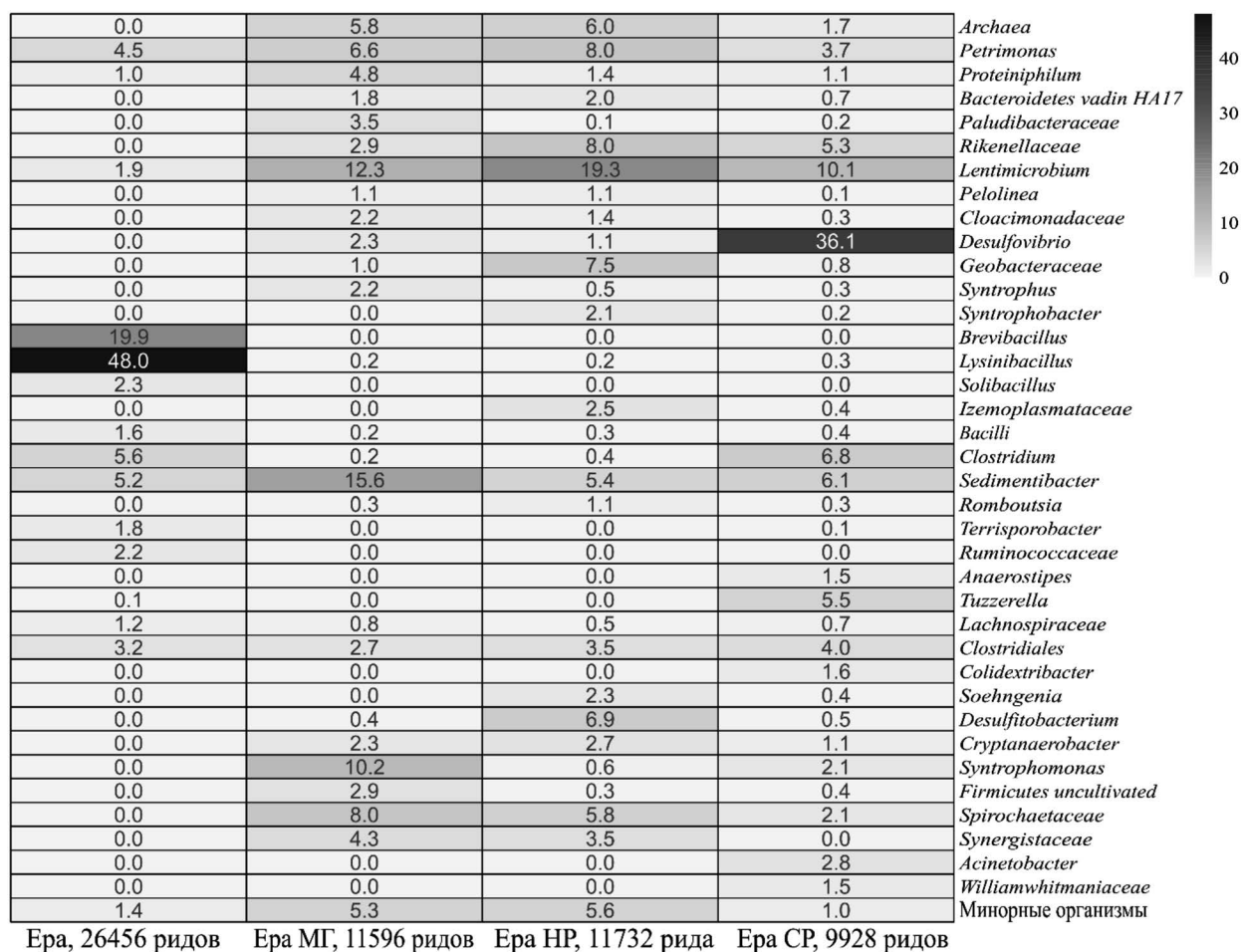


Рис. 8. Тепловая карта распределения 38 доминантных таксономических единиц бактерий и архей по 4 библиотекам, представляющим микробные сообщества до и после контакта с ВПС. Представленность родов рассчитана как отношение количества ридов, принадлежащих представителям данного рода, к общему количеству ридов в соответствующей библиотеке.

(8.0%) в НР условиях и сем. *Rikenellaceae* (5.3%) в СР условиях.

В архейном компоненте сообщества в возрастании доли метаногенов до 2–6% ключевую роль сыграли представители родов *Methanobacterium* и *Methanosarcina* (рис. 9).

Представители преобладающих таксонов известны как деструкторы ряда сложных органических веществ и ксенобиотиков. Например, *Sedimentibacter* является деструктором хлорорганических и полициклических соединений (Berdugo-Clavijo et al., 2012; Gomes et al., 2014), *Syntrophomonas* известен способностью к деградации бутирата (Crabbe et al., 2016; Wang et al., 2023), для *Lentimicrobium* показана микробная биodeградация битума, а также антибиотиков сульфаметоксазола и триметоприма (Liang et al., 2019; Pannekens et al., 2021; Song et al., 2021). Хорошо изученным является род сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio*, способный к биоразложению фенантрена и пирена, нитроцеллюлозы, различных фракций сырой нефти (Kim et al., 1995; Giacomucci et al., 2012; Dhar et al., 2023).

Кроме того, известно, что по сравнению с отдельными штаммами микробные сообщества, благодаря синтрофным взаимодействиям, способны более эффективно усваивать сложные субстраты, в том числе химически стабильные и инертные вещества. В процессе анаэробного разложения выделяют следующие стадии: гидролиз, ацидогенез, ацетогенез и метаногенез (Logan et al., 2019; Литти и соавт., 2022). Среди доминирующих в исследуемом сообществе групп гидролитическими и ацидогенными являются представители родов *Lentimicrobium* и *Sedimentibacter*. К представителям синтрофных микроорганизмов, осуществляющих ацетогенную стадию разложения продуктов брожения до ацетата, относятся синтрофные бактерии родов *Syntrophomonas*, *Desulfovibrio* и *Geobacter*. Накопленные ацетат, молекулярный водород и углекислоту метаболизируют в метан археи родов *Methanobacterium* и *Methanosarcina*.

Ряд работ также регистрирует значительные сдвиги в составе микробных сообществ анаэробного ила, морской воды, почвы, полигона твердых бытовых отходов в присутствии ВПС, ПС или микрочастиц ПС, выражающиеся в смене доминирующих видов и росте таксономического разнообразия (Naz et al., 2013; Syranidou et al., 2017; Tourova et al., 2020; Choi et al., 2021; Vaksmaa et al., 2021; Zhang et al., 2021b). Аналогичные изменения в микробном компоненте экосистем вызывают и другие синтетические полимерные материалы (Журина и соавт., 2022). Таким образом, наши исследования показывают, что отходы ВПС не являются инертными для микробного сообщества, и контакт с ними приводит к существенным перестройкам его структуры.

Микробные сообщества, благодаря лабильному метаболизму, представляют собой ключевой элемент механизма эффективного самоочищения окружающей среды от ксенобиотиков, представленных сложными органическими веществами. Деструкция может выражаться в трансформации, фрагментации и полной минерализации загрязнителя. Внесение полимерных загрязнителей-ксенобиотиков и попадание интермедиатов их деструкции в окружающую среду может приводить к сдвигам в составе и функционировании микробных сообществ, что отразится на экосистеме в целом. Показано, что присутствие отходов ВПС не является безразличным для анаэробного микробного сообщества. В разных донорно-акцепторных условиях наличие отходов из этого пластика приводит к увеличению выделения газов, образования белка и летучих жирных кислот, снижению pH среды и сукцессии сообщества со сменой доминирующих групп и увеличением доли метаногенных архей. Обнаруженные изменения поверхности образца ВПС, появление микрочастиц и различия в составе промежуточных и конечных продуктов метаболизма сообщества могут свидетельствовать о медленной частичной деструкции этого вида отходов. Однако поскольку для опытов были взяты отходы бытового

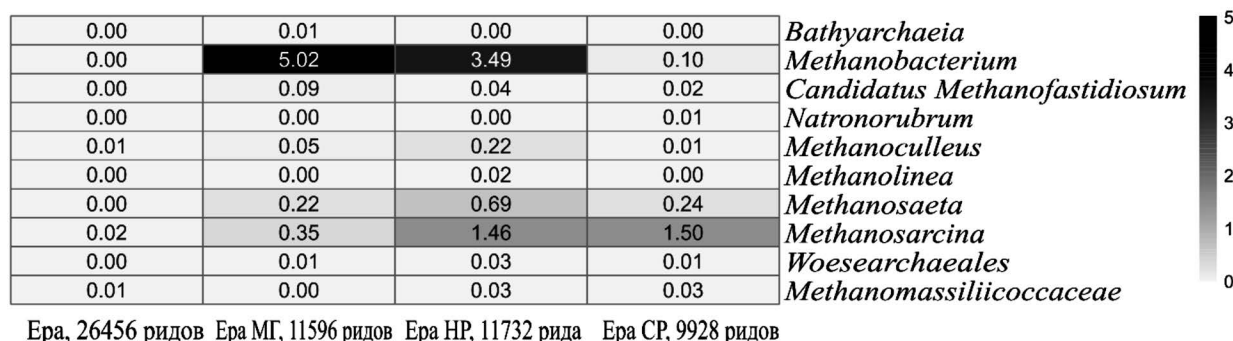


Рис. 9. Тепловая карта распределения 10 доминантных таксономических единиц архей по 4 библиотекам, представляющим архейный компонент микробных сообществ до и после контакта с ВПС. Представленность родов рассчитана как отношение количества ридов, принадлежащих представителям данного рода, к общему количеству ридов в соответствующей библиотеке.

ВПС, то есть вероятность, что наряду с полимером полистирола деградации подвергаются и входящие в его состав наполнители (пластификаторы, красители и т.д.). Способность микроорганизмов к деградации самого полистирола требует дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования методом СЭМ были проведены с использованием оборудования ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300094-7.

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

- Бакирова И.Н., Зенитова Л.А. Газонаполненные полимеры: Учебное пособие. Казань: Изд-во Казан. гос. технол. ун-та, 2009. 105 с.
- Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов: коллективная монография / Общая ред. и составл. А.Н. Ножевникова, А.Ю. Каллистова, Ю.В. Литти, М.В. Кевбрина. М.: Университетская книга, 2016. 320 с.
- Журина М.В., Богданов К.И., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Плакунов В.К. Микропластики — новая экологическая ниша в пластисфере для мультиспециевых микробных биопленок // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 131–149.
- Zhurina M.V., Bogdanov K.I., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Plakunov V.K. Microplastics as a new ecological niche for multispecies microbial biofilms within the plastisphere // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 107–123.
- Клинов А.С., Беляев П.С., Скуратов В.К., Соколов М.В., Однолько В.Г. Утилизация и вторичная переработка тары и упаковки из полимерных материалов: учебное пособие. Тамбов: Изд-во Тамбовского гос. техн. ун-та, 2010. 100 с.
- Котова И.Б., Тактарова Ю.В., Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Бубнов И.А., Малахова Д.В., Ширинкина Л.И., Соколова Т.Г., Бонч-Осмоловская Е.А. Микробная деградация пластика и пути ее интенсификации // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 627–659.
- Kotova I.B., Taktarova Y.V., Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Bubnov I.A., Malakhova D.V., Shirinkina L.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Sokolova T.G. Microbial degradation of plastics and approaches to make it more efficient // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 671–701.
- Линькова Ю.В., Дьяконова А.Т., Гладченко М.А., Калюжный С.В., Котова И.Б., Стамс А., Нетрусов А.И. Метаногенная деструкция (амино)ароматических веществ анаэробными микробными сообществами // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 558–565.
- Lin'kova Y.V., Dyakonova A.T., Kotova I.B., Netrusov A.I., Gladchenko M.A., Kalyuzhnyi S.V., Stams A. Methanogenic degradation of (amino)aromatic compounds by anaerobic microbial communities // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. P. 507–514.
- Литти Ю.В., Русскова Ю.И., Журавлева Е.А., Паршина С.Н., Ковалев А.А., Ковалев Д.А., Ножевникова А.Н. Электрометаногенез — перспективная биотехнология анаэробной переработки органических отходов (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 1. С. 23–43.
- Litti Y.V., Russkova Y.I., Zhuravleva E.A., Parshina S.N., Nozhevnikova A.N., Kovalev A.A., Kovalev D.A. Electromethanogenesis: a promising biotechnology for the anaerobic treatment of organic waste // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 19–36.
- Малкин А.Я., Вольфсон С.А., Кулезнев В.Н., Файдель Г.И. Полистирол. Физико-химические основы получения и переработки. М: Химия, 1975. 288 с.
- Плакунов В.К., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Журина М.В. Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы деградации и способы защиты // Микробиология. 2020. Т. 89. №6. С. 631–645.
- Plakunov V.K., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Zhurina M.V. Biocorrosion of synthetic plastics: degradation mechanisms and methods of protection // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 647–659.
- Ярцев В.П., Андрианов К.А., Иванов Д.В. Физико-механические и технологические основы применения пенополистирола при дополнительном утеплении зданий и сооружений: учебное пособие. Тамбов: Изд-во ГОУ ВПО ТГТУ, 2010. 120 с.
- Ba Ho T., Roberts T.K., Lucas S. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach // Crit. Rev. Biotechnol. 2018. V. 38. P. 308–320.
- Berdugo-Clavijo C., Dong X., Soh J., Sensen C.W., Gieg L.M. Methanogenic biodegradation

- of two-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 81. P. 124–133.
- Billard J., Boucher G. The challenges of measuring plastic pollution // Field Actions Sci. Rep. 2019. V. 19. P. 68–75.
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodríguez A.M., Chase J., Caporaso J.G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 7. P. 248–254.
- Cao D., Wang X., Luo X., Liu G., Zheng H. Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. 3rd Int. conf. on Energy Materials and Environment Engineering. Thailand, Bangkok, 2017. Conf. Ser. P. 61.
- Chauhan D., Agrawal G., Deshmukh S., Roy S.S., Priyadarshini R. Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation // RSC Adv. 2018. V. 8. P. 37590–37599.
- Choi H.J., Ju W.J., An J.J. Impact of the virgin and aged polystyrene and polypropylene microfibers on the soil enzyme activity and the microbial community structure // Water Air Soil Pollut. 2021. V. 232. Art. 322.
- Crable B.R., Sieber J.R., Mao X., Alvarez-Cohen L., Gunsalus R., Ogorzalek L.R.R., Nguyen H., McInerney M.J. Membrane complexes of *Syntrophomonas wolfei* involved in syntrophic butyrate degradation and hydrogen formation // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 1795.
- Dhar K., Sudharsanam A., Tanmoy S., Kadiyala V., Malavarapu M. Anaerobic biodegradation of phenanthrene and pyrene by sulfate-reducing cultures enriched from contaminated freshwater lake sediments // Environ. Res. 2023. V. 235. Art. 116616.
- Fadrosch 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.
- Field D.T., Green J.L., Bennett R., Jenner L.C., Sadofsky L.R., Chapman E., Loubani M., Rotchell J.M. Microplastics in the surgical environment // Environ. Int. 2022. V. 170. Art. 107630.
- Giacomucci L., Toja F., Sanmartín P., Toniolo L., Prieto B., Villa F., Cappitelli F. Degradation of nitrocellulose-based paint by *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC13541 // Biodegradation. 2012. V. 23. P. 705–716.
- Gomes B.C., Adorno M.A., Okada D.Y., Delforno T.P., Lima Gomes P.C., Sakamoto I.K., Varesche M.B. Analysis of a microbial community associated with polychlorinated biphenyl degradation in anaerobic batch reactors // Biodegradation. 2014. V. 25. P. 797–810.
- Hidayat T.R., Indrawati I., Herlina T. Biodegradation styrofoam by soil bacteria from Sarimukti Cipatat Bandung final disposal site // AL-Kaunivah Jurnal Biologi. 2020. V. 13. P. 218–227. <http://dx.doi.org/10.15408/kaunivah.v13i2.14529>
- Hugert 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.
- Kim B.H., Kim H.Y., Kim T.S., Park D.H. Selectivity of desulfurization activity of *Desulfovibrio desulfuricans* M6 on different petroleum products // Fuel Process. Technol. 1995. V. 43. P. 87–94.
- Ko K., Chung H., Kim W., Kim M.-J. Effects of different sizes of polystyrene micro(nano)plastics on soil microbial communities // NanoImpact. 2023. V. 30. Art. 100460.
- Liang B., Kong D., Qi M., Yun H., Li Z., Shi K., Chen E., Vangai A.S., Wang A. Anaerobic biodegradation of trimethoprim with sulfate as an electron acceptor // Front. Environ. Sci. Engin. 2019. V. 13. Art. 84.
- Liu H., Yang X., Liu G., Liang C., Xue S., Chen H., Ritsema C.J., Geissen V. Response of soil dissolved organic matter to microplastic addition in Chinese loess soil // Chemosphere. 2017. V. 185. P. 907–917.
- Logan B.E., Rossi R., Ragab A., Saikaly P.E. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 307–319.
- Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo J.E. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques: a review // Chemosphere. 2008. V. 73. P. 429–442.
- 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.
- Metsalu T., Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 566–570.
- Mor R., Sivan A. Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*: biodegradation of polystyrene // Biodegradation. 2008. V. 19. P. 851–858.
- Muller R.-J. Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing // Biopolymers Online. 2005. V. 12. P. 365–388.
- Naz I., Batool S., Ali N., Khatoon N., Atiq N., Hameed A., Ahmed S. Monitoring of growth and physiological activities of biofilm during succession on polystyrene from activated sludge under aerobic and anaerobic conditions // Environ. Monit. Assess. 2013. V. 185. P. 6881–6892.
- Pannekens M., Voskuhl L., Mohammadian S., Köster D., Meier A., Köhne J.M., Kulbatzki M., Akbari A., Haque S., Meckenstock R.U. Microbial degradation

- rates of natural bitumen // *Environ. Sci. Technol.* 2021. V. 55. P. 8700–8708.
- Plastics Europe <https://www.plasticseurope.org/en/newsroom/events/2021>
- Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali O., Papa F., Rongioletti M.C.A., Baiocco F., Draghi S., D'Amore E., Rinaldo D., Matta M., Giorgini E. Plasticenta: first evidence of microplastics in human placenta // *Environ. Int.* 2021. V. 146. Art. 106274.
- Rillig M.C. Microplastic disguising as soil carbon storage // *Environ. Sci. Technol.* 2018. V. 52. P. 6079–6080.
- Ruimin Q., Jones D.L., Li Z., Liu Q., Yan C. Behavior of microplastics and plastic film residues in the soil environment: A critical review? // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 703. Art. 134722.
- Shi Y., Wang S., Wang H., Li Z., Cai J., Han Q., Zhao M. Diversity and succession of microbial communities on typical microplastics in Xincun Bay, a long-term mariculture tropical lagoon // *Int. J. Oceanogr. Hydrobiol.* 2022. V. 51. P. 10–22.
- Sklyar V., Kalyuzhnyi S., Mosolova T., Kucherenko I., Russkova J., Degtyarova N. Methanogenic biodegradation of aromatic amines // *Water Sci. Technol.* 2000. V. 42. P. 363–370.
- Song J., Hao G., Liu L., Zhang H., Zhao D., Li X., Yang Z., Xu J., Ruan Z., Mu Y. Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by *Sphingobacterium mizutaii* // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 23130.
- Syranidou E., Karkanorachaki K., Amorotti F., Franchini M., Repouskou E., Kaliva M., Vamvakaki M., Kolvenbach B., Fava F., Corvini P., Kalogerakis N. Biodegradation of weathered polystyrene films in seawater microcosms // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 17991.
- Tan K.M., Agzaz S.K., Noor A.B. *Bacillus megaterium*: a potential and an efficient bio-degrader of polystyrene // *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2021. V. 64. Art. 1190321.
- Tourova T., Sokolova D., Nazina T., Grouzdev D., Kurshiev E., Laptev A. Biodiversity of microorganisms colonizing the surface of polystyrene samples exposed to different aqueous environments // *Sustainability.* 2020. V. 12. Art. 3624.
- Vaksmas A., Knittel K., Asbun A.A., Goudriaan M., Ellrott A., Witte H.J., Vollmer I., Meirer F., Lott C., Weber M., Engelmann J.C., Niemann H. Microbial communities on plastic polymers in the Mediterranean Sea // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 673553.
- Vethaak A.D., Legler J. Microplastics and human health // *Science.* 2021. V. 371. P. 672–674.
- Vlácil A.-K., Banfer S., Jacob R., Trippel N., Kuzu I., Schieffer B., Grote K. Polystyrene microplastic particles induce endothelial activation // *PLoS One.* 2021. V. 16. Art. 260181.
- Wang C., Wei W., Zhang Y., Dai X., Ni B. Different sizes of polystyrene microplastics induced distinct microbial responses of anaerobic granular sludge // *Water Res.* 2022. V. 220. Art. 118607.
- Wang J., Ma D., Feng K., Lou Y., Zhou H., Liu B., Xie G., Ren N., Xing D. Polystyrene nanoplastics shape microbiome and functional metabolism in anaerobic digestion // *Water Res.* 2022. V. 219. Art. 118606.
- Wang T., Kuang B., Ni Z., Guo B., Li Y., Zhu G. Stimulating anaerobic degradation of butyrate via *Syntrophomonas wolfei* and *Geobacter sulfurreducens*: characteristics and mechanism // *Microb. Ecol.* 2023. V. 85. P. 535–543.
- Wei W., Qiang H., Zhijie C., Teng B., Bing-Jie N. Polystyrene nanoplastics reshape the anaerobic granular sludge for recovering methane from wastewater // *Water Res.* 2020. V. 182. Art. 116041.
- Zee M. Biodegradability of polymers: mechanisms and evaluation methods. Ch. 1. // *Handbook of biodegradable polymers.* Sawbury (UK): Rapra Technology Limited, 2005. 534 p.
- Zhang J., Zhao M., Chao L., Miao H., Huang Z., Dai X., Ruan W. Evaluation the impact of polystyrene micro and nanoplastics on the methane generation by anaerobic digestion // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. V. 205. Art. 110095.
- Zhang K., Hamidian A.H., Tubić A., Zhang Y., J.K.H., Wu C., Lam P.K.S. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: a review // *Environ. Pollut.* 2021a. V. 274. Art. 116554.
- Zhang L., Tsui T.-H., Loh K.-C., Dai Y., Tong Y.W. Effects of plastics on reactor performance and microbial communities during acidogenic fermentation of food waste for production of volatile fatty acids // *Biore-sour. Technol.* 2021b. V. 337. Art. 125481.
- Zhao W., Hu T., Ma H., He S., Zhao Q., Jiang J., Wei L. Deciphering the role of polystyrene microplastics in waste activated sludge anaerobic digestion: changes of organics transformation, microbial community and metabolic pathway // *Sci. Total Environ.* 2023. V. 901. Art. 166551.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Structural and Functional Characteristics of the Microbial Community Emerging upon Its Contact with Extruded Polystyrene Waste

L. I. Shirinkina^{1, *}, Y. V. Taktarova¹, M. A. Gladchenko¹, A. Y. Merkel², I. B. Kotova¹

¹ Moscow State University, Moscow, 119234, Russia

² Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

*e-mail: pro100tilka@gmail.com

Abstract. Increasing plastic pollution is a serious environmental problem as widespread production and inadequate disposal of plastic materials lead to adverse impacts on ecosystems. The research investigated the structural and functional features of the anaerobic microbial community in contact with waste from extruded polystyrene (XPS) under methanogenic (MG), nitrate-(NR) and sulfate-reducing (SR) conditions. It has been shown that the presence of XPS in the microbial community does not have a negative effect on the processes of biogas formation, but, on the contrary, leads to an increase in the yield of methane and volatile fatty acids and a change in their ratio. Microparticles of different sizes were found in the culture fluid of variants with XPS: in NR conditions – $2.4 \times 10^6/\text{ml}$, in SR conditions – $1.2 \times 10^6/\text{ml}$ and in MG conditions – $0.4 \times 10^6/\text{ml}$, while in control variants microparticles was not found. Using scanning electron microscopy, it was revealed that in all experimental variants the surface of the polymer became looser, more textured, and irregularities, cracks and holes appeared. Increased diversity in the microbial community, associated with an increase in the number of microbial morphotypes, correlates with the results of high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene. When XPS was introduced into an anaerobic community incubated in different donor-acceptor conditions, the number of groups of microorganisms included in it increased and the proportion of representatives of hydrolytic and acidogenic bacteria (*Sedimentibacter*, *Lentimicrobium*), acetogenic syntrophs (*Syntrophomonas*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*) and methanogenic archaea (*Methanosarcina*, *Methanobacterium*) increased. Our study shows that waste from XPS is not inert for the microbial community and contact with it leads to significant changes in its structure and functioning. However, since the experiments were carried out using household XPS containing various fillers in addition to the main polymer, there is a possibility that, along with polystyrene, additional substances included in its composition (plasticizers, dyes, etc.) are also subject to degradation. The ability of microorganisms to destroy the polymer itself requires further research.

Keywords: extruded polystyrene, anaerobic microbial community, methanogenesis, nitrate reduction, sulfate reduction

УДК 579.24+579.262

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМАМИ *LISTERIA*, *SALMONELLA* И *PSEUDOMONAS* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ И РОЛЬ ИХ СИНЕРГИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНОЧНОГО СООБЩЕСТВА

© 2024 г. Ю. К. Юшина^{а, *}, Е. В. Зайко^а, М. А. Грудистова^а, А. А. Семенова^а,
А. А. Махова^а, Д. С. Батаева^а, Е. В. Демкина^б, Ю. А. Николаев^б

^аФедеральный научный центр пищевых систем им. В.В. Горбатова РАН, Москва, 109316, Россия

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

*e-mail: yu.yushina@fncps.ru

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После исправления 07.02.2024 г.

Принята к опубликованию 13.02.2024 г.

Образование биопленок на абиотических поверхностях в пищевом секторе является серьезной проблемой для общественного здравоохранения. Фактически, биопленки представляют собой постоянный источник патогенов, таких как *Listeria monocytogenes* и бактерии рода *Salmonella* sp. Способность к образованию поливидовых биопленок патогенами и микроорганизмами порчи представляет серьезную опасность при производстве безопасной продукции и является одной из причин устойчивой циркуляции микроорганизмов в условиях мясоперерабатывающих предприятий. В ходе работы 46 выделенных из объектов производственной среды и пищевых продуктов штаммов микроорганизмов были протестированы на способность к формированию биопленок при различных температурах. Проанализированные патогенные штаммы (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp.) и микроорганизмы порчи (*Pseudomonas* sp.) обладали адгезией на абиотической поверхности с последующим формированием стойкой биопленки. Низкая положительная температура не являлась ограничивающим фактором в способности образовывать биопленки. Через 24 ч инкубирования представители бактерий родов *Listeria* и *Salmonella* sp. формировали стойкие биопленки при (4°C). Показана способность формировать биопленки на различных абиотических поверхностях, представленных в мясной промышленности (кафель, стекло, пластик). Было изучено синергетическое взаимодействие представителей родов *Listeria*, *Salmonella* и *Pseudomonas* при формировании смешанных биопленок при 4°C. Комбинации патогенного микроорганизма и представителя рода *Pseudomonas* значительно отличались по интенсивности формирования биопленок по сравнению с комбинациями из двух патогенов. Это указывает на значимость этого вида в синергетическом взаимодействии среди микроорганизмов.

Ключевые слова: биопленки, *Listeria monocytogenes*, объекты производственной среды, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp.

DOI: 10.31857/S0026365624050072

Одной из форм выживания микроорганизмов является их способность к формированию биопленок. Активное изучение проблемы началось в конце XX века, когда стало понятно, что многие заболевания вызваны полимикробными биопленками. До сих пор это направление активно развивается главным образом только в медицине. Биопленки представляют собой сложные экосистемы, обычно состоящие из более чем одного вида микроорганизмов, погруженных во множество внеклеточных

полимеров, в зависимости от взаимодействия между микробными клетками, поверхности фиксации и условий окружающей среды (Ferreira et al., 2014). По зарубежным оценкам перекрестное заражение в результате развития биопленок является риском, вызывающим 25% вспышек пищевых отравлений. Тем не менее до сих пор применяемые санитарные подходы на предприятиях по переработке продуктов питания не только позволяют биопленкам формироваться и созревать, но также

не могут обеспечить их удаление с поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами. Такие структуры обеспечивают защиту, адаптивность и устойчивость микроорганизмов, состоящих в этой матрице, становясь источником загрязнения окружающей среды на пищевых предприятиях и продуктов питания (Kadam et al., 2013; Lee et al., 2017). Бактерии в биопленках, как правило, хорошо защищены от воздействия окружающей среды и антимикробных веществ, таких как антибиотики (Hoiby et al., 2010), дезинфицирующие средства, и, как следствие, их чрезвычайно трудно уничтожить (Burmolle et al., 2010). Особую устойчивость представляют поливидовые биопленки (Wicaksono et al., 2022). Это связано с тем, что они генерируют межвидовые взаимодействия для обмена метаболитами, производства сигнальных молекул и генетического обмена, которые повышают устойчивость (Burmolle et al., 2014; González-Rivas et al., 2018).

Образование биопленок патогенами пищевого происхождения представляет серьезную проблему в пищевой промышленности. Патогенные микроорганизмы способны образовывать биопленки и сохраняться в течение длительного времени, способствуя загрязнению пищевых продуктов. *Salmonella* sp. и *Listeria monocytogenes* являются одними из наиболее важных возбудителей болезней пищевого происхождения во многих странах (Margas et al., 2014). Биопленки *L. monocytogenes* на поверхностях, контактирующих с пищевыми продуктами, были идентифицированы как важный путь персистенции патогенов и последующего загрязнения продукта (Pažin et al., 2018; Rodríguez-Campos et al., 2019). Иногда в сообществах биопленок присутствуют ключевые виды, которые, независимо от их доли, часто участвуют в стимулировании образования биопленки у других видов, а также в защите других членов сообщества от внешних стрессоров (Parijs, Steenackers, 2018; Karki et al., 2021). Бактерии, вызывающие порчу, такие как представители рода *Pseudomonas*, образуют биопленки, которые обеспечивают защитную матрицу для выживших патогенных клеток, и могут перекрестно загрязнять поверхности на различных этапах производства пищевых продуктов (Lindsay et al., 2002). Важным аспектом, который пока еще не до конца изучен, являются межвидовые взаимодействия в биопленках, распространенных в пищевой промышленности. В этой связи углубленное изучение природы образования, обнаружения и синергетического взаимодействия между микроорганизмами имеет высокую значимость для снижения риска возникновения вспышек болезней пищевого происхождения, влияющих на здоровье населения (Jahid, Ha, 2012).

Большинство исследований, проведенных ранее, были сосредоточены на формировании

биопленок патогенами при оптимальных для их роста температурах, которые не являются типичными для производственных помещений на пищевых предприятиях. Однако до сих пор недостаточно информации о способности микроорганизмов формировать биопленки при низких положительных температурах, характерных для пищевых производств, а также о синергетическом взаимодействии различных видов при таких условиях.

Целью исследования было оценить способности бактерий родов *Salmonella*, *Pseudomonas* и *Listeria* (в том числе патогенных *L. monocytogenes*) формировать биопленки на абиотических поверхностях при различных температурах, а также оценить роль синергетического взаимодействия исследуемых штаммов в формировании биопленочного сообщества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В качестве объектов исследований были выбраны 46 штаммов различных видов микроорганизмов, выделенных с объектов производственной среды мясоперерабатывающего и птицеперерабатывающего предприятий и мясных продуктов. Из них 22 представителя рода *Pseudomonas*, 15 штаммов *Listeria* sp. (из них 12 штаммов *Listeria monocytogenes*, 2 штамма *Listeria welshimeri* и 1 штамм *Listeria innocua*), 9 штаммов бактерий рода *Salmonella*. Подробное описание источников выделения штаммов представлено в таблице.

Все штаммы были протестированы на их способность образовывать биопленки в монокультуре на полистирольных поверхностях. Образование биопленки бактериями рода *Salmonella* и *Listeria* оценивали при 37°C, оптимальной температуре роста исследуемых микроорганизмов, а также при 4°C — низкой положительной температуре, характерной для помещений на пищевых предприятиях. Образование биопленки бактериями рода *Pseudomonas* оценивали при 4°C.

Для изучения синергетического взаимодействия были сформированы многовидовые биопленки: *Pseudomonas tolaasii* + *Salmonella* sp., S31; *Pseudomonas tolaasii* + *Listeria monocytogenes* 12; *Listeria monocytogenes* 12 + *Salmonella* sp., S31; *Pseudomonas tolaasii* + *Listeria monocytogenes* 12 + *Salmonella* sp., S31.

Определение способности образовывать биопленки. Способность к образованию биопленок изучали *in vitro* в микротитровальных планшетах. Для этого ночную бульонную культуру бактерий разводили в соотношении 1: 100 в LB бульоне ("Becton Dickinson", США) и вносили по 150 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета ("Corning", США). После инкубации в термостате ("Binder", Германия) при 37°C

Таблица. Характеристика объектов выделения штаммов микроорганизмов, использованных в исследовании

Тип предприятия/ пищевой продукт	Производственное помещение	Объект выделения	Микроорганизм
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Лента транспортера	<i>Listeria monocytogenes</i> (L1)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Внутрицеховая тара	<i>Listeria welshimeri</i> (L2)
Мясоперерабатывающее	Машинное отделение	Клипсатор	<i>Listeria monocytogenes</i> (L3)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Напольная тележка № 1	<i>Listeria monocytogenes</i> (L4)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Напольная тележка № 2	<i>Listeria monocytogenes</i> (L5)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Напольная тележка № 3	<i>Listeria monocytogenes</i> (L6)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Конвейер	<i>Listeria monocytogenes</i> (L7)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Конвейер	<i>Listeria monocytogenes</i> (L8)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Конвейер	<i>Listeria monocytogenes</i> (L9)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Конвейер	<i>Listeria monocytogenes</i> (L10)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Стол из нержавеющей стали (боковая поверхность)	<i>Listeria welshimeri</i> (L11)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Стол из нержавеющей стали (боковая поверхность)	<i>Listeria monocytogenes</i> (L12)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Колесо напольной тележки № 1	<i>Listeria monocytogenes</i> (L13)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Колесо напольной тележки № 2	<i>Listeria monocytogenes</i> (L14)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Колесо напольной тележки № 3	<i>L. innocua</i> (L15)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (фарш)	<i>Salmonella</i> sp. (S3)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (фарш)	<i>Salmonella</i> sp. (S10)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (фарш)	<i>Salmonella</i> sp. (S12)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины и говядины (пельмени)	<i>Salmonella</i> sp. (S17)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из мяса птицы (голень)	<i>Salmonella</i> sp. (S22)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из мяса птицы (филе куриное)	<i>Salmonella</i> sp. (S24)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (котлета)	<i>Salmonella</i> sp. (S30)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из мяса птицы (голень)	<i>Salmonella</i> sp. (S31)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (стейк)	<i>Salmonella</i> sp. (S38)
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Внутрицеховая тара	<i>Pseudomonas gessardii</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Металлическая цепь конвейера	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Лента конвейера упаковочной линии	<i>Pseudomonas mandelii</i>
Птицекомбинат	Цех убой и первичной обработки тушек, участок потрошения	Цепь конвейера субпродуктов	<i>Pseudomonas marginalis</i>
Птицекомбинат	Цех убой и первичной обработки тушек, участок удаления пера	Кафельная стена на участке удаления пера	<i>Pseudomonas mendocina</i>

Продолжение таблицы

Тип предприятия/ пищевой продукт	Производственное помещение	Объект выделения	Микроорганизм
Птицекомбинат	Цех убой и первичной обработки тушек	Кафельная стена на участке удаления пера	<i>Pseudomonas mosselli</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Внутрицеховая тара	<i>Pseudomonas orientalis</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Металлическая цепь конвейера	<i>Pseudomonas proteolytica</i>
Птицекомбинат	Цех убой и первичной обработки тушек	Участок потрошения, машина перенавески (станина)	<i>Pseudomonas putida</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Лента конвейера упаковочной линии	<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (конденсат с поверхности машины, не контактирую- щей с продуктом)	<i>Pseudomonas synxantha</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (конденсат с поверхности машины, не контактирую- щей с продуктом)	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
Птицекомбинат	Цех убой и первичной обработки тушек	Кафельная стена на участке удаления пера	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Внутрицеховая тара	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Стена рядом с ванной охлаждения	<i>Pseudomonas brenneri</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Колесо напольной тележ- ки для транспортирования сырья	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (станина)	<i>Pseudomonas fragi</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Стена рядом с ванной охлаждения	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Лента конвейера упаковочной линии	<i>Pseudomonas gessardii</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Металлическая цепь конвейера	<i>Pseudomonas grimonti</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (конденсат с поверхности машины, не контактирую- щей с продуктом)	<i>Pseudomonas koreensis</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (конденсат с поверхности машины, не контактирую- щей с продуктом)	<i>Pseudomonas libanensis</i>

во влажной камере, интенсивность роста культуры оценивали в фотометре (Multiskan FC, “Thermo Scientific”, США) при длине волны 540 нм. Затем удаляли планктонные клетки и в лунки вносили по 150 мкл 0.1% раствора кристаллического фиолетового (“Servicebio”, Китай) с экспозицией 1 ч для

окраски сформировавшихся биопленок. После окраски биопленки трижды промывали дистиллированной водой с последующим внесением 150 мкл 96% этанола для экстракции связанного с биопленками красителя. По истечении 1 ч оптическую плотность красителя, экстрагированного спиртом,

измеряли на фотометре при длине волны 540 нм. Контролем служили лунки, заполненные стерильным бульоном. Превышение оптической плотности кристаллического фиолетового над контролем свидетельствовало об образовании бактериями биопленок. Способность штаммов к образованию биопленок (соответственно, и штаммы как продуценты биопленок) классифицировали с использованием следующей шкалы: нет биопленкообразования ($OD_{540} = 0$) → очень слабое ($0 < OD_{540} < 0.2$) → слабое ($0.2 < OD_{540} < 0.4$) → сильное ($0.4 < OD_{540} < 1.0$) → очень сильное ($OD_{540} > 1.0$).

Изучение способности формировать биопленки на различных абиотических поверхностях. Для изучения *in vitro* способности микроорганизмов формировать биопленки на твердых поверхностях заранее подготавливали стерильные образцы подложек (кафель, сталь, серый пластик и белый пластик) размером 0.05×0.05 мм и переносили в стерильные пробирки. Ночную бульонную культуру исследуемых бактерий разводили в соотношении 1: 100 LB бульоне (“Becton Dickinson”, США) и вносили в пробирки с подложками в таких объемах, чтобы жидкость полностью покрывала образцы подложек; инкубирование проводили в термостате (ХТ-3/70; ЗАО “Пять Океанов”, Россия) при 4°C . Для визуализации подложки с бактериями, после инкубации и промывания несколько раз физиологическим раствором, окрашивали флуоресцентными красителями Live/Dead Biofilm Viability Kit (“Thermo Fisher”, США) согласно инструкции и проводили микроскопию на микроскопе с флуоресцентным объективом (BX43F; “Olympus”, Япония). Живые

клетки выявляли по флуоресценции зеленого цвета, а мертвые — красного.

Статистический анализ. Все исследования проводили в двукратной повторности; каждый повтор включал два параллельных опыта. При измерении значения оптической плотности средние значения и экспериментальные ошибки определяли, используя среднее отклонение экспериментальных значений от функции среднего значения с помощью Microsoft Office Excel 2010. Различия между значениями считались значимыми, если они превышали уровень экспериментальной ошибки (обычно 20% или менее), в соответствии с *t*-критерием Стьюдента для $p = 0.05$. Результаты были рассчитаны как “среднее значение $\pm$ стандартная ошибка”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В общей сложности 46 бактериальных штаммов, циркулирующих в мясной и птицеперерабатывающей промышленности на объектах производственной среды и различных пищевых продуктах, были протестированы на их способность образовывать биопленки в монокультуре на полистирольных поверхностях. Образование биопленки изолятами оценивали при 37°C — оптимальной температуре роста исследуемых микроорганизмов. В результате оценки биопленкообразующей способности при температуре 37°C среди представителей бактерий рода *Listeria* установлено, что все штаммы *Listeria* sp. формировали слабые или сильные биопленки в течение 24 ч культивирования (рис. 1). Такой способностью обладали не только непатогенные виды

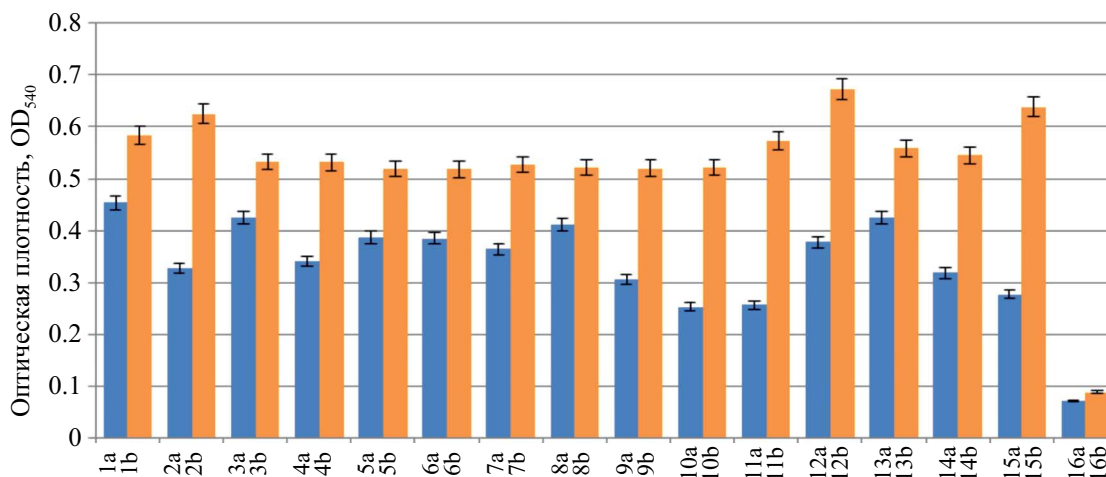


Рис. 1. Формирование биопленок при температуре 37°C бактериями рода *Listeria*, циркулирующими в мясной промышленности: а — 24 ч инкубирования, б — 72 ч инкубирования; 1 — *Listeria monocytogenes* (L1), 2 — *L. welshimeri* (L2), 3 — *L. monocytogenes* (L3), 4 — *L. monocytogenes* (L4), 5 — *L. monocytogenes* (L5), 6 — *L. monocytogenes* (L6), 7 — *L. monocytogenes* (L7), 8 — *L. monocytogenes* (L8), 9 — *L. monocytogenes* (L9), 10 — *L. monocytogenes* (L10), 11 — *L. welshimeri* (L11), 12 — *L. monocytogenes* (L12), 13 — *L. monocytogenes* (L13), 14 — *L. monocytogenes* (L14), 15 — *L. innocua* (L15), 16 — контроль.

листерий, такие как *Listeria welshimeri* и *Listeria innosua*, но и патогенные — *L. monocytogenes*.

Было отмечено, что при 37°C время инкубирования напрямую влияло на интенсивность формирования биопленок. Адгезия микроорганизмов увеличивалась с увеличением времени культивирования. По истечении 72 ч все 15 штаммов листерий продемонстрировали сильную способность к образованию биопленок.

Salmonella sp. являются одним из наиболее важных возбудителей болезней пищевого происхождения во многих странах, включая Россию. Биопленкообразующая способность штаммов *Salmonella* sp. также зависела от времени инкубирования (рис. 2). При скрининге 9 штаммов *Salmonella* sp. в планшетах для микротитрования было обнаружено, что значения OD_{540} варьировало через 24 ч от 0.292 до 0.490, через 48 ч от 0.351 до 0.634 и через 96 ч — от 0.489 до 1.512.

Увеличение времени инкубирования приводило к большему накоплению биомассы культуры. Среди сальмонелл были выделены 3 штамма S10, S12 и S22 с очень сильной биопленкообразующей способностью (оптическая плотность через 96 ч выращивания — более 1.0). Было отмечено, что среди большинства штаммов *Salmonella* sp. максимальный скачок в накоплении биомассы биопленок происходил после 48 ч культивирования.

Влияние температуры на скорость формирования биопленки. Немаловажное значение в формировании биопленок играет температура. Обычно температура в производственных цехах по переработке мяса, в том числе мяса птицы, составляет не выше 12°C. На многих предприятиях, в целях увеличения сроков годности конечной продукции, в производственных помещениях, где проводятся операции

по переработке сырья, температура воздуха снижена до 4–8°C. Изучение возможности формирования биопленок при низких положительных температурах вносит вклад в понимание механизмов выживания и распространения патогенных микроорганизмов по цепочке производства пищевой продукции. В этой связи способность к образованию биопленки у исследуемых микроорганизмов была оценена при температуре 4°C, имитируя условия окружающей среды на мясоперерабатывающих предприятиях и птицекомбинатах.

Низкая положительная температура (4°C) не являлась ограничивающим фактором в способности образовывать биопленки. Через 24 ч инкубирования представители бактерий рода *Listeria*, в том числе патогенные *Listeria monocytogenes*, формировали стойкие биопленки при низкой положительной температуре (рис. 3).

В первые сутки культивирования при 4°C все штаммы формировали слабые или сильные биопленки, при этом 4 штамма показали себя сильными продуцентами биопленок, в соответствии с выше представленной шкалой. У трех штаммов *Listeria monocytogenes* 10, *L. monocytogenes* 11 и *L. monocytogenes* 15 скорость формирования биопленки была выше при 4°C, чем при 37°C.

Listeria monocytogenes, один из основных патогенов пищевой промышленности, вызывает озабоченность в отношении безопасности пищевых продуктов из-за его способности образовывать биопленку и сохраняться как на объектах пищевой промышленности, так и в пищевых продуктах. Способность *L. monocytogenes* формировать биопленки при низких температурах, соответствующих условиям внешней среды при переработке и хранении пищевых продуктов, повышает вероятность

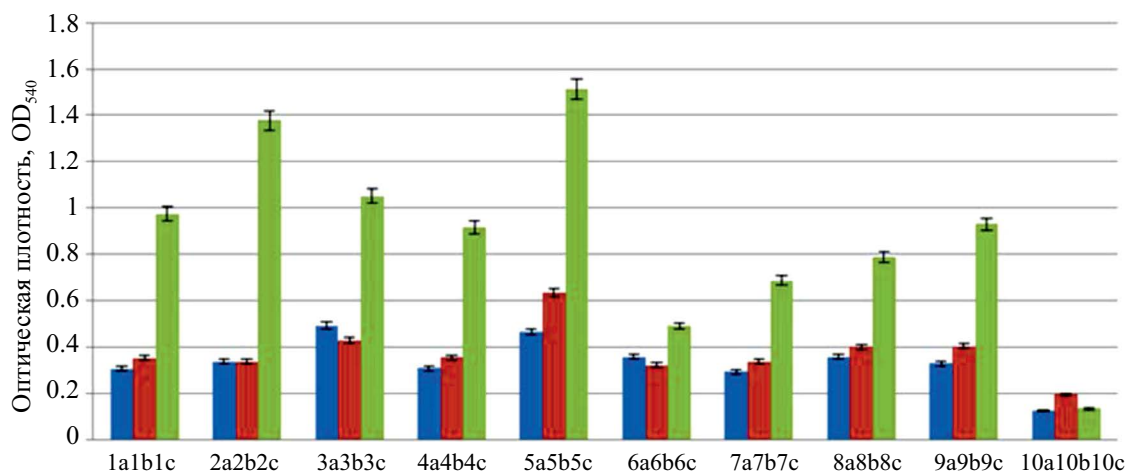


Рис. 2. Формирование биопленок при температуре 37°C бактериями рода *Salmonella*, циркулирующими в мясной промышленности: а — 24 ч инкубирования, б — 48 ч инкубирования, с — 96 ч инкубирования; 1 — *Salmonella* sp. (S3), 2 — *Salmonella* sp. (S10), 3 — *Salmonella* sp. (S12), 4 — *Salmonella* sp. (S17), 5 — *Salmonella* sp. (S22), 6 — *Salmonella* sp. (S24), 7 — *Salmonella* sp. (S30), 8 — *Salmonella* sp. (S31), 9 — *Salmonella* sp. (S38), 10 — контроль.

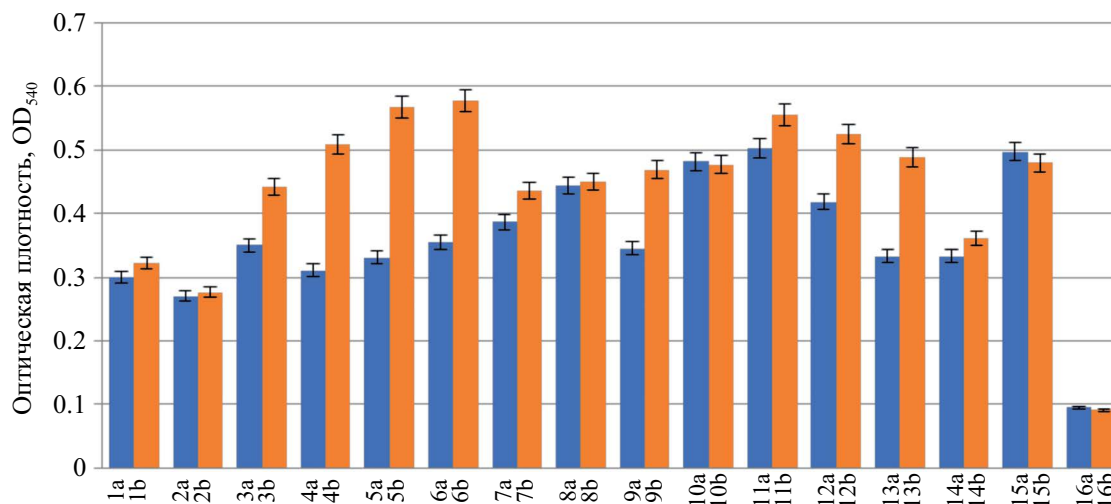


Рис. 3. Формирование биопленок при температуре 4°C бактериями рода *Listeria*, циркулирующими в мясной промышленности: а – 24 ч инкубирования, б – 48 ч инкубирования; 1 – *Listeria monocytogenes* (L1), 2 – *L. welshimeri* (L2), 3 – *L. monocytogenes* (L3), 4 – *L. monocytogenes* (L4), 5 – *L. monocytogenes* (L5), 6 – *L. monocytogenes* (L6), 7 – *L. monocytogenes* (L7), 8 – *L. monocytogenes* (L8), 9 – *L. monocytogenes* (L9), 10 – *L. monocytogenes* (L10), 11 – *L. welshimeri* (L11), 12 – *L. monocytogenes* (L12), 13 – *L. monocytogenes* (L13), 14 – *L. monocytogenes* (L14), 15 – *L. innocua* (L15), 16 – контроль.

перекрестного загрязнения. Фенотип биопленки листерий характеризуется повышенной устойчивостью к воздействию окружающей среды, включая устойчивость к антибиотикам и другим дезинфицирующим средствам, что вызывает ряд проблем в здравоохранении, пищевой промышленности и других областях. Проведенные исследования показали, что *L. monocytogenes* способна формировать биопленки уже за сутки при температуре всего 4°C.

На предприятиях пищевой промышленности потенциальными источниками загрязнения *L. monocytogenes* являются абиотические поверхности производственной среды, такие как стены и пол, системы очистки воздуха, вспомогательное оборудование (Ciccio et al., 2012). На формирование биопленки *L. monocytogenes* влияет множество условий: температура окружающей среды (Bonaventura et al., 2008; Moltz, Martin, 2005), характер адгезионной поверхности и ее гидрофобность (Midelet et al., 2006). В аналогичном исследовании Di Bonaventura et al. (2008) проанализировали образование биопленки 44 различными изолятами *L. monocytogenes* на разных поверхностях при четырех температурах (4, 12, 22 и 37°C). Согласно полученным результатам, *L. monocytogenes* были способны образовывать биопленки при 4 и 12°C с более высокой интенсивностью на стекле по сравнению с более гидрофобной нержавеющей сталью и полистиролом. С другой стороны, Bonsaglia et al. (2014) наблюдали образование биопленки при температурах, подобных температуре холодильных камер (4°C) на разных поверхностях, с более высоким уровнем биопленкообразования на нержавеющей стали

и стекле по сравнению с полистиролом. Также Norwood, Gilmour (2001) сообщили о двух изолятах *L. monocytogenes*, которые обладали одинаковой способностью к адгезии при 4 и 30°C.

Исследованные штаммы бактерий рода *Salmonella* sp. обладали способностью формировать биопленки при 4°C, в целом, незначительно уступавшей способности, продемонстрированной при 37°C (рис. 4).

Способность к образованию биопленки *Salmonella* sp. в зависимости от времени инкубирования варьировала от слабой до сильной. Через 48 ч инкубирования только два штамма – *Salmonella* sp. S12 и *Salmonella* sp. S22 – были отнесены к сильным продуцентам биопленок. Однако к 96 ч инкубирования только один штамм S30 оставался слабым продуцентом биопленки. Оставшиеся штаммы продемонстрировали прирост биомассы и являлись сильными и очень сильными продуцентами биопленок. Было отмечено, что для формирования биопленок бактериями рода *Salmonella* необходимо более длительное время. Снижение температуры инкубации может уменьшить рост бактерий, но также может способствовать образованию биопленки, поскольку штаммы способны экспрессировать компоненты, которые не были продуцированы в других благоприятных условиях, однако для этого может быть необходимо более длительное время (Stepanović et al., 2003; Lianou, Koutsoumanis, 2012).

Несмотря на медленное формирование биопленочных сообществ штаммами *Salmonella* sp., другими авторами также была установлена

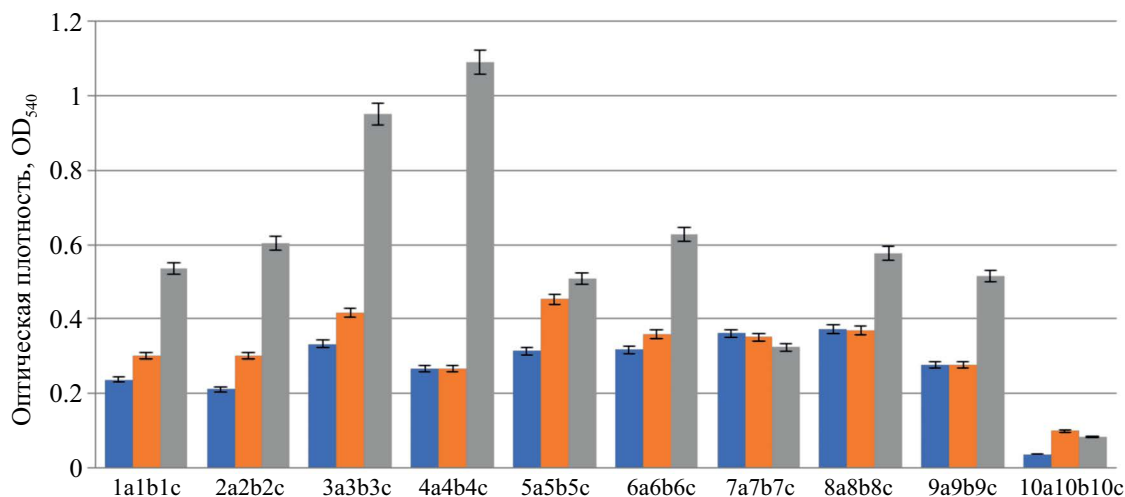


Рис. 4. Формирование биопленок при температуре 4°C бактериями рода *Salmonella*, циркулирующими в мясной промышленности: а – 24 ч инкубирования, б – 48 ч инкубирования, с – 96 ч инкубирования; 1 – *Salmonella* sp. (S3), 2 – *Salmonella* sp. (S10), 3 – *Salmonella* sp. (S12), 4 – *Salmonella* sp. (S17), 5 – *Salmonella* sp. (S22), 6 – *Salmonella* sp. (S24), 7 – *Salmonella* sp. (S30), 8 – *Salmonella* sp. (S31), 9 – *Salmonella* sp. (S38), 10 – контроль.

способность сальмонелл образовывать биопленки при низких положительных температурах. Так, показана возможность формирования биопленки у 39.5% исследуемых штаммов при 3°C – температуре, соответствующей холодильному хранению пищевых продуктов (Borges et al, 2018).

Способность к адгезии на различных поверхностях проявляют не только патогенные микроорганизмы, но и условно-патогенные, например, представители рода *Pseudomonas*. Бактерии рода *Pseudomonas* легко образуют биопленки на различных типах поверхностей (Masák et al., 2014). В проведенном исследовании все штаммы *Pseudomonas* sp. проявляли сильную способность к адгезии на абиотической поверхности через 48 ч (рис. 5). Значение OD₅₄₀ варьировало от 0.495 до 0.997. Увеличение времени культивирования проводило к дальнейшему формированию и нарастанию биопленки. После 72 ч инкубирования 4 представителя *Pseudomonas* показали способность к очень сильному образованию биопленок (OD₄₅₀ > 1.0).

Увеличение времени инкубирования до 72 ч не у всех исследуемых штаммов сопровождалось увеличением биомассы. У 9 видов *Pseudomonas gessardii*, *P. mandell*, *P. marginalis*, *P. mendocina*, *P. mosselli*, *P. orientalis*, *P. proteolytica*, *P. putida*, *P. savastanoi* spp., *P. synxantha*, *P. tolaasii*, *P. aeruginosa*, *P. azotoformans*, *P. brenneri*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. fuscovaginae* с 48 до 72 ч культивирования прирост биомассы происходил не более, чем на 0.1 единицу оптической плотности. В то же время у двух штаммов *P. aeruginosa* и *P. azotoformans* значение оптической плотности увеличилось более, чем в 2 раза,

что свидетельствовало об интенсивном формировании биопленок. Тем не менее все исследуемые представители *Pseudomonas* sp. были отнесены к сильным продуцентам биопленок.

Для подтверждения формирования биопленок были сформированы биопленки при 4°C на стеклянной поверхности с дальнейшим окрашиванием флуоресцентными красителями, позволяющими дифференцировать живые и мертвые клетки. С помощью флуоресцентной микроскопии было подтверждено, что изучаемые микроорганизмы формировали биопленки на стеклянной поверхности (рис. 6).

Поскольку биопленки могут присутствовать на абиотических поверхностях пищевых производств, была изучена способность формирования биопленки (на примере патогенной *Listeria monocytogenes* 12) на материалах, разрешенных для производственной среды предприятий и широко применяемых для изготовления разделочных досок, столешниц, раковин, технологического и вспомогательного оборудования и пр. В качестве таких материалов были выбраны кафель, нержавеющая сталь и два вида пластика (белый и серый). Снимки, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии и подтверждающие формирование биопленок, представлены на рис. 7.

Как показано на рис. 7, биопленки, сформированные *Listeria monocytogenes* 12, демонстрировали зеленую флуоресценцию, что свидетельствовало о наличии “живых” микроорганизмов. Клетки равномерно распределялись на различных абиотических поверхностях через 24 ч после начала образования биопленки.

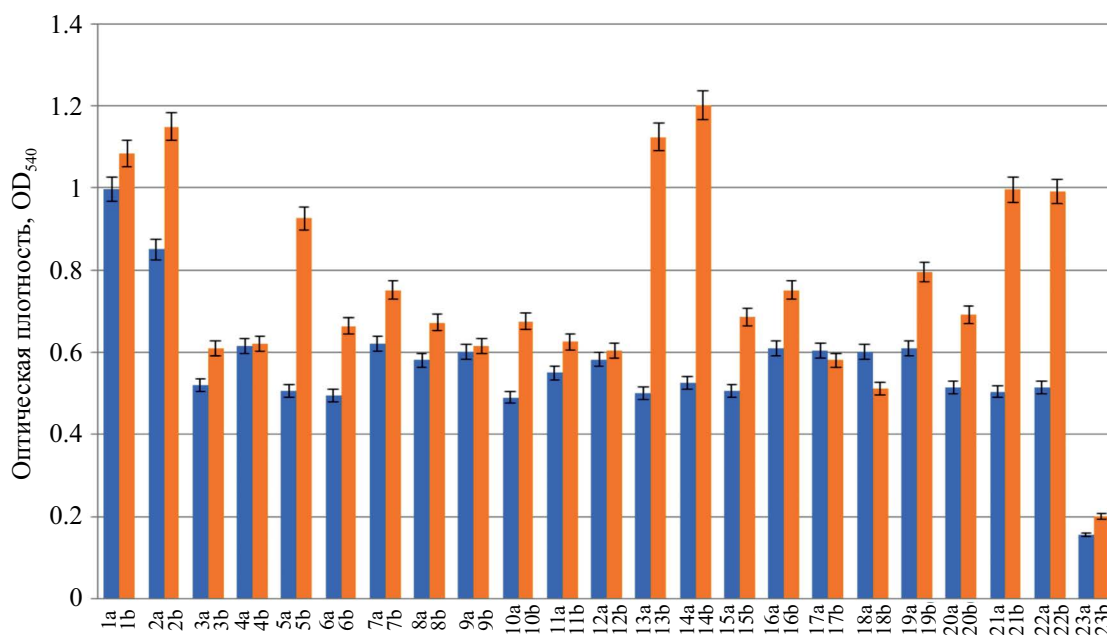
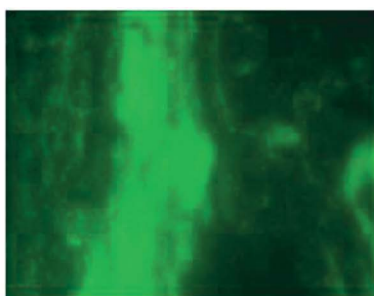


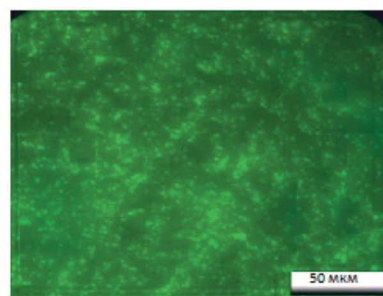
Рис. 5. Формирование биопленок при температуре 4°C бактериями рода *Pseudomonas*, циркулирующими в мясной промышленности: а – 48 ч инкубирования, б – 72 ч инкубирования; 1 – *Pseudomonas gessardii*, 2 – *P. azotoformans*, 3 – *P. mandell*, 4 – *P. marginalis*, 5 – *P. mendocina*, 6 – *P. mosselli*, 7 – *P. orientalis*, 8 – *P. proteolytica*, 9 – *P. putida*, 10 – *P. savastanoi* spp, 11 – *P. synxantha*, 12 – *P. tolaasii*, 13 – *P. aeruginosa*, 14 – *P. azotoformans*, 15 – *P. brenneri*, 16 – *P. fluorescens*, 17 – *P. fragi*, 18 – *P. fuscovaginae*, 19 – *P. gessardii*, 20 – *P. grimonii*, 21 – *P. koreensis*, 22 – *P. libanensis*, 23 – контроль.



Pseudomonas tolaasii

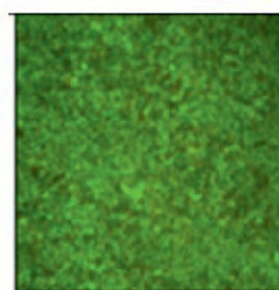


Salmonella sp., S31

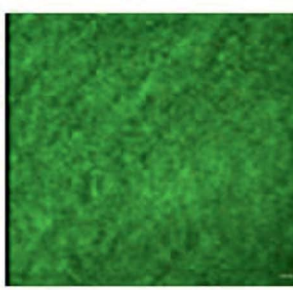


Listeria monocytogenes 12

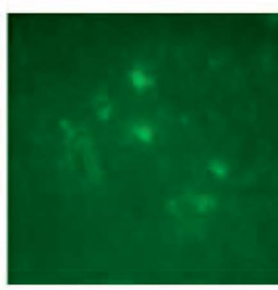
Рис. 6. Биопленки микроорганизмов на поверхности стекла, сформированные в течение 24 ч при 4°C. Флуоресцентная микроскопия, краситель SYTO® 9. Масштабная линейка – 50 мкм.



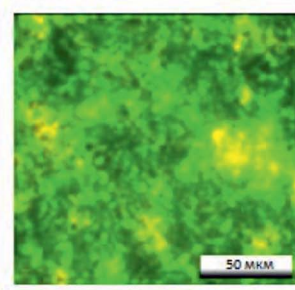
Кафель



Сталь



Белый пластик



Серый пластик

Рис. 7. Биопленки *Listeria monocytogenes* 12, сформированные на различных абиотических поверхностях в течение 24 ч при 4°C. Масштабная линейка – 50 мкм.

Роль синергического взаимодействия различных штаммов в формировании биопленочного сообщества. В природе биопленки обычно состоят из нескольких видов бактерий, включая как патогены пищевого происхождения, так и условно-патогенные микроорганизмы. Лучшее понимание синергического взаимодействия между видами и того, как эффективно удалять биопленки смешанных видов с абиотических поверхностей на предприятиях пищевой промышленности, может помочь снизить риск загрязнения пищевых продуктов. Было изучено образование биопленок смешанных видов представителей родов *Listeria* (b), *Salmonella* (c) и *Pseudomonas* (a) при 4°C (рис. 8).

Развитие биопленки при совместном культивировании представителей родов *Pseudomonas* и *Salmonella* значительно усиливалось, особенно через 48 ч (рис. 8). Вероятнее всего, это связано с более интенсивной способностью *Pseudomonas* как к росту, так и к формированию биопленки. Смешанные биопленки, в состав которых входит *Pseudomonas* sp., развивались быстрее и достигали больших значений OD₅₄₀, чем моновидовые биопленки патогенных микроорганизмов. Через 24 ч инкубирования наибольшая синергия (увеличение массы биопленки) в биопленках наблюдалась в комбинации АВ, АС и АВС, в состав которых входил *Pseudomonas tolaasii*, который был способен быстро образовывать сильную биопленку в монокультуре. При увеличении времени инкубирования до 48 ч, по-прежнему наибольший синергический эффект наблюдался в тех же комбинациях. Смешанная биопленка *Salmonella* sp., S31 + *Listeria*

monocytogenes 12 обладала наименьшей синергией, как через 24, так и через 48 ч культивирования. Биопленка из комбинации двух патогенных микроорганизмов была более интенсивна по сравнению с их монобиопленками, однако комбинации патогенного микроорганизма и представителя рода *Pseudomonas* значительно отличались по интенсивности формирования биопленок. Это указывает на значимость этого вида в синергическом взаимодействии среди микроорганизмов в процессе образования биопленок.

Изучение синергических и негативных взаимодействий в биопленках ведется постоянно. Недавние исследования показали, как присутствие определенных видов бактерий в сообществе значительно влияет на потенциал формирования биопленки или на рост других видов либо в результате кооперативного, либо конкурентного взаимодействия. Например, было показано, что присутствие антагонистических веществ, продуцируемых штаммами *B. cereus*, негативно влияло на рост *Listeria monocytogenes* в двухвидовых биопленках (Alonso et al., 2020). В другом исследовании сообщалось, что *Pseudomonas putida*, вид бактерий, обитающий в системах питьевой воды на птицефермах, ингибирует рост и образование биопленки *Salmonella java* в смешанной культуре (Maes et al., 2020). Штаммы *L. monocytogenes* пищевого происхождения демонстрируют значительные различия в конкурентном росте в различных условиях биопленки со смешанными видами (Heir et al., 2018). Наши результаты показали, что синергические взаимодействия в многовидовых биопленках зависят от видового состава. Sadiq

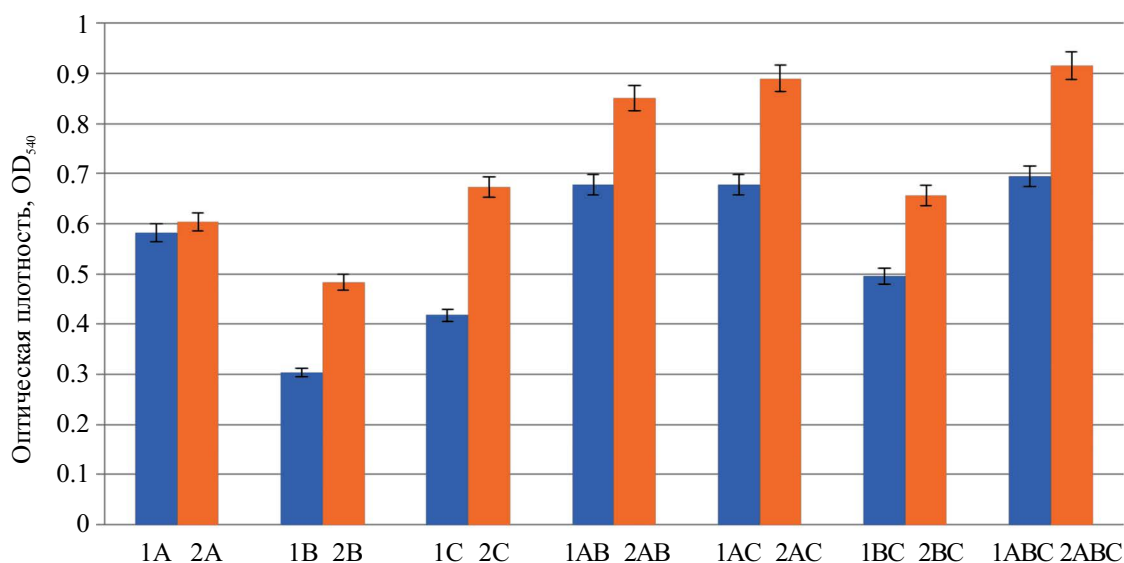


Рис. 8. Синергические взаимодействия при формировании биопленок трех видов штаммов при температуре 4°C: 1 – 24 ч инкубирования, 2 – 48 ч инкубирования; А – *Pseudomonas tolaasii*; В – *Salmonella* sp. (S31); С – *Listeria monocytogenes* (L12).

et al. (2023) при исследовании многовидовых биопленок, образованных изолятами, полученными из производственной среды мясоперерабатывающих предприятий, установили, что *P. azotoformans* способствовал образованию синергетической биопленки чаще, чем другие, поскольку он являлся частью всех четырех видовых комбинаций биопленок, демонстрирующих более высокий синергизм (Sadiq et al., 2023).

Выявленная способность к формированию биопленок у всех исследуемых штаммов может привести к усилению патогенности и провоцировать проблемы с безопасностью пищевых продуктов. В проведенном исследовании было отмечено, что на образование биопленки исследуемыми микроорганизмами влияли как температура инкубации, так и время. Биопленки патогенных *Salmonella* sp. и *Listeria monocytogenes* с $OD_{540} > 0.4$ могут быть получены при 4°C уже через 24 ч инкубации. *L. monocytogenes* и представители бактерий рода *Salmonella* способны образовывать биопленки и сохраняться в течение длительного времени, способствуя загрязнению пищевых продуктов (Doijad et al., 2015; Borges et al., 2018). Смешанные биопленки, включая патогенные и непатогенные виды, проявляют большую устойчивость к воздействию физических и химических факторов (Li et al., 2021). Для контроля присутствия и образования такой устойчивой формы патогенов должны применяться эффективные стратегии предотвращения или уничтожения биопленок.

Помимо использования оптических методов, в данном исследовании были использованы и микроскопические методы (флуоресцентная микроскопия) оценки возможности формирования биопленок на нержавеющей стали, стекле и пластике. Таким образом, в результате двух подходов была показана возможность формирования биопленок на абиотических поверхностях из различных материалов, применяемых в пищевой промышленности.

Все комбинации биопленок, продемонстрировавшие заметную синергию, имели в составе представителя рода *Pseudomonas*, что может указывать на наличие ключевых отраслевых видов бактерий, которые стимулируют синергию или антагонизм, и это может иметь значение для контроля биопленок в соответствующих отраслях пищевой промышленности.

Полученные данные по способности исследованных штаммов к формированию биопленок в течение 24 ч при низкой положительной температуре показали, что для объективной характеристики микробного сообщества производственной среды пищевых предприятий необходимо, наряду с отбором и изучением планктонной микрофлоры, проводить отбор и исследование биопленочных форм.

В результате исследований подтверждено образование биопленок всеми штаммами родов

Listeria, *Salmonella* и *Pseudomonas*, выделенными из производственной среды мясоперерабатывающих и птицеперерабатывающих предприятий, а также из мясной продукции. Определено влияние времени инкубирования при низких положительных температурах на скорость образования и оптическую плотность биопленок у исследованных штаммов микроорганизмов. Показано, что *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. и *Pseudomonas* sp. способны формировать биопленки в монокультуре при низкой положительной температуре (4°C). Установлена значимость представителя рода *Pseudomonas* в синергетическом взаимодействии микроорганизмов при формировании многовидовых биопленок. Результаты проведенных исследований имеют высокую значимость для пересмотра гигиенических планов предприятий и повышения микробиологической безопасности мясной продукции, в том числе, изготовленной из мяса птицы.

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

- Alonso V.P.P., Harada A.M.M., Kabuki D.Y. Competitive and/or cooperative interactions of listeria monocytogenes with *Bacillus cereus* in dual-species biofilm formation // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00177>
- Bonsaglia E.C.R., Silva N.C.C., Fernades J.A., Araújo Júnior J.P., Tsunemi M.H., Rall V.L.M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures // Food Control. 2014. V. 35. P. 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023>
- Borges K.A., Furian Th.Q., Souza S.N., Menezes R., Ton-do E.C., Salle C.T.P., Moraes H.L.S., Nascimento V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions // Pesq. Vet. Bras. 2018. V. 38. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4928>
- Burmölle M., Ren D., Bjarnsholt T., Sørensen S.J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? // Trends Microbiol. 2014. V. 22. P. 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004>
- Burmölle M., Thomsen T.R., Fazli M., Dige I., Christensen L., Homøe P., Tvede M., Nyvad B., Tolker-Nielsen T.,

- Givskov M., Moser C., Kirketerp-Møller K., Johansen H.K., Høiby N., Jensen P.Ø., Sørensen S.J., Bjarnsholt T. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010. V. 59. P. 324–336.
- Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D’Orio V., Vergara A., Conter M., Ianieri A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 104. P. 1552–1561.
- Di Ciccio P., Conter M., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A., Paludi D., Festino A.R., Ianieri A. *Listeria monocytogenes*: biofilms in food processing // Ital. J. Food Sci. 2012. V. 24. P. 203–213.
- Doijad S.P., Barbuddhe S.B., Garg S., Poharkar K.V., Kalorey D.R., Kurkure N.V., Rawool D.B., Chakraborty T. biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources // PLoS One. 2015. V. 10. Art. e0137046.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137046>
- Ferreira V., Wiedmann M., Teixeira P., Stasiewicz M.J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health // J. Food Protect. 2014. V. 77. P. 150–170.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- González-Rivas F., Ripolles-Avila C., Fontecha-Umaña F., Ríos-Castillo A.G., Rodríguez-Jerez J.J. Biofilms in the spotlight: detection, quantification, and removal methods // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2018. V. 17. P. 1261–1276.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12378>
- Heir E., Møretrø T., Simensen A., Langsrud S. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments // Int. J. Food Microbiol. 2018. V. 275. P. 46–55.
- Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms // Int. J. Antimicrob. Agents. 2010. V. 35. P. 322–332.
- Jahid I.K., Ha S. A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety // Food Sci. Biotechnol. 2012. V. 21. P. 299–316.
<https://doi.org/10.1007/s10068-012-0041-1>
- Kadam S.R., den Besten H.M., van der Veen S., Zwietering M.H., Moezelaar R., Abee T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin // Int. J. Food Microbiol. 2013. V. 165. P. 259–264.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- Karki A.B., Ballard K., Harper C., Sheaff R.J., Fakhr M.K. *Staphylococcus aureus* enhances biofilm formation, aerotolerance, and survival of campylobacter strains isolated from retail meats // Sci. Rep. 2021. V. 11. Art. 13837.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91743-w>
- Lee B.H., Hébraud M., Bernardi T. Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 2221.
- Li Q., Liu L., Guo A., Zhang X., Liu W., Ruan Y. Formation of multispecies biofilms and their resistance to disinfectants in food processing environments: a review // J. Food Protect. 2021. V. 84. P. 2071–2083.
<https://doi.org/10.4315/JFP-21-071>
- Lianou A., Koutsoumanis K.P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions // Int. J. Food Microbiol. 2012. V. 160. P. 171–178.
- Lindsay D., Brözel V.S., Mostert J.F., von Holy A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 92. P. 352–361.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01538.x>
- Maes S., De Reu K., Van Weyenberg S., Lories B., Heyndrickx M., Steenackers H. *Pseudomonas putida* as a potential biocontrol agent against salmonella Java biofilm formation in the drinking water system of broiler houses // BMC Microbiol. 2020. V. 20. Art. 373.
- Margas E., Meneses N., Conde-Petit B., Dodd C.E., Holah J. Survival and death kinetics of *Salmonella* strains at low relative humidity, attached to stainless steel surfaces // Int. J. Food Microbiol. 2014. V. 187. P. 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.027>
- Masák J., Čejková A., Schreiberová O., Rezanka T. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 89. P. 1–14.
- Midelet G., Kobilinsky A., Carpentier B. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 2313–2321.
- Moltz A.G., Martin S.E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions // J. Food Protect. 2005. V. 68. P. 92–97.
- Norwood D.E., Gilmour A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature // Lett. Appl. Microbiol. 2001. V. 33. P. 320–324.
- Parijs I., Steenackers H.P. Competitive inter-species interactions underlie the increased antimicrobial tolerance in multispecies brewery biofilms // ISME J. 2018. V. 12. P. 2061–2075.
<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0146-5>
- Pažin V., Jankuloski D., Kozačinski L., Dobranić V., Njari B., Cvrtić Ž., Lorenzo J.M., Zdolec N. Tracing of *Listeria monocytogenes* contamination routes in fermented sausage production chain by pulsed-field gel electrophoresis typing // Foods (Basel). 2018. V. 7. Art. 198.
<https://doi.org/10.3390/foods7120198>
- Rodríguez-Campos D., Rodríguez-Melcón C., Alonso-Calleja C., Capita R. Persistent *Listeria monocytogenes*

- isolates from a poultry-processing facility form more biofilm but do not have a greater resistance to disinfectants than sporadic strains // *Pathogens* (Basel). 2019. V. 8. Art. 250.
<https://doi.org/10.3390/pathogens8040250>
- Sadiq F.A., De Reu K., Burmølle M., Maes S., Heyndrickx M. Synergistic interactions in multispecies biofilm combinations of bacterial isolates recovered from diverse food processing industries // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Art. 1159434.
- Stepanović S., Ćirković I., Mijač V., Švabić-Vlahović M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp // *Food Microbiol.* 2003. V. 20. P. 339–343.
- Wicaksono W.A., Erschen S., Krause R., Müller H., Cernava T., Berg G. Enhanced survival of multi-species biofilms under stress is promoted by low-abundant but antimicrobial-resistant keystone species // *J. Hazard. Mater.* 2022. V. 422. Art. 126836.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126836>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Patterns of Biofilm Formation by Members of *Listeria*, *Salmonella*, and *Pseudomonas* at Various Temperatures and the Role of Their Synergistic Interactions in the Formation of Biofilm Communities

Yu. K. Yushina^{1, *}, E. V. Zaiko¹, M. A. Grudistova¹, A. A. Semenova¹,
 A. A. Makhova¹, D. S. Bataeva¹, E. V. Demkina², and Yu. A. Nikolaev²

¹Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbatov RAS, Moscow, 109316, Russia

²Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Winogradsky Institute of Microbiology, Moscow, 119071, Russia

*e-mail: yu.yushina@fncps.ru

Abstract. Biofilm formation on abiotic surfaces in the food sector is a major public health concern. In fact, biofilms represent a constant source of pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. The ability for the formation of multispecies biofilms by pathogens and spoilage microorganisms poses a serious danger in the production of safe products and is one of the reasons for the stable circulation of microorganisms in meat processing plants. During the work, 46 strains of microorganisms isolated from industrial environments and food products were tested for the ability to form biofilms at different temperatures. The analyzed pathogenic strains (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp.) and spoilage microorganisms (*Pseudomonas* sp.) had adhesion to the abiotic surface with subsequent formation of a persistent biofilm. Low positive temperature was not a limiting factor in the ability to form biofilms. After 24 hours of incubation, representatives of bacteria of the genera *Listeria* and *Salmonella* sp. formed persistent biofilms at (4°C). The ability to form biofilms on various abiotic surfaces found in the meat industry (tiles, glass, plastic) has been demonstrated. The synergistic interaction of representatives of the genera *Listeria*, *Salmonella* and *Pseudomonas* during the formation of mixed biofilms at 4°C was studied. Combinations of a pathogen and a member of the genus *Pseudomonas* differed significantly in the intensity of biofilm formation compared to combinations of two pathogens. This indicates the importance of this species in synergistic interactions among microorganisms.

Keywords: biofilms, *Listeria monocytogenes*, industrial environment objects, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp.

УДК 579.253.4:579.222+579.258

НОКАУТ-МУТАЦИИ В ГЕНАХ, КОДИРУЮЩИХ ПЕРЕНОСЧИКИ ФОСФАТА, НАРУШАЮТ АДАПТАЦИЮ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* К ПОТРЕБЛЕНИЮ ЭТАНОЛА

© 2024 г. Л. А. Ледова^а, Л. П. Рязанова^а, Т. В. Кулаковская^{а, *}

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290, Пушкино, Россия

*e-mail: alla@ibpm.ru

Поступила в редакцию 01.03.2024 г.

После доработки 23.03.2024 г.

Принята к публикации 28.03.2024 г.

Переносчики фосфата в клетках дрожжей ответственны за гомеостаз фосфора, а также опосредованно вовлечены в регуляцию различных адаптивных процессов. Одним из таких процессов является адаптация клеток к потреблению этанола, которое требует значительных изменений в фосфорном обмене. В данной работе показано, что штаммы *Saccharomyces cerevisiae* с нокаут-мутациями в генах переносчиков фосфата *PNO87*, *PNO89*, *PNO90* и *PNO91* хуже приспособляются к потреблению этанола при его концентрации 4%. Это выражается как в удлинении лаг-фазы, так и в снижении скорости роста на активной стадии. Клетки мутантов отличаются по содержанию неорганических полифосфатов, но не ортофосфата, от родительского штамма: они содержат меньше длинноцепочечных полифосфатов. Этот эффект наблюдали при культивировании на этаноле, но не на глюкозе. При культивировании на среде, содержащей 4% этанол, штамм с нокаут-мутацией в гене *PNO84*, кодирующем переносчик фосфата и двухвалентных металлов, а также штаммы-нокауты по генам *PNM6* и *PNM7*, ответственным за сверхнакопление полифосфатов, не проявили особенностей роста на среде с 4% этанолом по сравнению с родительским штаммом. Обсуждается возможная роль переносчиков фосфата и неорганических полифосфатов в адаптации дрожжей к потреблению этанола.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, неорганические полифосфаты, переносчик фосфата, этанол, нокаут-мутация

DOI: 10.31857/S0026365624050085

Изучение адаптации клеток дрожжей к этанолу является важной задачей для оптимизации биотехнологий, связанных с виноделием (Эльдаров и соавт., 2016) и производством технического этанола (Розанов и соавт., 2014). Методами транскриптомного анализа установлено, что толерантность к этанолу включает взаимодействие многих генов и затрагивает практически все стороны метаболизма дрожжевых клеток (Ma, Liu, 2010; Stanley et al., 2010; Wolf et al., 2023). Среди генов, экспрессия которых возрастает при адаптации к этанолу, можно отметить гены, кодирующие белки клеточной оболочки, транспортные белки цитоплазматической мембраны, гены, обеспечивающие функционирование вакуолей, а также гены, продукты которых вовлечены в реакцию на осмотический, тепловой и окислительный стрессы (Ma, Liu, 2010; Stanley et al., 2010;

Wolf et al., 2023). Так, показано, что для толерантности дрожжей к этанолу необходимы гены, кодирующие белки теплового шока и факторы транскрипции Msn4p и Msn2p (Ma, Liu, 2010). Отмечается важность длинных некодирующих РНК (Long noncoding RNA, LncRNA), а также белков, участвующих в процессах автофагии (Wolf et al., 2023). Например, фактор транскрипции Rpn4 стимулирует экспрессию системы автофагии при этанольном стрессе посредством активации синтеза вакуолярной протеиназы PRB1 (Bubis et al., 2020). Несмотря на то, что вопросу о механизмах толерантности дрожжей к этанолу посвящено множество работ, в том числе и обзоров (Auesukaree, 2017; Sahana et al., 2024), вопрос о роли фосфорного обмена в адаптации к этанолу у дрожжей не находится в фокусе внимания исследователей. В то же время, фосфорный обмен претерпевает при росте

на этаноле значительные изменения. Так, содержание АТФ в клетках *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании на этаноле возрастает на 70% по сравнению с культивированием на глюкозе (Вагабов и соавт., 2011). Неорганические полифосфаты (полиР) являются у многих микроорганизмов одним из факторов адаптации к стрессам (Rao et al., 2009; Denoncourt et al., 2021; Andreeva et al., 2022). При росте *S. cerevisiae* на этаноле происходят значительные изменения в составе полиР: увеличивается содержание длинноцепочечных фракций и уменьшается содержание короткоцепочечных полимеров (Vagabov et al., 2008), резко снижается содержание полиР в митохондриях (Андреева и соавт., 2008). Такие изменения предполагают возможность вовлечения системы минерального фосфорного обмена в процессы, происходящие в клетках дрожжей при адаптации к этанолу. Среди белков, вовлеченных в гомеостаз фосфора у дрожжей, особый интерес представляют в данном случае транспортеры фосфата, поскольку адаптация к этанолу сопровождается значительными изменениями в цитоплазматической мембране и мембранах других органелл (Ma, Liu, 2010; Stanley et al., 2010).

Цитоплазматическая мембрана клеток дрожжей *S. cerevisiae* содержит несколько транспортеров фосфата, а вакуолярная мембрана — один транспортер Pho91 с разным сродством к фосфату и регуляторными свойствами (Eskez et al., 2018).

Целью работы было определить влияние нокаут-мутаций в генах, кодирующих переносчики фосфата, на рост и содержание неорганических полифосфатов у *S. cerevisiae* при культивировании в среде с 4% этанолом.

МАТЕРАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали коммерческие штаммы из коллекции Dharmascon:

штамм ВУ4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) как родительский штамм (wt) и полученные на его основе штаммы-нокауты по генам, кодирующим переносчики фосфата (табл. 1).

Состав среды и условия культивирования. Культуры поддерживали на агаризованной среде YPD. Инокуляты выращивали на среде YPD (1% дрожжевой экстракт (“Sigma-Aldrich”, США), 2% пептон (“Pronadisa”, Испания) и 2% глюкоза) в колбах Эрленмейера с объемом среды 100 мл при 29°C в течение 24 ч на качалке со 145 об./мин. Для получения кривых роста культуры выращивали на среде YP (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон) с добавлением этанола в концентрациях, указанных в подписях к рисункам и таблицам. Объем среды составлял 50 мл, культивирование проводили при 250 об./мин и 29°C. Оптическую плотность культур измеряли на спектрофотометре (“Unico”, США) при 600 нм в кювете толщиной 3 мм. Для получения биомассы культивирование проводили как на среде YPD с глюкозой, так и на среде YP с 4% этанолом в указанных выше условиях.

Экстракция полифосфатов. Для экстракции полиР использовали образцы биомассы после культивирования на среде с глюкозой в течение 24 ч, а в среде с этанолом — в течение 60 ч. Клетки отделяли от среды центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин и дважды промывали дистиллированной водой при тех же условиях центрифугирования. Образцы по 150 мг сырой биомассы каждый замораживали, хранили при –20°C и использовали для анализа. Экстракцию ортофосфата (Pi), кислоторастворимой фракции полиР (полиР1) и кислотонерастворимой фракции полиР (полиР2) проводили при 0°C как описано ранее (Трилисенко и соавт., 2023). Содержание Pi до гидролиза и после гидролиза полифосфатов (Трилисенко и соавт., 2023) определяли колориметрическим методом с малахитовым зеленым (Andreeva et al., 2019) с помощью планшетного фотометра (ОАО “МЗ “Сапфир”, Россия).

Таблица 1. Транспортеры фосфата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* согласно базе данных SDG (<https://www.yeastgenome.org/>)

Систематическое обозначение гена (ID)	Название гена	Функции кодируемого белка
YML123C	<i>PHO84</i>	Высокоаффинный транспортер фосфата и низкоаффинный транспортер катионов двухвалентных металлов
YCR037C	<i>PHO87</i>	Низкоаффинный транспортер фосфата плазматической мембраны
YBR296C	<i>PHO89</i>	Na ⁺ /P _i симпортер плазматической мембраны
YJL198W	<i>PHO90</i>	Низкоаффинный транспортер фосфата плазматической мембраны
YNR013C	<i>PHO91</i>	Низкоаффинный транспортер фосфата вакуолярной мембраны, экспортирует фосфат из вакуоли в цитоплазму

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор концентрации этанола. Мы провели культивирование штамма ВУ4741 на средах с тремя различными концентрациями этанола (рис. 1). Показано, что уже при культивировании в среде с 4%-ым этанолом происходит увеличение длины лаг-фазы, а при культивировании в среде с 7%-ым этанолом не только увеличивается длина лаг-фазы, но и снижается скорость роста. Таким образом, для выбранного нами штамма дрожжей уже 4% этанола представляют собой стрессовые условия. Для дальнейших исследований мы выбрали эту промежуточную концентрацию.

Влияние нокаут-мутаций по генам переносчиков фосфата. Мы провели культивирование на этаноле нокаут-мутантов в генах переносчиков фосфата (Eskez et al., 2018), а также в двух генах РНО-пути, *PHM6* и *PHM7*, участвующих в накоплении полиР (Kulakovskaya et al., 2023) в среде с 4% этанолом. Кривые роста штаммов *Δrho84*, *Δphm6* и *Δphm7* не отличались от кривых роста родительского штамма ВУ4741 (не иллюстрируется). Остальные мутантные штаммы демонстрировали либо увеличение продолжительности лаг-фазы, либо уменьшение оптической плотности культуры при выходе на стационарную стадию роста (рис. 2).

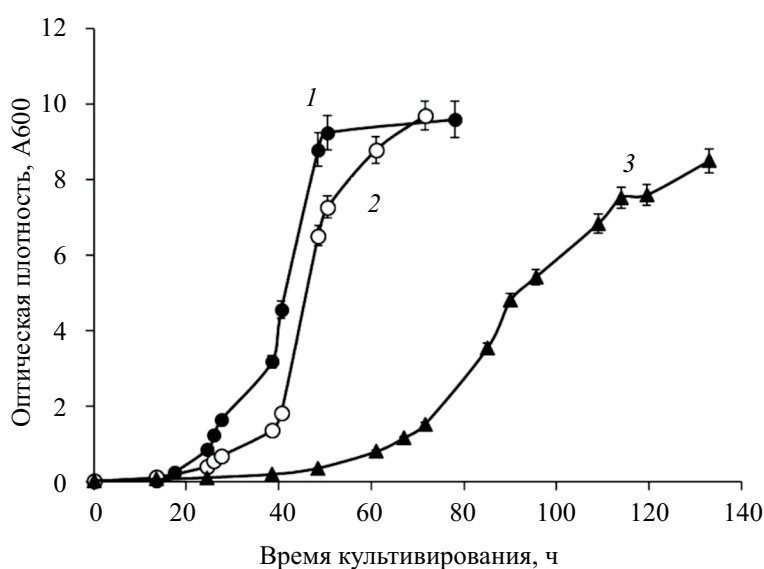


Рис. 1. Рост штамма ВУ4741 (wt) на средах УР с 1% этанолом (1), 4% этанолом (2) и 7% этанолом (3).

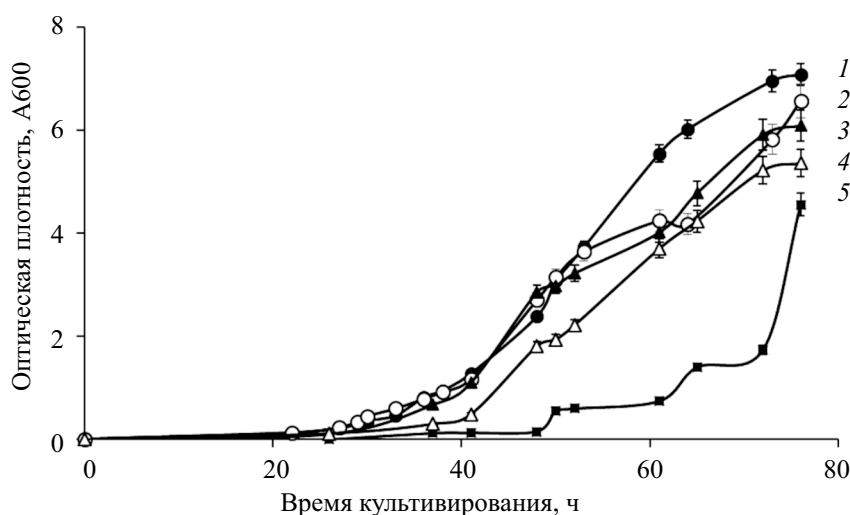


Рис. 2. Рост штамма ВУ4741 (wt) и штаммов-нокаут мутантов по генам переносчиков фосфата на среде УР с 4% этанолом: 1 – wt; 2 – *Δrho87*; 3 – *Δrho90*; 4 – *Δrho91*; 5 – *Δrho89*.

Таблица 2. Содержание кислоторастворимых полиР (полиР1) и кислотонерастворимых полиР (полиР2) в клетках родительского и мутантных штаммов *S. cerevisiae*; мкмоль Р/г сырой биомассы. Культивирование проводили в течение 24 ч на среде YPD с 2% глюкозой и в течение 60 ч на среде YP с 4% этанола. Статистическую значимость оценивали относительно данных для штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: ** – $p < 0.01$; * – $p < 0.1$; во всех остальных случаях разница статистически незначима

Штамм	Среда с 2% глюкозой		Среда с 4% этанола	
	ПолиР1	ПолиР2	ПолиР1	ПолиР2
WT	48.4 ± 7.2	45.6 ± 7.84	7.73 ± 4.0	53.4 ± 11.6
<i>Δpho87</i>	41.2 ± 9.95	36.3 ± 8.06	12.8 ± 3.85	13.9 ± 2.18 **
<i>Δpho89</i>	51.4 ± 7.01	37.3 ± 0.496	15.9 ± 4.67 *	39.5 ± 7.6
<i>Δpho90</i>	37.9 ± 2.41	38.3 ± 10.3	25.3 ± 4.9 **	36.6 ± 4.72
<i>Δpho91</i>	48.1 ± 1.72	46.7 ± 5.16	32.6 ± 4.8 **	30.1 ± 3.44 *

Полученные данные свидетельствуют о важном значении систем транспорта фосфата для адаптации к этанолу. Отметим, что при культивировании на глюкозе никакой разницы в характере кривых роста между исследуемыми штаммами найдено не было (не иллюстрируется).

Содержание полифосфатов в клетках мутантов по генам переносчиков фосфата. Для анализа содержания полиР мы выбрали, кроме штамма wt, также мутанты *Δpho87*, *Δpho89*, *Δpho90* и *Δpho91*, поскольку у этих штаммов наблюдали изменения кривых роста. В табл. 2 показано содержание кислоторастворимых полиР1 (относительно короткоцепочечных) и кислотонерастворимых полиР2 (относительно длинноцепочечных) в клетках родительского и мутантных штаммов при культивировании в среде с глюкозой в течение 24 ч или в среде с 4% этанолом в течение 60 ч.

Содержание ортофосфата в клетках всех штаммов при культивировании на глюкозе не имело статистически достоверных различий и составляло

34–39 и 20–25 мкмоль Р/г сырой биомассы при росте в средах с глюкозой и этанолом соответственно. При росте на глюкозе некоторые мутантные штаммы имели сниженное содержание полиР, однако это снижение не было значительным (табл. 2). При культивировании на этаноле, с одной стороны, произошли значительные изменения в содержании полиР у штамма wt (табл. 2), а с другой стороны, выявились различия между штаммами. Суммарное содержание полиР снизилось у всех штаммов в неодинаковой степени. Характерным изменением в содержании полиР при росте на этаноле является снижение содержания короткоцепочечных полиР1 и увеличение содержания длинноцепочечных полиР2 (Vagabov et al., 2008). Такое изменение в содержании полиР наблюдали только у штамма wt (табл. 2). У мутантных штаммов содержание полиР2 либо не увеличивалось, либо даже резко уменьшалось, как у штамма *Δpho87*. Снижение содержания полиР1 ни у одного из мутантных штаммов не достигало уровня, характерного для штамма wt. По-видимому, нарушение транспорта

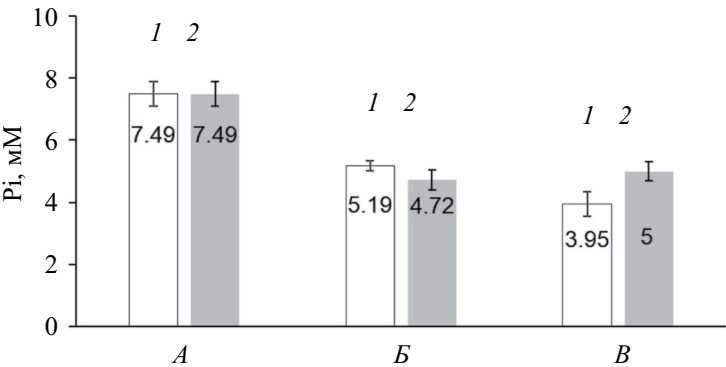


Рис. 3. Концентрация фосфата в среде до культивирования (А) и после культивирования штаммов *S. cerevisiae* в среде YPD с 2% глюкозой (Б) и YP с 4% этанолом (В): 1 – штамм wt; 2 – штамм *Δpho87*. Статистическую значимость оценивали относительно данных для штамма wt с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: В – $p < 0.01$; А и Б – разница статистически незначима.

фосфата через цитоплазматическую и вакуолярную мембрану вызывает изменения в содержании полиР разной длины цепи в условиях спиртового стресса. Кроме того, судя по снижению содержания полиР, эти полимеры с высокой энергией фосфоэфирной связи расходуются клетками на поддержание жизнеспособности на ранних стадиях роста, когда системы защиты от повышенной концентрации этанола еще не сформированы. В наибольшей степени снижено содержание полиР у штамма *Δrho87* (табл. 2). Отметим, что среда культивирования содержала свыше 7 мМ фосфата, что не является лимитирующей концентрацией. Мы проверили, как меняется концентрация фосфата к стационарной стадии роста на средах с глюкозой и этанолом для штамма wt и штамма *Δrho87*, поскольку этот мутант в наибольшей степени утратил свои полиР. Эти изменения позволяют оценить общую способность клеток дрожжей к поглощению фосфата из среды. Оказалось, что при культивировании в среде с глюкозой способность к поглощению фосфата не различалась у этих двух штаммов (рис. 3).

При культивировании в среде с 4% этанолом способность к поглощению фосфата у штамма *Δrho87* была снижена по сравнению со штаммом wt (рис. 3). Это объясняет низкий уровень полиР при культивировании мутантного штамма в среде с 4% этанолом. В литературе имеются сведения о сложных путях настройки активности переносчиков фосфата у дрожжей, когда происходит интеграция нескольких механизмов передачи сигналов, чтобы приспособить системы гомеостаза фосфора к общему статусу окружающей среды (Ghillebert et al., 2011; Eskes et al., 2018).

В совокупности наши результаты показывают, что переносчики фосфата Pho87, Pho89, Pho90 и Pho91 вовлечены в адаптационные процессы, позволяющие клеткам дрожжей преодолевать стресс, вызванный повышенной концентрацией этанола.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андреева Н.А., Кулаковская Т.В., Кулаковская Е.В., Кулаев И.С. Полифосфаты и экзополифосфатазы

в цитозоле и митохондриях *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании на глюкозе и этаноле в условиях гиперкомпенсации по фосфату // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 80–85.

Andreeva N.A., Kulakovskaya T.V., Kulakovskaya E.V., Kulaev I.S. Polyphosphates and exopolyphosphatases in cytosol and mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose or ethanol under phosphate surplus // Biochemistry (Moscow). 2008. V. 73. P. 65–69.

Вагабов В.М., Трилисенко Л.В., Кочеткова О.Ю., Ильченко А.П., Кулаев И.С. Влияние *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразона на синтез неорганических полифосфатов *Saccharomyces cerevisiae* в разных условиях роста // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 18–23.

Vagabov V.M., Trilisenko L.V., Kochetkova O.Y., Ilchenko A.P., Kulaev I.S. Effect of *m*-carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazon on inorganic polyphosphates synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under different growth conditions // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 15–20.

Розанов А.С., Котенко А.В., Акбердин И.Р., Пельтек С.Е. Рекомбинантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* для получения этанола из растительной биомассы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. С. 989–998.

Трилисенко Л.В., Валиахметов А.Я., Кулаковская Т.В. Физиологические особенности *Saccharomyces cerevisiae* при сверхэкспрессии полифосфатазы Ppx1 // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 396–403.

Trilisenko L.V., Valiaxmetov A.Ya., Kulakovskaya T.V. Physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strain overexpressing polyphosphatase Ppx1 // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 545–551.

Эльдаров М.А., Кишковская С.А., Танащук Т.Н., Марданов А.В. Геномика и биохимия винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Успехи биологической химии. 2016. Т. 56. С. 155–196.

Andreeva N., Ledova L., Ryazanova L., Tomashevsky A., Kulakovskaya T., Eldarov M. Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases // Biochimie. 2019. V. 163. P. 101–107.

Andreeva N., Ryazanova L., Ledova L., Trilisenko L., Kulakovskaya T. Stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing yeast polyphosphatases // Stresses. 2022. V. 2. P. 17–25.

Auesukaree C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation // J. Biosci. Bioeng. 2017. V. 124. P. 133–142.

Bubis J.A., Spasskaya D.S., Gorshkov V.A., Kjeldsen F., Kofanova A.M., Lekanov D.S., Gorshkov M.V., Karpov V.L., Tarasova I.A., Karpov D.S. Rpn4 and proteasome-mediated yeast resistance to ethanol includes regulation of autophagy // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 4027–4041.

- Denoncourt A., Downey M. Model systems for studying polyphosphate biology: a focus on microorganisms // *Curr. Genet.* 2021. V. 67. P. 331–346.
- Eskes E., Deprez M.A., Wilms T., Winderickx J. pH homeostasis in yeast; the phosphate perspective // *Curr. Genet.* 2018. V. 64. P. 155–161.
- Ghillebert R., Swinnen E., De Snijder P., Smets B., Winderickx J. Differential roles for the low-affinity phosphate transporters Pho87 and Pho90 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. J.* 2011. V. 434. P. 243–251.
- Kulakovskaya E., Zvonarev A., Kulakovskaya T. PHM6 and PHM7 genes are essential for phosphate surplus in the cells of *Saccharomyces cerevisiae* // *Arch. Microbiol.* 2023. V. 205. Art. 47.
- Ma M., Liu Z.L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 87. P. 829–845.
- Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. V. 78. P. 605–647.
- Sahana G.R., Balasubramanian B., Joseph K.S., Pappuswamy M., Liu W.-C., Meyyazhagan A., Kamyab H., Chelliapan S., Biljo V.J. A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: current knowledge in biotechnological applications and future directions // *Process Biochemistry.* 2024. V. 138. P. 1–13.
- Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J., Stanley G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Appl. Microbiol.* 2010. V. 109. P. 13–24.
- Vagabov V.M., Trilisenko L.V., Kulakovskaya T.V., Kulaev I.S. Effect of a carbon source on polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2008. V. 8. P. 877–882.
- Wolf I.R., Marques L.F., de Almeida L.F., Lázari L.C., de Moraes L.N., Cardoso L.H., Alves C.C.d.O., Nakajima R.T., Schnepfer A.P., Golim M.d.A., et al. Integrative analysis of the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. Art. 5646.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Knockout Mutations in the Genes Encoding Phosphate Transporters Impair Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Consumption

L. A. Ledova¹, L. P. Ryazanova¹, and T. V. Kulakovskaya^{1, *}

¹Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, 142290, Russia

*e-mail: alla@ibpm.ru

Abstract. Phosphate transporters in yeast cells are responsible for phosphorus homeostasis, and also indirectly involved in the regulation of various adaptive processes. One of these processes is the adaptation to ethanol consumption, which requires significant changes in phosphorus metabolism. We demonstrated that knockout mutations in the genes encoding phosphate transporters *PHO87*, *PHO89*, *PHO90* and *PHO91* impair adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol consumption at ethanol concentration of 4%. For these mutant strains an extension of the lag phase and in a decrease in the growth rate at the active stage was observed when the cells were cultivated in the medium with 4% ethanol. Mutant cells differ in the content of inorganic polyphosphates, but not orthophosphate, from the parental strain: they contain less long-chain polyphosphates when cultivated on ethanol, but not on glucose. When cultivated on a medium containing 4% ethanol, a strain with a knockout mutation in the *PHO84* gene, encoding the transporter of phosphate and divalent metals, as well as knockout strains for the *PHM6* and *PHM7* genes, responsible for the polyphosphate overplus, did not show any growth differences compared with parent strain in a medium with 4% ethanol. The possible role of phosphate transporters and inorganic polyphosphates in the adaptation of yeast to ethanol consumption is discussed.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, inorganic polyphosphate, phosphate transporter, ethanol, knockout mutation

УДК 57.083.13:579.243.13+579.22+57.017

ДЛИТЕЛЬНОЕ ВЫЖИВАНИЕ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ СТАБИЛИЗАЦИИ И ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК

© 2024 г. О. А. Галуза^{a, b, *}, Г. И. Эль-Регистан^a, Т. А. Канапачкий^a, Ю. А. Николаев^a

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

^b Bavar+ JSC, Moscow, 127206, Russia

*e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Молочнокислые бактерии (МКБ) играют важную роль в биотехнологиях и биомедицине. Их важнейшим недостатком является быстрое отмирание культур и препаратов при хранении. Изучение способов повышения длительности выживания молочнокислых бактерий в различных условиях является актуальной научно-прикладной задачей и составило цель настоящей работы. Объектом была молочнокислая бактерия *Enterococcus faecium*. Было показано, что в стареющих планктонных культурах бактерии быстро теряют жизнеспособность (численность жизнеспособных клеток за 1 мес. снижается на 2–4 порядка). Цикл развития популяции *E. faecium* в этих условиях завершается образованием цистоподобных покоящихся клеток двух типов: L-форм и гипометаболических клеток. Применение химических стабилизаторов, гуминовых веществ (типичных компонентов почв), повышает численность выживающих клеток в 2–3 раза. При поверхностной иммобилизации (адсорбции) на органо-силанольных или неорганических носителях (органосилан, кремнезем) численность выживающих в условиях голодания клеток повышается в 1.25–3 раза. Наиболее эффективным подходом была иммобилизация клеток в силанольно-гуматные гели (повышение численности выживающих клеток до 35 раз относительно контроля). Полученные данные раскрывают механизмы и формы выживания МКБ в природных условиях (состояние гипометаболизма, наличие специализированных форм покоя), а также могут быть использованы для разработки способов длительного хранения МКБ в их биопрепаратах.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Enterococcus faecium*, формы выживания, иммобилизация бактерий, жизнеспособность бактерий, биопрепараты

DOI: 10.31857/S0026365624050096

Одна из характеристик живых систем — это периодичность их развития. У микроорганизмов развитие их популяций как вида, а на более высоком уровне — развитие микробных сообществ, также осуществляется периодически. Одной из стадий цикла развития микробных популяций в условиях, не благоприятствующих росту, является стадия их выживания, сопряженная с метаболическим покоем клеток. Особое внимание уделяется изучению покоя патогенных и симбионтных бактерий, к которым относятся молочнокислые бактерии (МКБ), чья роль в симбиозе с человеком хорошо освещена (Lyte, 2013; Oleskin et al., 2014; Oleskin, Shenderov, 2020; Олескин и соавт., 2020). Такое внимание к формам покоя бактерий обусловлено их ролью в персистенции патогенных и условно-патогенных бактерий как формах носительства и причине

рецидивов инфекционных заболеваний, а также очевидным значением для сохранения жизнеспособных клеток в биотехнологиях и сферах деятельности человека, связанных с микроорганизмами. При использовании биокатализаторов акцент делается на получении препаратов не на основе покоящихся форм, а напротив, клеток, длительно обладающих высокой функциональной активностью, иммобилизованных тем или иным способом (Ефременко, 2018; Radosavljević et al., 2022). Такого рода препараты нуждаются в наличии (или постоянном поступлении) источников питания для поддержания жизнеспособности и метаболической активности иммобилизованных клеток (Ефременко, 2018).

Одной из перспективных основ для биопрепаратов являются формы покоя (ПФ), покоящиеся

клетки цистоподобного типа (ЦПК) (Бухарин и соавт., 2005; Эль-Регистан и соавт., 2006; Мулюкин и соавт., 2009). ЦПК образуются на завершающей стадии развития периодических культур грамотрицательных бактерий (а также — и грамположительных в условиях репрессии спорообразования). Численность ЦПК, как правило, невелика (от 0.01 до 1%) и соответствует численности клеток-персистеров (Balaban et al., 2004, 2019). Покоящиеся формы типа ЦПК были описаны и у молочнокислых бактерий (Голод и соавт., 2009; Лойко и соавт., 2014; Эль-Регистан и соавт., 2023).

Ранее было установлено положительное влияние гуминовых веществ на длительное выживание планктонных культур углеводородокисляющих бактерий (Nikolaev et al., 2020; Николаев и соавт., 2019, 2020) и их иммобилизованные клетки в силанольно-гуматных гелях (Николаев и соавт., 2021; Nikolaev et al., 2021). Эти подходы не были испытаны для стабилизации культур МКБ в ходе длительного хранения.

Целью настоящей работы было исследовать эффективность различных приемов длительного хранения молочнокислой бактерии *Enterococcus faecium*: (1) в виде планктонных культур, (2) в планктонных популяциях, иммобилизованных на поверхности гелей или в силанольно-гуматные гели, (3) в планктонных популяциях в присутствии гуматов, (4) в популяциях, выращенных в присутствии гелевых сорбентов.

Интерес к этому объекту вызван тем, что он входит в состав пробиотических продуктов, а также может быть пробиотиком кормового назначения (Azzaz et al., 2022).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе была использована бактерия *Enterococcus faecium* M3185 из коллекции UNIQEM Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.

Условия культивирования. Бактерии культивировали в жидких и на плотных средах: MRS (“Conda Pronadisa”, Испания) и LB (лизогенный бульон Луриа-Бертани, “VWR Chemicals”, США), обезжиренном молоке (сухое молоко, “Уфа-молоко”, РФ). Бактерии выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл среды на орбитальной качалке (120 об./мин), а также в пенициллиновых флаконах объемом 10 мл с 2 мл среды на орбитальном шейкере Biosan PSU-20i (“BioSan”, Латвия) (150 об./мин) при температуре 28°. Инокулятом служили стационарные культуры, выращенные в колбах, как описано выше, в течение 24 ч (до стационарной фазы).

Численность жизнеспособных клеток бактерий определяли микрометодом (Pious et al., 2015) по числу колониеобразующих единиц (КОЕ),

высевая аликвоты (5 мкл) десятичных разведений бактериальных культур на плотную среду LB (1.5% агара) и подсчитывая количество выросших колоний на 1, 3, 5 и 7 сут инкубации (Нетрусов и соавт., 2005).

Определение метаболической активности. О метаболической активности (гетероферментативном молочнокислом брожении) бактерий судили по интенсивности выделения ими CO₂. Аликвоты бактериальной суспензии (400 мкл) вносили в герметически закрытый флакон объемом 40 мл с 4 мл солевого фона среды MRS (pH 5.5–5.0) и инкубировали на орбитальном шейкере Biosan, PSU-200 (“Biosan”, Латвия) при температуре 28° в течение 24 ч. После стабилизации уровня CO₂ в газовой фазе (через 1–2 ч после введения пробы) вносили раствор глюкозы (400 мл до концентрации 0.8%) и инкубировали 24 ч. Периодически отбирали шприцем пробы газовой фазы и определяли в них количество выделенного CO₂ хроматографически (Кристалл 5000, “Хроматэк”, РФ). По количеству выделенного CO₂ судили о метаболической активности (брожении) клеток в условиях наличия субстрата, глюкозы. Метаболическая активность клеток энтерококков была использована как косвенный показатель количества жизнеспособных клеток и глубины их покоя.

Способы пролонгирования жизнеспособности клеток *E. faecium*. Для стабилизации клеток энтерококков использовали четыре разных подхода: 1) к клеткам, выращенным в жидкой среде до стационарной фазы, добавляли химические стабилизаторы — гуматы (табл. 1); 2) клетки стационарной фазы иммобилизовали поверхностно на сорбентах (табл. 2); 3) клетки стационарной фазы иммобилизовали в силанольно-гуматные гели; 4) клетки выращивали в жидкой культуре в присутствии гелей (табл. 3). В последнем случае имело место микро-гетерофазное культивирование, поскольку в среде присутствовали две фазы — жидкая и твердая, но при этом реологические свойства жидкости позволяли выращивать культуру как жидкую, т.е. в колбах на качалке. Контроль выживаемости клеток осуществляли путем определения численности КОЕ/мл и метаболической активности клеток, как описано выше.

Применение химических стабилизаторов. В бактериальные культуры стационарной фазы роста, выращенные в колбах, как описано выше, и разлитые в пробирки Хангейта (объемом 20 мл по 5 мл), вносили водные растворы гуматов (табл. 1) до конечной концентрации 0.15 или 0.5 г/л. Образцы хранили в статических условиях при комнатной температуре в течение нескольких месяцев, периодически отбирая пробы для определения численности жизнеспособных клеток (КОЕ/мл).

Иммобилизация выращенных клеток с использованием гелей. В работе использовали три типа гелей на основе кремниевых соединений. Для

Таблица 1. Характеристика гуминовых веществ, использованных для стабилизации клеток *E. faecium*

Наименование	Характеристика, источник
Гумат Сахалинский ("Биомир 2000", Москва, РФ)	Раствор 5% щелочной вытяжки из леонардита
Лигногумат (ООО "НПО РЭТ", Санкт-Петербург, РФ)	Растворимый порошок, полусинтетического происхождения. Лигносульфонат
Гуматы Техноэкспорт (ТПК "Техноэкспорт", Украина)	Растворимый порошок с содержанием не менее 70% гуминовых солей, полученных из бурого угля
Паохумус (Powhumus WSG) ("Humintech Ltd", Германия)	Растворимый порошок гумата калия, произведенный по технологии мокрой щелочной экстракции из леонардита
Иркутские гуматы (Humate +7) ("АгроТехГУМАТ", Иркутск, РФ)	Растворимый порошок гумата калия и натрия, получаемый из бурого угля
Фульвокислоты (Fulvital WSP 80) ("Humintech Ltd", Германия)	Растворимый порошок; источник – подземные воды

Таблица 2. Характеристика гелей, использованных для стабилизации клеток *E. faecium*, предварительно выращенных в жидкой культуре

Наименование	Характеристика	Концентрация, г/л
Энтеросгель (ООО "ТНК Силма", Москва, РФ)	Гелеобразная суспензия полигидрата полиметилсилоксана	70
Полисорб МП (АО "Полисорб", Копейск, РФ)	Гелеобразная суспензия из диоксида кремния	50 или 40
Силанольно-гуматный гель (Лабораторное получение)	Гель, состоящий из гуматов Паохумус или Байкал и органо-силанольного полимера	17 или 24

Таблица 3. Характеристика сорбентов, использованных для стабилизации клеток *E. faecium*, в ходе гетерофазного культивирования

Наименование	Характеристика	Концентрация, г/л
Энтеросгель (ООО "ТНК Силма")	Пористая глобулярная структура полиметилсилоксана полигидрата (кремнийорганическое соединение), размер частиц не более 300 мкм	4
Полисорб МП (АО "Полисорб")	Мелкодисперсный диоксид кремния, размер частиц до 90 мкм	3.3

поверхностной иммобилизации использовали полиметилсилоксан (Энтеросгель) и высокодисперсный кремнезем (Полисорб), для иммобилизации в матрицу геля использовали силанольно-гуматный гель (табл. 2). Для иммобилизации на поверхность гелей клетки стационарной фазы роста смешивали со свежеприготовленным гелем (1 : 1, об./об.; концентрация гелей – см. табл. 2), разливали по пробиркам типа Фалькон (15 мл) или Эппендорф (2 мл) и оставляли до застывания геля, затем хранили в течение нескольких месяцев, периодически определяли численность жизнеспособных клеток (КОЕ/мл).

Полиметилсилоксана полигидрат представлен в виде гелеобразующей матрицы, которая имеет глобулярное строение и состоит из ансамбля глобул. Глобулы, связываясь между собой силоксановыми

связями, формируют поры в виде пространства между ними, заполненные водой. Частицы препарата, как правило, образуют непрерывную сеть в суспензии. Эти частицы можно рассматривать как двумерные листы. Глобулы метилкремниевой кислоты имеют размеры до 300 мкм (Маркелов и соавт., 2008).

Высокодисперсный кремнезем – коллоидный диоксид кремния с химической формулой SiO_2 . При попадании в воду присоединяет к себе гидроксильные группы и формирует сложную пространственную структуру. Частицы диоксида кремния имеют размеры до 90 мкм (Маркелов и соавт., 2008).

Иммобилизация клеток бактерий в силанольно-гуматные гели. Силанольно-гуматные гели получали при использовании двух видов гуматов Паохумус (Powhumus WSG) ("Humintech", Германия)

и Байкал (“АгроТехГумат”, РФ) и органосилана 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС) (“АГМ-9”, ООО “Пента 91”, Россия) по разработанной ранее методике (Volikov et al., 2016) с модификацией (Nikolaev et al., 2021; Николаев и соавт., 2021). К 10 мл 10% раствора гумата при интенсивном перемешивании добавляли 250 или 350 мкл АПТЭС; полученный раствор титровали 10% раствором уксусной кислоты до значений pH 6–7, затем вносили 5 мл культуры энтерококка стационарной фазы роста, не переставая перемешивать. Полученную смесь разливали по 1 мл в конические пробирки Эппендорф объемом 2 мл. В течение 1–2 ч при комнатной температуре происходило желирование смеси. Гель сохранял свои свойства в течение нескольких месяцев, при добавлении воды и интенсивном перемешивании растворялся с высвобождением бактериальных клеток, что обуславливало возможность определения их жизнеспособности (КОЕ/мл), как описано выше.

Микроскопические наблюдения. Для оценки степени адгезии клеток бактерий на различных поверхностях и их авто-агрегирования применяли люминесцентную микроскопию на световом эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager D1 (“Carl Zeiss Microscopy GmbH”, Германия) с фазово-контрастным объективом, а также с использованием флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый (“Molecular probes”, США). Использование красителя было необходимо для повышения контрастности изображений.

Электронно-микроскопические исследования. Биомассу бактерий фиксировали 1.5% раствором глutarового альдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) при температуре 4° в течение 1 ч, затем трижды отмывали тем же буфером и фиксировали 1% раствором оксида осмия (OsO_4) в 0.05 М какодилатном буфере. После обезвоживания в серии спиртов материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Затем готовили ультратонкие срезы на микротоме LKB-III (Швеция), срезы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу при 20° в течение 4–5 мин. Готовые срезы просматривали в микроскопе JEM 1400 (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 120 кВ.

Определение терморезистентности клеток бактерий. О количестве терморезистентных клеток бактерий судили по доле выживших клеток после прогревания аликвот (500 мкл) бактериальных суспензий при температуре 70° в течение 15 мин в пластиковых пробирках типа Эппендорф на термошейкере TS-100 (“Biosan”, Латвия) с последующим высевом на плотную питательную среду для определения численности выживших клеток (КОЕ/мл).

Исследование диссоциации бактериальных популяций. Индекс диссоциации бактериальной популяции определяли как долю (%) выросших на агаризованной среде колоний определенного фенотипа к общему числу колоний. Признаками,

характеризующими фенотип, были цвет, консистенция и размер колоний.

Образование покоящихся форм бактерий. Покоящиеся формы (ПФ) бактерий получали при длительном хранении в статическом режиме планктонных культур. Культуры *E. faecium*, выращенные до стационарной фазы роста, хранили в течение 6 мес. в условиях разного доступа кислорода: (1) в колбах с ватными пробками (максимальный доступ кислорода под малым слоем жидкости); (2) в пробирках Хангейта с ватными пробками (ограниченный доступ кислорода в более высоком столбе жидкости); (3) в пробирках Хангейта с пластмассовыми крышками с резиновой прокладкой (без доступа кислорода). Об образовании ПФ судили по: сохранению ими жизнеспособности (образованию колоний на плотных средах); более высокой терморезистентности; отсутствию метаболической активности (на основе выделения CO_2); а также по особенностям их ультраструктурной организации. Эти признаки считаются необходимыми признаками форм покоя (Бухарин и соавт., 2005).

Статистическая обработка данных. Все исследования выполнены в двух биологических повторностях, по три параллельных эксперимента (технические повторности) в каждом. При расчетах определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение для $p < 0.05$ с использованием программы Microsoft Excel 2016. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали стандартное отклонение, обычно не превышающее 30%. На рисунках представлены данные типичных экспериментов, в таблицах — средние значения параметров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании энтерококка в молоке или жидкой среде LB в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды в условиях аэрации на роторной качалке, стационарная фаза наступала через 24 ч, максимальный урожай составлял 10^9 КОЕ/мл. В последующих экспериментах в качестве инокулята использовали стационарные культуры *E. faecium*, выращенные в колбах с перемешиванием в течение 24 ч.

Кривая отмирания популяции *E. faecium*, выращенной на молоке, типичный вид которой представлен на рис. 1, состояла из трех участков.

До 4 сут численность КОЕ не менялась, что соответствует стационарной фазе; в период от 4 до 14 сут скорость отмирания была максимальной, что отражает фазу отмирания обычных стационарных клеток; затем скорость отмирания уменьшалась, образуя “плато” — длительную фазу медленного отмирания, характерную для отмирания субпопуляции клеток-персистеров (Balaban et al., 2004, 2019). Доля выживающих клеток составляла 0.001–1%, что соответствует численности клеток-персистеров,

образующихся в стационарных культурах бактерий (Balaban et al., 2004) и созревающих в культурах возрастом несколько месяцев в ЦПК (Мулюкин и соавт., 2009, 2014).

*Сравнение эффективности различных способов пролонгированного хранения *E. faecium**

Для пролонгированного сохранения жизнеспособности (КОЕ/мл) молочнокислых бактерий *E. faecium* были использованы способы, аналогичные факторам естественной среды обитания МКБ: (1) действие химических стабилизаторов – гуматов при их внесении в стационарные культуры *E. faecium*; (2) иммобилизацию клеток стационарной культуры на поверхность частиц геля; (3) иммобилизацию клеток стационарной культуры в гели различного состава; (4) иммобилизацию клеток на носителях, внесенных вместе с инокулятом и последующим глубинным гетерофазным культивированием.

Полученные препараты хранили в “провокационных условиях”, т.е. при комнатной температуре и доступе кислорода в статическом режиме в течение 6 мес., периодически определяя титр жизнеспособных клеток (КОЕ/мл).

Влияние гуминовых веществ на выживаемость клеток *E. faecium*. Гуминовые вещества содержат остатки фенольных соединений, в том числе и алкилрезорцинов, которые обладают активностью факторов межклеточной коммуникации микроорганизмов и проявляют антистрессовую

и антиоксидантную активность (Kozubek et al., 2001; Николаев и соавт., 2006; Эль-Регистан и соавт., 2006; Sampietro et al., 2013). Внесение ГВ в культуры углеводородокисляющих бактерий (УОБ) стационарной фазы роста способствовало кратному увеличению числа выживающих клеток при их длительном хранении до 4 мес. (Nikolaev et al., 2019). Основываясь на этих результатах, было исследовано выживание клеток энтерококка в присутствии 6 видов гуминовых веществ, различных по составу и происхождению (табл. 1), при их внесении в концентрациях 0.15 и 0.5 г/л в стационарные культуры энтерококка с последующим хранением в течение 1 мес.

Существенное, более чем на 50%, увеличение численности КОЕ наблюдали в присутствии 0.15 г/л Паохумуса и Фульвокислот (рис. 2). Другие гуматы оказывали на титр КОЕ минимальный или отрицательный эффект (рис. 2). Увеличение концентрации ГВ до 0.5 г/л снижало защитный эффект Паохумуса и Фульвокислот и не изменяло эффекта для других ГВ (данные не приводятся).

Таким образом, протекторный эффект ГВ относительно МКБ зависит как от вида гумата, так и от концентрации, аналогично тому, как это было описано для углеводородокисляющих бактерий (УОБ) (Николаев и соавт., 2019, 2020; Nikolaev et al., 2020). При этом защитное влияние гуматов на выживание энтерококка существенно ниже, чем на выживание углеводородокисляющих бактерий, где количество выживших клеток повышалось до 10 раз. Относительно УОБ максимальное защитное действие также оказывал гумат Паохумус.

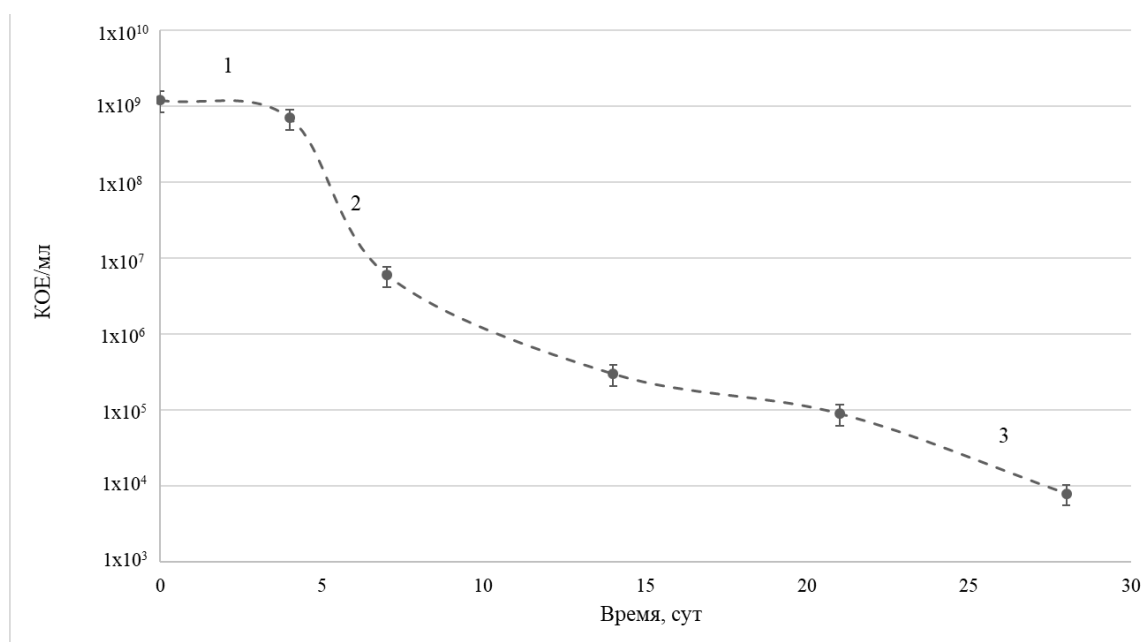


Рис. 1. Динамика изменения численности жизнеспособных клеток *E. faecium* в популяции, выращенной в обезжиренном молоке, при хранении в статических условиях с доступом кислорода воздуха в течение 1 мес. Цифрами отмечены фазы отмирания: 1 – стационарная, 2 – быстрого отмирания, 3 – плато.

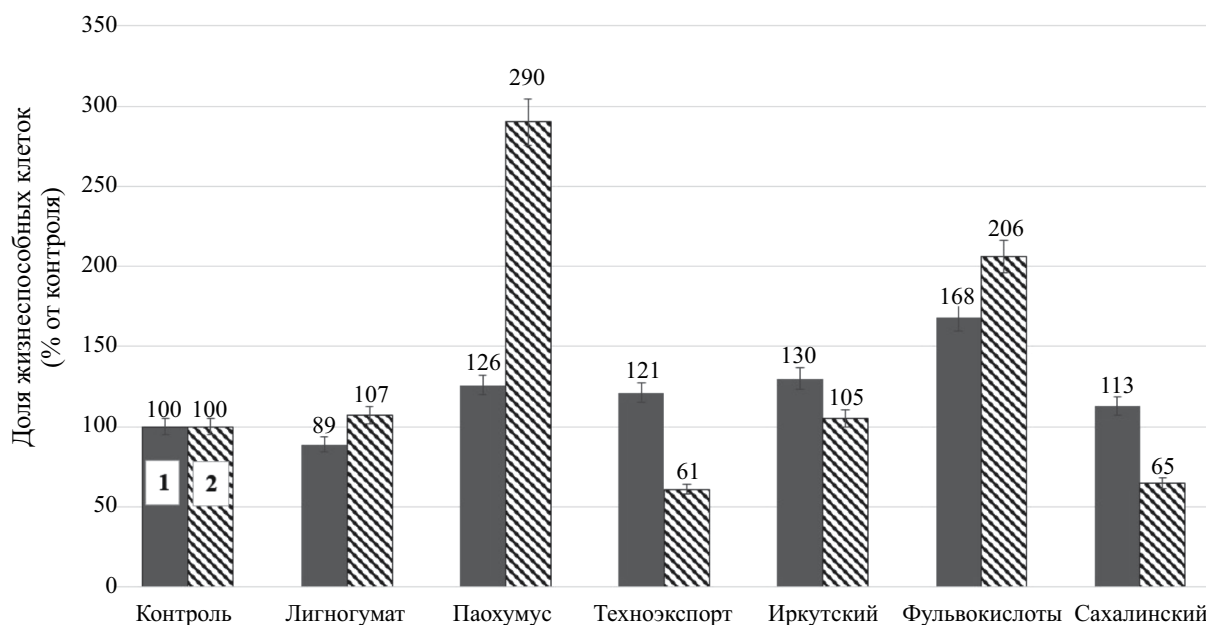


Рис. 2. Доля (% от контроля) выживших клеток *E. faecium*, хранившихся в течение 1 мес. в контрольном (без добавления ГВ) и опытных вариантах с внесением ГВ в концентрации 0.5 г/л (столбец отмечен цифрой 1) и 0.15 г/л (столбец отмечен цифрой 2).

На выживаемость клеток большее влияние оказывали не концентрации вносимых гуматов, 0.15 или 0.5 г/л, а условия хранения образцов — с или без доступа кислорода воздуха (рис. 3).

При внесении гуматов Паохумус и Фульвокислоты в концентрации 0.15 г/л и хранении образцов без доступа кислорода воздуха, было отмечено превышение контрольных значений на 26 и 68% соответственно. При хранении с доступом кислорода воздуха доля выживших клеток в этих вариантах возрастала до 290 и 206% от контроля соответственно.

Причина максимального стрессопротекторного действия со стороны гуматов, а именно Паохумус и Фульвокислоты, очевидно, связана с особенностями их химического состава. Так, эти ГВ характеризовались максимальным содержанием углерода алкильных звеньев (остатков алканов) и минимальным содержанием ароматического углерода, замещенного гетероатомами (гетероциклических соединений) (Nikolaev et al., 2020).

Все препараты с ГВ характеризовались снижением метаболической активности клеток относительно контроля (рис. 3), что свойственно формам выживания бактерий, сохраняющим лишь минимальный уровень метаболизма (Бухарин и соавт., 2005; Fleischmann et al., 2021; Wainwright et al., 2021).

Однако, если бы все клетки были аналогичны аметаболическим цистоподобным покоящимся клеткам, можно было ожидать полного отсутствия метаболической активности. Поскольку этого не наблюдали, можно заключить, что не все клетки

перешли в состояние полного метаболического покоя, а находятся в состоянии гипометаболизма.

Таким образом, на выживание клеток энтерококка при их хранении в течение 1 мес. положительно влияли: внесение в стационарные культуры препаратов гуматов Паохумус и Фульвокислоты, а также хранение культур с доступом кислорода воздуха.

Положительное влияние кислорода на МКБ, обладающие бродительным метаболизмом, т.е. не нуждающиеся в кислороде, связано с тем, что МКБ способны к аэробному дыханию в присутствии гемов в окружающей среде, что повышает их метаболическую активность (Condon, 1987; Maresca et al., 2018; Брюханов и соавт., 2022). Авторы работы Gaudu et al. (2002) предсказали, что выживание лактококков в присутствии экзогенных гемов должно быть выше в аэробных условиях, что мы и наблюдали в нашей работе.

Выживание клеток *E. faecium* при их иммобилизации на/в органические и неорганические гели. Еще один вариант существования микроорганизмов в природе — их развитие на поверхности или в органических и неорганических гелях. Бактериальные клетки, в адсорбированном на твердых носителях состоянии и иммобилизованные в гели, при постоянном поступлении источников питания длительно сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность (Ефременко и соавт., 2018). О выживании иммобилизованных в гелях бактерий в отсутствие источников питания информации нет, хотя такие ситуации в природе естественны.

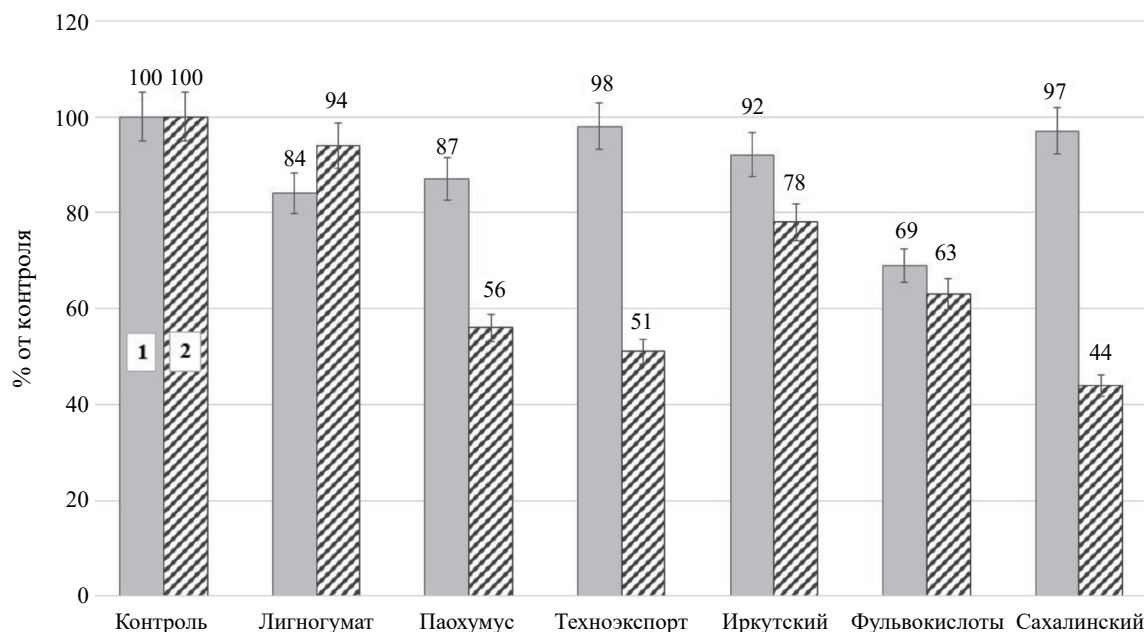


Рис. 3. Доля (% от контроля) выживших клеток *E. faecium*, хранившихся в течение 1 мес. в контрольном (без добавления ГВ) и опытных вариантах с внесением ГВ в концентрации 0.15 г/л и при хранении с ограничением доступа (столбец отмечен цифрой 1) и без ограничения доступа кислорода воздуха (столбец отмечен цифрой 2).

Имобилизация на поверхность гелей из органиносилана и кремнезема. В наших экспериментах культуру *E. faecium*, выращенную в молоке до стационарной фазы роста, смешивали с гелями разной природы — из органиносилана (Энтеросгель) и кремнезема (Полисорб) в соотношении 1 : 1, как описано выше (Материалы и методы исследования) и затем хранили в течение 1 мес.

Суспензии гелей состояли из частиц размером 30–300 мкм, что определено с использованием люминесцентного микроскопа (рис. 4).

Люминесцентная микроскопия образцов показала, что клетки бактерий располагались на поверхностях гелевых частиц (рис. 4). За время хранения в контроле (планктонная культура) численность выживших клеток снизилась до 2.5×10^7 КОЕ/мл, что составило 0.8% от исходной численности жизнеспособных клеток стационарной культуры (3×10^9 КОЕ/мл). В опытных вариантах — при хранении в гелях, титр КОЕ был достоверно выше: в вариантах с Полисорбом (50 г/л) — 1×10^8 КОЕ/мл, в варианте с Энтеросгелем — 6×10^7 КОЕ/мл (рис. 5), т.е. в 3 и 1.25 раза выше, чем в контроле, соответственно.

Имобилизация в силанольно-гуматные гели. АПТЭС является основным гелеобразователем в силанольно-гуматных гелях; чем выше его концентрация, тем тверже гель (Volikov et al., 2016). При исходной концентрации 25 мкл/мл (что соответствует 1.7% в окончательном препарате геля) гель имел полужидкую сметанообразную

консистенцию, при 35 мкл/мл (2.3% в окончательном препарате) гель имел консистенцию мягкой силиконовой резины. В обоих случаях клетки располагались в толще геля достаточно равномерно, макроскопических неравномерностей в геле не наблюдали (рис. 4).

Через 1 мес. хранения численность выживших клеток в контроле (планктонная культура) снизилась до 2×10^6 КОЕ/мл (что составляет 0.87% от исходного титра 2.3×10^8 КОЕ/мл), тогда как в опытных вариантах она была в 2–7 раз выше для гелей на основе гумата Байкал и в 10–35 раз выше для гелей на основе Паохумуса (рис. 6). Таким образом, гель на основе Паохумуса был более эффективен, чем на основе гумата Байкал. При этом плотность гелей сказывалась по-разному на выживании бактерий: Паохумус более эффективен в мягком состоянии, Байкал — в более плотном.

Уровень метаболической активности клеток на эндогенном (остаточном) субстрате в стабилизированных культурах был в 20 раз выше, чем в контрольном варианте (табл. 4), что указывает на наличие более высокого метаболизма.

При этом в образцах с ГВ Байкал активность была выше, чем в образцах с ГВ Паохумус (0.13 и 0.1% $\text{CO}_2/\text{ч}$ соответственно) (табл. 4), что объясняется более глубоким метаболическим покоем клеток, хранящихся в СГГ с ГВ Паохумус. Эффект более медленной реактивации глубоко покоящихся клеток неоднократно отмечался ранее, в том числе в нашей предыдущей статье при анализе

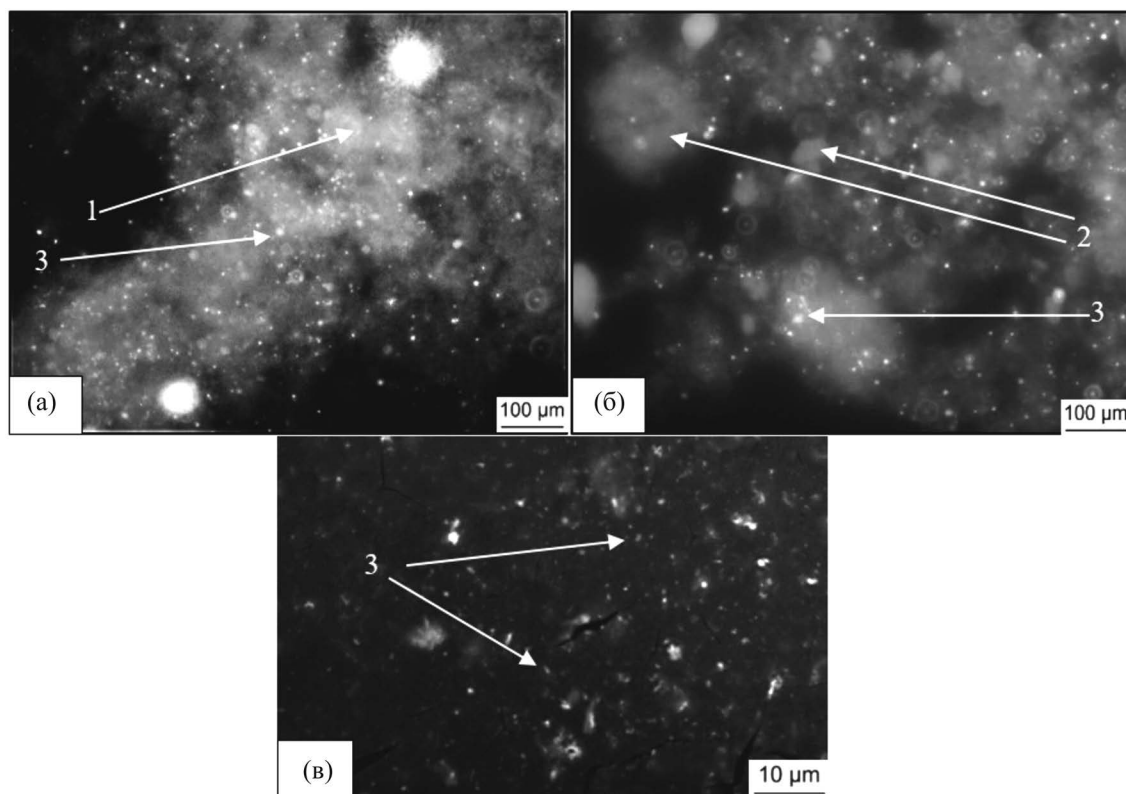


Рис. 4. Клетки *E. faecium*, сорбированные на поверхностях гелевых частиц или в геле: а – препарат Энтеросгель; б – препарат Полисорб; в – СГГ на основе гумата Паохумус. 1 – Частицы полиметилсилоксана полигидрата; 2 – частицы мелкодисперсного кремнезема (Полисорб); 3 – сорбированные клетки *E. faecium*. Люминесцентная микроскопия.

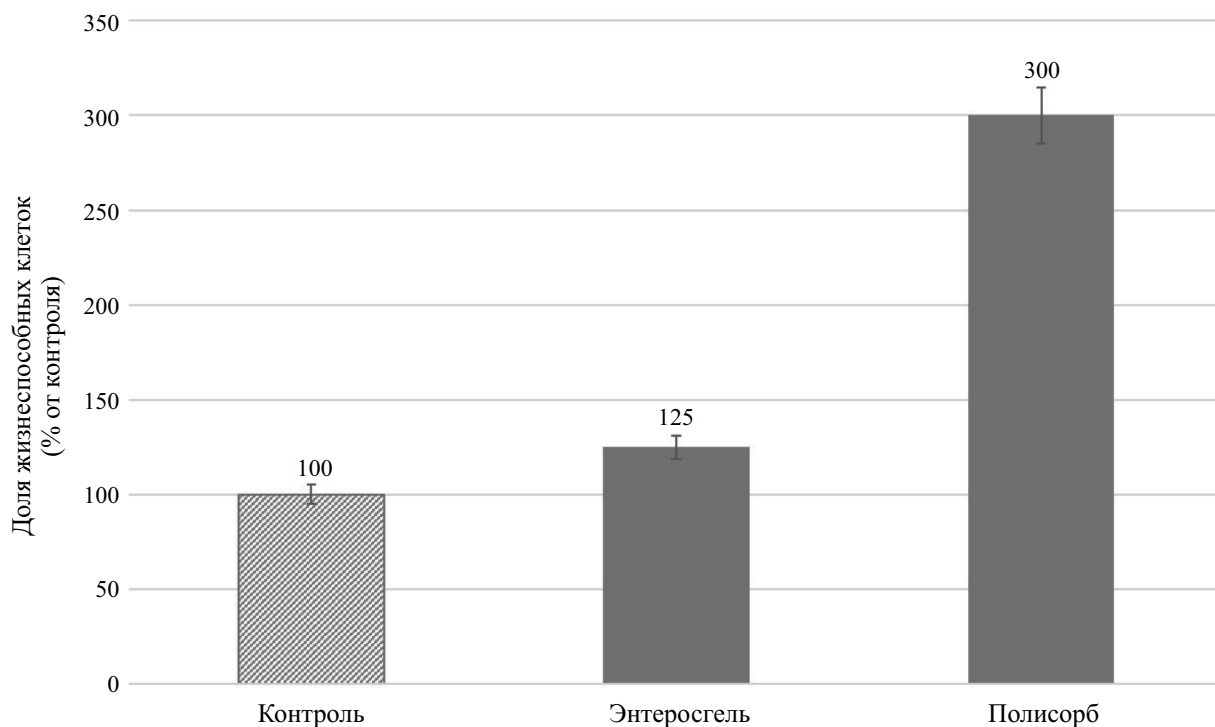


Рис. 5. Доля (% от контроля) выживших клеток популяции *E. faecium*, выращенных в молоке, при хранении в течение месяца в контрольном (без добавления стабилизаторов) и опытных вариантах с внесением стабилизаторов.

прорастании ПФ другой МКБ — *E. durans* (Николаев и соавт., 2022).

Выживание клеток *E. faecium* после гетерофазного выращивания с гелевыми сорбентами. Наиболее распространенным в природе способом существования микроорганизмов является их развитие в виде биопленок. Эта способность свойственна всем микроорганизмам, в том числе молочнокислым бактериям (Mgomi et al., 2023). В наших экспериментах проверяли степень выживания клеток *E. faecium*, выросших при их гетерофазном глубинном культивировании в молоке в режиме принудительного перемешивания в присутствии различных сорбентов (табл. 2) до стационарной фазы роста и затем хранящихся в течение 1 мес. в статических условиях с и без доступа воздуха.

Природа сорбентов не оказывала влияния на максимальную численность выросших стационарных культур; во всех вариантах опытов она составила $\sim 10^9$ КОЕ/мл. Динамика отмирания популяций также была схожа. Однако в вариантах с внесением Энтеростеля через 1 мес. хранения

выживало больше клеток, чем в вариантах роста с Полисорбом и в контроле. При этом в условиях ограничения доступа кислорода воздуха выживало 125% от контроля, а в условиях доступа воздуха $\sim 400\%$ (5×10^7 КОЕ/мл) от контроля (1.15×10^7 КОЕ/мл) (рис. 7).

Таким образом, как и в вариантах длительной инкубации планктонных культур с внесением гуматов, доступность кислорода воздуха при хранении адсорбированных популяций *E. faecium* играет положительную роль в сохранении жизнеспособности клеток энтерококка.

Отметим, что гетерофазное культивирование известно в биотехнологии как способ получения микробной биомассы в качестве целевого продукта. При этом численность микробных клеток на единицу объема не увеличивается, что было также подтверждено в настоящем исследовании, где этот показатель составлял в стационарной фазе культур *E. faecium* в присутствии разных сорбентов около 10^9 кл./мл. Однако выживаемость

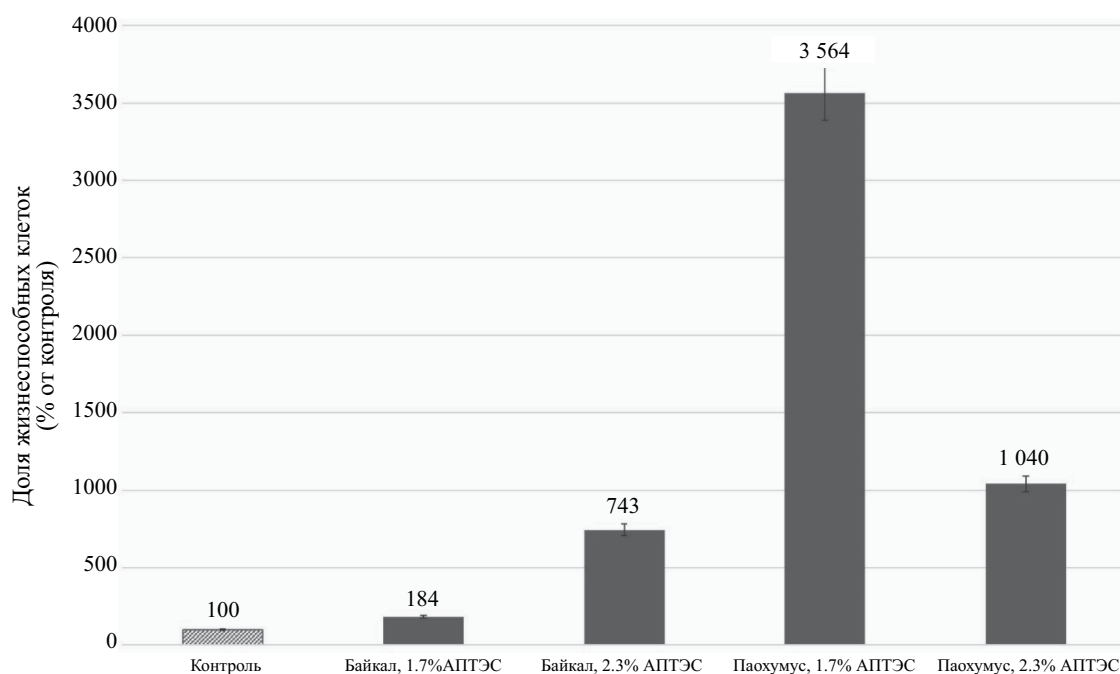


Рис. 6. Доля (% от контроля) выживших клеток *E. faecium*, выращенных в молоке, при хранении в течение 1 мес. в контрольном (планктонная культура) и опытных вариантах в СГГ.

Таблица 4. Уровни метаболической активности клеток (брожения) на эндогенном субстрате после 1 мес. хранения, ‰ CO₂/ч

Стационарная культура	Контроль (стационарная культура, 1 мес.)	Байкал, 1.7% АПТЭС	Байкал, 2.3% АПТЭС	Паохумус, 1.7% АПТЭС	Паохумус, 2.3% АПТЭС
0.24 ± 0.005	0.005 ± 0.005	0.12 ± 0.005	0.14 ± 0.005	0.1 ± 0.005	0.1 ± 0.005

клеток через 1 мес. хранения популяций, выросших в присутствии сорбентов, была выше, чем в контроле до 4 раз и зависела от природы сорбента и условий хранения. Выращивание МКБ на сорбентах может быть перспективно для получения более стабильных препаратов.

Таким образом, испытанные способы повышения жизнеспособности клеток молочнокислой бактерии *E. faecium* при длительном хранении показали разную эффективность (табл. 5). Умеренное кратное возрастание титра КОЕ наблюдали при использовании гуматов и гелей на основе кремния. В последнем случае не было существенной разницы между внесением гелей в культуру клеток или выращиванием клеток в их присутствии. Наилучший эффект был при иммобилизации клеток стационарной фазы в СГГ (в 35 раз выше, чем в контроле).

Таким образом, как и в случае углеводородокисляющих бактерий (Nikolaev et al., 2021; Николаев и соавт., 2021), наилучший результат получен путем иммобилизации клеток в гели, а не на поверхность сорбентов. Были исследованы причины длительного выживания клеток *E. faecium* в жидких культурах.

Образование длительно выживающих покоящихся форм *E. faecium* при пролонгированном хранении их планктонных культур

Известно, что МКБ образуют ПФ разных типов при длительном хранении их культур (Голод и соавт., 2009; Лойко и соавт., 2014) – толстостенные и тонкостенные ЦПК и L-формы. Для объекта настоящего исследования, *E. faecium*, образование ПФ ранее не было показано.

При длительном хранении при комнатной температуре в стационарном режиме (до 6 мес.) планктонных культур *E. faecium*, выросших в обезжиренном молоке и среде LB до стационарной фазы роста, обнаружены признаки, необходимые и достаточные для заключения о наличии покоящихся форм (Chambliss, Vary, 1978; Эль-Регистан и соавт., 2006) (табл. 6). В таких культурах, полученных в естественном цикле развития культуры, сохранялся высокий титр жизнеспособных клеток в неростовых условиях (голодание) – доли и единицы %; клетки обладали стрессоустойчивостью (терморезистентностью) и характерными свойствами ультраструктурной организации

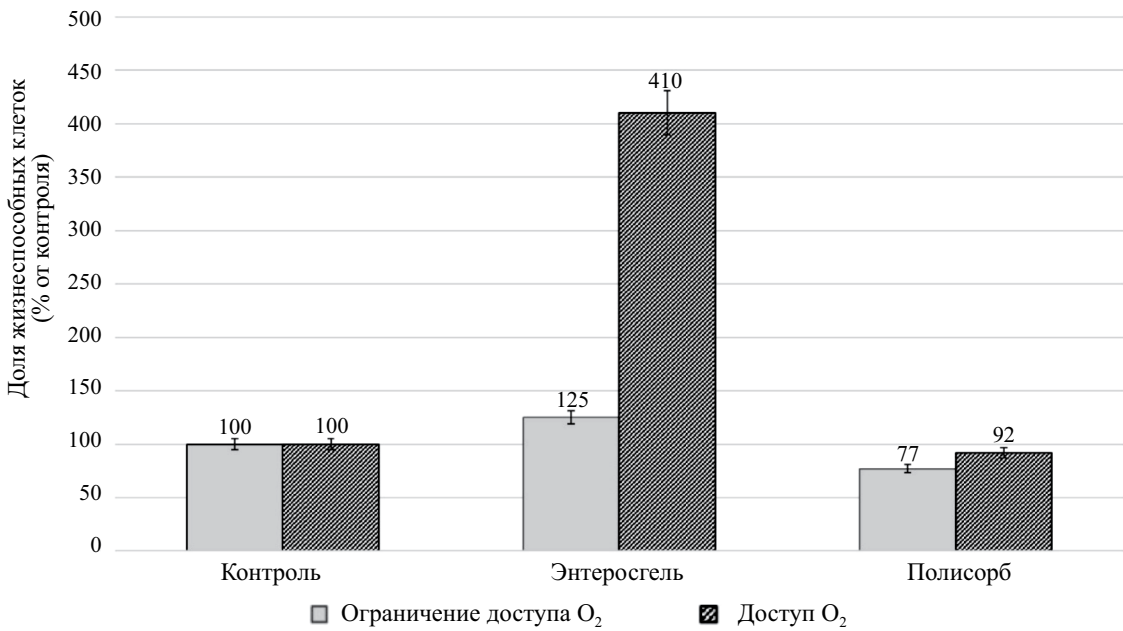


Рис. 7. Доля (% от контроля) выживших клеток популяции *E. faecium*, выросшей при гетерофазном культивировании с внесением сорбентов и последующем хранении в течение 1 мес. в разных условиях доступа кислорода: с ограничением доступа кислорода (столбцы со сплошной заливкой) и с доступом кислорода (столбцы со штриховкой).

Таблица 5. Повышение количества жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий *E. faecium*, выращенных на молоке, после 1 мес. хранения, при использовании разных подходов, относительно контроля, крат

Гуматы	Сорбенты, гели	Иммобилизация в СГГ	Гетерофазное выращивание с гелями
2–3	1.25–3	35	1.25–4

(рис. 8); отсутствием экспериментально определяемого метаболизма (фиксируемого по отсутствию выделения CO_2).

Количество сохранивших жизнеспособность клеток. Было показано, что количество сохранивших жизнеспособность клеток зависело от среды роста бактерий (табл. 6). Титр выживших клеток был выше в культурах, выращенных в среде LB (до 13%), чем в молоке (не более 3.6%), в неразбавленном молоке было минимальное количество ПФ (не более 0.3%), что коррелирует с содержанием доступных питательных веществ, сахаров и аминокислот, в этих субстратах. Во всех длительно хранившихся культурах интенсивность выделения CO_2 была до 80 раз ниже, чем в контрольной культуре. Если бы все выжившие клетки *E. faecium* были представлены аметаболическими ЦПК, то выделения CO_2 не наблюдали бы. Следовательно, какая-то часть выживающих клеток метаболически активна, что подтверждено электронно-микроскопическими исследованиями – по наличию ультраструктурных особенностей, свойственных активным клеткам. Зависимость количества выживающих клеток от количества питательных веществ свидетельствует о нахождении выживающих клеток (или их части) в метаболически активном состоянии.

Количество образовавшихся форм покоя не зависело от условий хранения бактериальных культур – с или без доступа кислорода.

Доля терморезистентных клеток в хранящихся суспензиях была на порядок выше, чем в культуре вегетативных клеток (1–2 и 0.04% соответственно; табл. 6). Высокая терморезистентность свидетельствует о наличии покоящихся форм типа ЦПК.

Ультраструктурная организация длительно выживающих клеток *E. faecium*, выросших в молоке или на среде LB и хранившихся в неростовых условиях в течение 6 мес., отличалась от ультраструктурной организации вегетативных клеток и имела ярко выраженный полиморфизм. При этом полиморфизм выживающих клеток не зависел от среды роста хранившихся популяций – молоко или LB. По этой причине на рис. 8 приведены фото клеток, выращенных на молоке (рис. 8а, 8б) и хранившихся 6 мес. (рис. 8в–8ж) (для клеток, выращенных на среде LB, данные аналогичны и не представлены).

Стационарная культура состояла из однотипных клеток размером 1–1.5 мкм, электронно-плотных, часть из которых не завершила деление, окруженных тонкой экзополисахаридной капсулой; зона нуклеоида визуализируется слабо. В 6-мес. популяциях преобладали лизированные клетки (“чехлы”) (рис. 8в), среди оставшихся интактными клеток были клетки типа ЦПК двух типов (рис. 8д, 8е), клетки, аналогичные клеткам стационарной фазы (рис. 8г), а также L-формы (рис. 8ж). Численность лизированных клеток составляла 70–90%, численность покоящихся форм типа ЦПК – около 15% и L-форм – 1–3%.

Выживающие формы типа ЦПК были представлены клетками двух типов, различающихся структурой клеточной стенки: I тип – утолщенной в 1.5 раза относительно стенки вегетативных клеток (60–70 нм) (рис. 8г, 8д) или II тип – существенно более толстой (140 нм) и многослойной (рис. 8е), с более плотной цитоплазмой. Аналогичные покоящиеся формы типа ЦПК были описаны ранее (Мулюкин и соавт., 2009; Соляникова и соавт.,

Таблица 6. Количество и характеристики покоящихся форм *E. faecium*, выращенных на молоке или среде LB и хранившихся 6 мес. в различных условиях

Вариант	Показатели		
	КОЕ, % (от 100% КОЕ в стационарной фазе)	Терморезистентность, % (от 100% КОЕ до прогрева)	Выделение CO_2 , %/ч
Среда LB			
Стационарная фаза, 1 сут	100	0.04	0.025 ± 0.005
Колба	2–3	1.33	0.0006 ± 0.005
Пробирка Хангейта с доступом O_2	13	1.71	0.0023 ± 0.005
Пробирка Хангейта без O_2	2–5	2.2	0.0007 ± 0.005
Молоко			
Колба	3.6	1.0	0.0003 ± 0.005
Пробирка Хангейта с O_2	3.4	0.8	0.0025 ± 0.005
Пробирка Хангейта без O_2	3.28	1.2	0.0013 ± 0.005
Молоко, разбавленное в 10 раз			
Колба хранение	0.13	0.75	0.0008 ± 0.005
Пробирка Хангейта с O_2	0.2	1.0	0.0008 ± 0.005
Пробирка Хангейта без O_2	0.32	0.8	0.0009 ± 0.005

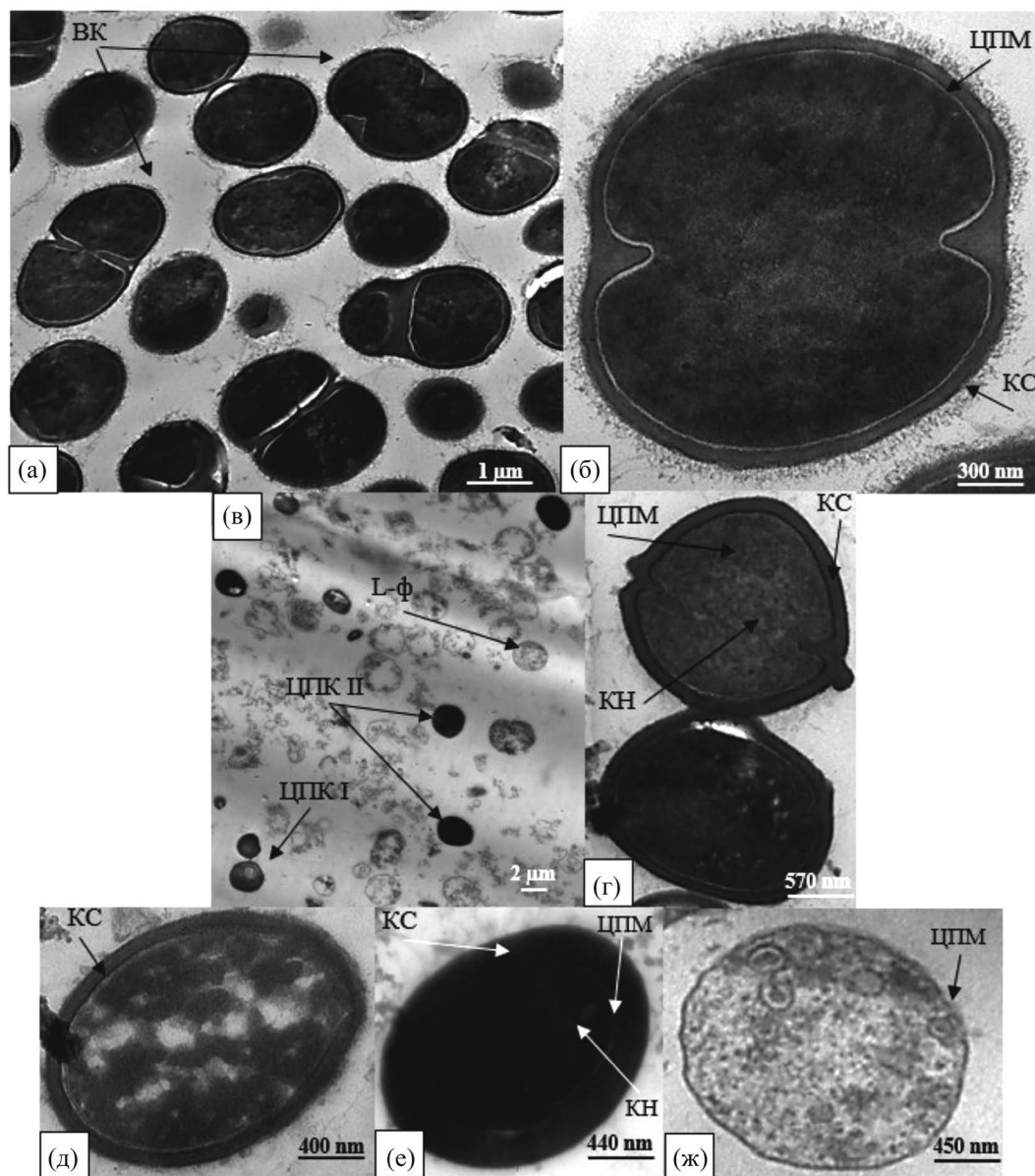


Рис. 8. Электронно-микроскопические снимки тонких срезов клеток *E. faecium*, выращенных на молоке до стационарной фазы роста (а, б) и хранившихся 6 мес. в статическом режиме (в–ж). Обозначения: ВК – ультраструктура вегетативных клеток (а, б); ЦПК I типа с утолщенной клеточной стенкой (КС); ЦПК II типа с толстой многослойной КС и плотной цитоплазмой, компактизованным нуклеоидом (КН); L-ф – L-форма клеток без КС (в); ЦПМ – цитоплазматическая мембрана (б, г, ж).

2017). У родственного микроорганизма, *E. durans*, были обнаружены только ЦПК I типа и L-формы (Эль-Регистан и соавт., 2023).

Таким образом, по сумме признаков длительно выживающие в неростовых условиях клетки *E. faecium* могут быть отнесены к покоящимся формам микроорганизмов. Длительное выживание L-форм молочнокислых бактерий показано впервые в нашей предыдущей публикации (Эль-Регистан и соавт., 2023).

Диссоциативная фенотипическая изменчивость *E. faecium*

Важным признаком ЦПК, отличающим их от других типов ПФ (эндо- и экзоспор, акинет и др.), является изменение (расширение) диссоциативного спектра популяций, вырастающих из ЦПК в новом цикле развития, что было многократно отмечено ранее (Ivshina et al., 2015; Соляникова и соавт., 2017). Эта особенность ЦПК

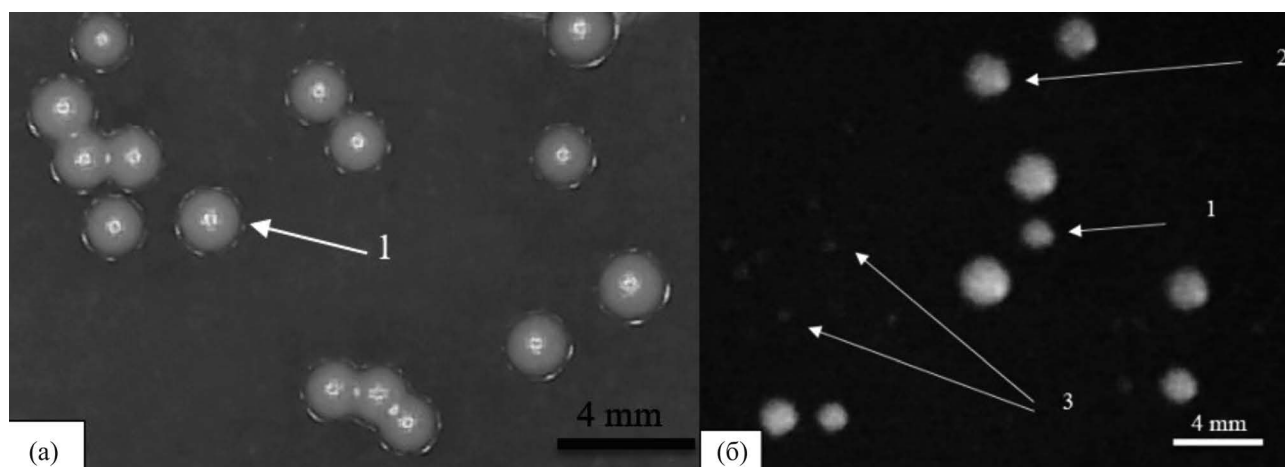


Рис. 9. Колонии диссоциантов *E. faecium* в популяции, полученной из клеток, выращенных в обезжиренном молоке в течение 24 ч (а) и хранившихся в течение 6 месяцев (б). 1 – Колонии доминантного S-морфотипа с размерами до 2 мм; 2 – колонии Sb-морфотипа с размерами 2–3 мм; 3 – колонии S_m-морфотипа с размерами менее 1 мм, полупрозрачные. Световая микроскопия.

E. faecium была проверена, результаты представлены на рис. 9.

При расसेве на плотные среды аликвот планктонных культур *E. faecium*, выросших в молоке до стационарной фазы, они выросли популяцией клеток доминантного S-типа (98%) (рис. 9а). На агаризованной среде их колонии имели круглую форму; диаметр 1.5–2 мм, поверхность гладкая, края ровные, цвет белесо-серый, края непрозрачные с выпуклой сердцевинкой. При рассеве на агаризованной среде популяции, хранившейся в течение 6 мес., ее диссоциативный спектр резко менялся (рис. 9б): колонии S-морфотипа составляли не более 15%. 60–70% выросшей популяции было представлено колониями S_m-типа, характеризующихся диаметром 0.3–0.5 мм, с гладкой поверхностью, ровными краями, плотной консистенции, полупрозрачными, с выпуклым профилем, блестящими, серого цвета (рис. 9б). Около 25% колоний были представлены самыми крупными колониями Sb-типа (похожих на колонии S-типа, но диаметром 2–3 мм). Очевидно, что максимальной скоростью роста характеризовался морфотип Sb-типа, а минимальной – S_m-типа.

Таким образом, естественными способами длительного выживания МКБ в разных условиях являются:

- образование покоящихся цистоподобных клеток, что доказано приведенными выше результатами исследований;

- нахождение в состоянии биопленок, что пока не является строго доказанным и составит предмет наших дальнейших исследований, но хорошо согласуется с мнением других авторов (Zur et al., 2016);

– нахождение в состоянии гипометаболизма, отличном от состояния покоя и от состояния активного метаболизма растущих клеток. Это состояние мало исследовано и также составит предмет нашего изучения.

Кроме того, экзогенное добавление веществ с антиоксидантным действием (гуматов) или дающих бактериям возможность окислительного метаболизма и, одновременно, антиоксидантной защиты (гема), также существенно (в разы) повышает выживаемость МКБ при хранении.

Наибольший практический интерес представляет обнаруженный способ хранения МКБ при их иммобилизации в силанольно-гуматные гели, дающий максимальный эффект.

Изучению свойств и морфотипов клеток МКБ, длительно выживающих в силанольно-гуминовых гелях, будут посвящены наши следующие исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта РФ № 24-24-20062 и, частично, госзадания Минобрнауки РФ для ФИЦ Биотехнологии РАН (зарплата Т.А. Канапацкого и Г.И. Эль-Регистан).

БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН “Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов

различных физиологических групп биотехнологического назначения UNIQEM”.

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

- Брюханов А.Л., Климко А.И., Нетрусов А.И. Антиоксидантные свойства молочнокислых бактерий // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 519–536.
- Bryukhanov A. L., Klimko A. I., Netrusov A. I. Antioxidant properties of lactic acid bacteria // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 463–478.
- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
- Голод Н.А., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Нейматов А.Л., Воробьева Л.И., Сузина Н.Е., Шаненко Е.Ф., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 317–327.
- Golod N.A., Loiko N.G., Mulyukin A.L., Gal'chenko V.F., El-Registan G.I., Neiyamatov A.L., Vorobjeva L.I., Suzina N.E., Shanenko E.F. Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 280–289.
- Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. Под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. 499 с.
- Лойко Н.Г., Краснова М.А., Пичугина Т.В., Гриневич А.И., Ганина В.И., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Изменение диссоциативного спектра популяций молочнокислых бактерий при воздействии антибиотиков // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 284–294.
- Loiko N.G., Krasnova M.A., Pichugina T.V., Grinevich A.I., Ganina V.I., Kozlova A.N., Nikolaev Yu.A., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Changes in the phase variant spectra in the populations of lactic acid bacteria under antibiotic treatment // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 195–204.
- Маркелов Д.А., Ницак В.Н., Геращенко И.И. Сравнительное изучение адсорбционной активности медицинских сорбентов // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 7. С. 30–33.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 15–27.
- Mulyukin A.L., Suzina N.E., Mel'nikov V.G., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 149–159.
- 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. № 1. С. 42–52.
- Mulyukin A.L., Pogorelova A.Yu., El-Registan G.I., Suzina N.E., Duda V.I., Antonyuk L.P. Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 33–41.
- Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Канапатский Т.А., Перминова И.В., Хрептугова А.Н., Григорьева Н.В., Близнац И.В., Манучарова Н.А., Сорокин В.В., Коваленко М.А., Эль-Регистан Г.И. Новые биоконкомпозитные материалы, включающие углеводородокисляющие микроорганизмы, и их потенциал для деградации нефтепродуктов // Микробиология. 2021. Т. 90. № 6. С. 692–705.
- Nikolaev Yu.A., Borzenkov I.A., Demkina E.V., Loiko N.G., Kanapatskii T.A., Perminova I.V., Khreptugova A.N., Grigor'eva N.V., Bliznets I.V., Manucharova N.A., Sorokin V.V., Kovalenko M.A., El'-Registan G.I. New biocomposite materials based on hydrocarbon-oxidizing microorganisms and their potential for oil products degradation // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 731–742.
- Николаев Ю.А., Демкина Е.В., Перминова И.В., Лойко Н.Г., Борзенков И.А., Иванова А.Е., Константинов А.И., Эль-Регистан Г.И. Роль гуминовых веществ в пролонгировании жизнеспособности клеток углеводородокисляющих бактерий // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 725–729.
- Nikolaev Y.A., Demkina E.V., Loiko N.G., Borzenkov I.A., Ivanova A.E., El'-Registan G.I., Perminova I.V., Konstantinov A.I. Role of humic compounds in viability prolongation of the cells of hydrocarbon-oxidizing bacteria // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 764–768.
- Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Атрошчик Е.А., Константинов А.И., Перминова И.В., Эль-Регистан Г.И. Функциональная активность гуминовых веществ в пролонгировании выживания популяции углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter junii* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 74–87.
- Nikolaev Y.A., Loiko N.G., Demkina E.V., El'-Registan G.I., Konstantinov A.I., Perminova I.V., Atroshchik E.A. Functional activity of humic substances in survival prolongation of populations

- of hydrocarbon-oxidizing bacteria *Acinetobacter junii* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 74–85.
- Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 489–496.
- Nikolaev Yu. A., Mulyukin A. L., Stepanenko I. Yu., El'-Registan G. I. Autoregulation of stress response in microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 420–426.
- Олескин А.В., Шендеров Б.А., Роговский В.С. Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Изд-во МГУ, 2020. 286 с.
- Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. Нетрусова А.И. М.: Издательский центр “Академия”, 2005. 608 с.
- Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Егозарьян Н.С., Полищева 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. № 4. 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. 476–486.
- Эль-Регистан Г.И., Земскова О.В., Галуза О.А., Уланова Р.В., Ильичева Е.А., Ганнесен А.В., Николаев Ю.А. Влияние гормонов и биогенных аминов на рост и выживание *Enterococcus durans* // Микробиология. 2023. Т. 92. № 4. С. 376–395.
- El'-Registan G. I., Zemskova O. V., Galuza O. A., Ulanova R. V., Il'icheva E. A., Gannesen A. V., Nikolaev Yu. A. Effect of hormones and biogenic amines on growth and survival of *Enterococcus durans* // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 517–533.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 446–456.
- El-Registan G. I., Mulyukin A. L., Nikolaev Yu. A., Suzina N. E., Gal'chenko V. F., Duda V. I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380–389.
- Azzaz H. H., Kholif A. E., Murad H. A., Vargas-Bello-Pérez E. A. Newly developed strain of *Enterococcus faecium* isolated from fresh dairy products to be used as a probiotic in lactating Holstein cows // Front. Vet. Sci. 2022. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.989606>
- Balaban N., Merrin I., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch // Science. 2004. V. 305. P. 1622–1625.
- Balaban N. Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D. I., Brynildsen M. P., Buemann D., Camilli A., Collins J. J. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 441–448.
- Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen // FEMS Microbiol. Lett. 1987. V. 46. P. 269–280.
- Fleischmann S., Robben C., Alter T., Rossmann P., Mester P. How to evaluate non-growing cells – current strategies for determining antimicrobial resistance of VBNC // Bacteria. Antibiotics. 2021. V. 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics/10020115>
- Gaudu P., Vido K., Cesselin B., Kulakauskas S., Tremblay J., Rezaiki L., Lamberet G., Sourice S., Duwat P., Gruss A. Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis* // Antonie van Leeuwenhoek. 2002. V. 82. P. 263–269.
- 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.
- Kozubek A., Zarnowski R., Stasiuk M., Gubernator J. Natural amphiphilic phenols as bioactive compounds // Cell. Mol. Biol. Lett. 2001. V. 6. P. 351–355.
- Lyte M. Microbial endocrinology and nutrition: a perspective on new mechanisms by which diet can influence gut-to brain-communication // PharmaNutrition. 2013. V. 1. P. 35–39.
- Maresca D., Zotta T., Mauriello G. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 157. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00157>
- Mgomi F. C., Yang Y. R., Cheng G., Yang Z. Q. Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms // Biofilm. 2023. V. 5. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100118>
- Nikolaev Y., Borzenkov I., Demkina E., Loiko N., Kanapatsky T., Perminova I., Volikov A., Khreptugova A., Bliznet I., Grigoreva N., El-Registan G. Immobilization of cells of hydrocarbon-oxidizing bacteria for petroleum bioremediation using new materials // Int. J. Environ. Res. 2021. V. 15. P. 971–984.
- Nikolaev Y. A., Demkina E. V., Borzenkov I. A., Ivanova A. E., Kanapatsky T. A., Konstantinov A. I., Volikov A. B., Perminova I. V., El-Registan G. I. Role of the structure of humic substances in increasing bacterial survival // J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 5. № 4. <https://doi.org/10.23880/OAJMB-16000174>
- Oleskin A. V., Shenderov B. A. Microbial communication and microbiota-host interactivity. neurophysiological, biotechnological, and biopolitical implications // Nova Science Publishers. 2020. <https://doi.org/10.52305/EGCB8622>
- Oleskin A. V., Zhilenkova O. G., Shenderov B. A., Amerhanova A. M., Kudrin V. S., Klodt P. M. Lactic-acid bacteria supplement fermented dairy products

- with human behavior-modifying neuroactive compounds // J. Pharm. Nutr. Sci. 2014. V. 4. P. 199–206.
- Pious T., Aparna S., Reshmi U., Mubashar M., Sadiq P. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast CFU enumeration and single colony isolation from diverse samples // Biotechnol. Rep. (Amst.). 2015. V. 8. P. 45–55.
- Radosavljević M., Lević S., Pejin J., Mojović L., Nedović V. Encapsulation technology of lactic acid bacteria in food fermentation // Lactic acid bacteria in food biotechnology: innovations and functional aspects / Eds. Ray R.C., Paramithiotis S., de Carvalho Azevedo V.A., Montet D. Amsterdam: Elsevier, 2022. V. 17. P. 319–347.
- Salminen S., Wright V., Ouwehand A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects // Brazil. J. Pharm. Sci. 2004. V. 42. P. 473–474.
- Sampietro D., Belizán M.E. M., Apud G.R., Juárez J.H., Vattuone M., Catalan C. Alkylresorcinols: chemical properties, methods of analysis and potential uses in food, industry and plant protection // Natural antioxidants and biocides from wild medicinal plants / Eds. Cespedes C.L. CAB International, 2013. P. 148–166.
- Spores VII: Papers Presented at the Seventh International Spore Conference Madison, Wisconsin, 5–8 October 1977 / Eds. Chambliss G., Vary J.C. Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1978. 354 p.
- Volikov A., Ponomarenko S., Gutsche A., Nirschl H., Hatfield K., Perminova I. Targeted design of waterbased humic substances-silsesquioxane soft materials for nature-inspired remedial // RSC Adv. 2016. V. 6. P. 48222–48230.
- Wainwright J., Hobbs G., Nakouti I. Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies // Arch. Microbiol. 2021. V. 203. P. 5899–5906.
- Zur J., Wojcieszynska D., Guzik U. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization // Molecules. 2016. V. 21. P. 958–973.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Long-Term Survival of *Enterococcus faecium* under Different Conditions of Cell Stabilization and Immobilization

O. A. Galuza^{1,2,*}, G. I. El-Registan¹, T. A. Kanapatski¹, Yu. A. Nikolaev¹

¹Institute of Microbiology named after S.N. Vinogradsky, Federal Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071, Russia

²Bavar+ JSC, Moscow, 127206, Russia

*e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Abstract. Lactic acid bacteria (LAB) play an important role in biotechnology and biomedicine. Their most important disadvantage is the rapid death of crops and preparations during storage. Studying ways to increase the survival time of lactic acid bacteria under various conditions is an urgent scientific and applied task and was the goal of this work. The object was the lactic acid bacterium *Enterococcus faecium*. It has been shown that in aging planktonic cultures, bacteria quickly lose viability (the number of viable cells decreases by 2–4 orders of magnitude in 1 month). The development cycle of the *E. faecium* population under these conditions ends with the formation of cyst-like resting cells of two types: L-forms and hypometabolic cells. The use of chemical stabilizers, humic substances (typical soil components), and increases the number of surviving cells by 2–3 times. With surface immobilization (adsorption) on organosilanol or inorganic carriers (organosilane, silica), the number of cells surviving under starvation conditions increases by 1.25–3 times. The most effective approach was the immobilization of cells in silanol-humate gels (increasing the number of surviving cells up to 35 times relative to the control). The data obtained reveal the mechanisms and forms of survival of LAB in natural conditions (state of hypometabolism, the presence of specialized forms of dormancy), and can also be used to develop methods for long-term storage of LAB in their biological products.

Keywords: lactic acid bacteria, *Enterococcus faecium*, survival forms, bacterial immobilization, bacterial viability, biological products

УДК 579.674

ДРОЖЖЕВАЯ МИКРОФЛОРА МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, РЕАЛИЗУЕМЫХ В РОССИИ

© 2024 г. А. Ю. Туаева^а, А. М. Пономарева^{а, б}, В. А. Лившиц^а, Е. С. Наумова^{а, *}

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182, Россия

^бРоссийский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, 125047, Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 23.03.2024 г.

После доработки 25.04.2024 г.

Принята к публикации 29.04.2024 г.

С помощью рестрикционного анализа 5.8S-ITS-фрагмента рДНК и секвенирования домена D1/D2 26S рДНК изучена дрожжевая микрофлора различных молочных продуктов, реализуемых в России. В большинстве изученных кисломолочных продуктов доминировали утилизирующие лактозу дрожжи *Kluyveromyces* и *Debaryomyces*, а также Лас⁺ дрожжи *Saccharomyces*, *Monosporozyma*, *Pichia*, *Geotrichum* и *Yarrowia*. Дрожжи *Kluyveromyces marxianus* присутствовали в большинстве изученных кисломолочных продуктов, тогда как родственный вид *K. lactis* обнаружен только в некоторых образцах айрана, творога и сыра. Доминирование *K. marxianus*, по-видимому, связано с их физиологическими особенностями (термо- и осмоотолерантность), которые обеспечивают этим дрожжам лучшую приспособляемость к промышленным условиям ферментации. Доминирующие в напитках смешанного брожения виды *Saccharomyces cerevisiae* и *Monosporozyma unispora* полностью отсутствовали в сырах и продуктах молочнокислого брожения. В целом, видовой состав дрожжей в значительной степени зависел от кисломолочного продукта, вида молока и конкретного производителя.

Ключевые слова: дрожжевая микрофлора молочных продуктов России, доминирующие виды *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Monosporozyma unispora*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans*

DOI: 10.31857/S0026365624050106

Молоко и молочные продукты являются важной составной частью рациона человека с древних времен. Согласно археологическим данным и протеомному анализу остатков молочного жира и белка на древних керамических сосудах, а также зубного камня человеческих останков, потребление животного молока началось в Анатолии (регион современной Турции) в седьмом тысячелетии до нашей эры, а позднее распространилось по Европе, евразийским степям и Северной Африке (Charlton et al., 2019; Wilkin, 2022).

Помимо молока и разных типов сыров, молочная промышленность России производит разнообразные кисломолочные продукты. Состав конечного кисломолочного продукта, а также его органолептические характеристики, во многом зависят от вида молока, которое использовалось для его изготовления. В настоящее время основным сырьем для промышленного производства молочных продуктов является коровье молоко. Молоко других млекопитающих в основном используется для производства национальных кисломолочных продуктов

(тан, айран, кумыс, мацони, катык, курут, шубат и другие), которые производятся также из козьего, кобыльего, верблюжьего, овечьего и молока буйволицы. Национальные кисломолочные продукты не так давно стали частью ассортимента молочных продуктов, доступных российским потребителям.

Кроме вида молока на конечный состав и органолептические показатели кисломолочного продукта значительно влияет используемая закваска, условия и продолжительность ферментации. В зависимости от используемой закваски кисломолочные продукты подразделяются на две основные группы: продукты молочнокислого брожения (йогурт, ацидофилин, простокваша, творог, варенец, ряженка, мацони, сметана и др.) и продукты смешанного — молочно-кислого и спиртового брожения (кефир, кумыс, айран, тан, шубат и др.). Наряду с молочнокислыми бактериями основными компонентами микробиоты различных кисломолочных продуктов являются дрожжи, которые в процессе своей жизнедеятельности обогащают их витаминами, органическими кислотами и другими биологически активными

веществами. Особую роль в молочной промышленности играют лактозосбраживающие дрожжи, которые образуют спирт и углекислоту, улучшают органолептические свойства готового продукта и подавляют развитие вызывающих порчу микроорганизмов (Скородумова, 1969; Fröhlich-Wyder, 2003; Козырева и соавт., 2009; Fröhlich-Wyder et al., 2019).

Дрожжевая микрофлора различных кисломолочных продуктов (кефира, простокваши, кумыса и катыка) изучалась микробиологами Санкт-Петербурга еще в Российской Империи (Николаева, 1907; Бачинская-Райченко, 1911; Бачинская, 1913; Бачинская, Юницкая, 1916). Исследование дрожжей традиционных и национальных кисломолочных продуктов активно продолжилось в СССР (Богданов, 1930; Старыгина и соавт., 1934; Войткевич и соавт., 1936; Саруханян и соавт., 1936; Скородумова, 1969). В.И. Кудрявцев выделил около 40 штаммов лактозосбраживающих дрожжей из айрана, варенца, мацуна, ряженки и других кисломолочных продуктов в разных регионах СССР (Кудрявцев, 1954).

В последние годы в мире растет популярность использования функциональных продуктов питания, оказывающих благоприятное влияние на здоровье человека. Безусловными лидерами среди них являются кисломолочные продукты, в основном смешанного брожения (Kazou et al., 2021). Наиболее распространенным кисломолочным продуктом смешанного брожения является кефир, для приготовления которого используется кефирная закваска (кефирные зерна или кефирный гриб), представляющая собой устойчивое микробное сообщество молочнокислых и уксуснокислых бактерий, а также различных видов дрожжей (Nejati et al., 2020; Дин и соавт., 2022; González-Orozco et al., 2022). Такой разнообразный состав микробиоты кефира способствует высокой функциональной ценности продукта и комплексному пробиотическому воздействию на организм человека (Farnworth, 2005). Потребление кефира во всем мире значительно выросло, что связано не только с его уникальными вкусовыми качествами, но также с большим содержанием биологически активных соединений, таких как пептиды и витамины (Farnworth, 2005; Azizi et al., 2021). Кефир является одним из самых любимых функциональных молочных продуктов. Считается, что он возник в горах Северного Кавказа, Тибета и Монголии, и на протяжении веков его производили кустарно, а в настоящее время кефир производится промышленно в различных странах мира, включая Россию (Farnworth, 2005; Wszolek et al., 2006; González-Orozco et al., 2022).

Традиционным кисломолочным напитком смешанного брожения также является кумыс, изготавливаемый из кобыльего молока и закваски, в которую входят молочнокислые, уксуснокислые бактерии и дрожжи (Холдина и соавт., 2021). Благодаря содержанию большого количества витаминов,

минеральных элементов и полиненасыщенных жирных кислот кумыс обладает лечебными свойствами и применяется в традиционной медицине (Jastrzębska et al., 2017). Родиной кумыса является Центральная Азия, он производится в Китае, Монголии, Казахстане, Киргизии и в ряде регионов России (Бурятия, Калмыкия, Башкирия, Татарстан) (Холдина и соавт., 2021). Показано, что бактериальный и дрожжевой состав кумыса зависит от региона изготовления (Guo et al., 2019). Недавно были проведены исследования бактериальной микрофлоры различных аутентичных кисломолочных продуктов России (Kochetkova et al., 2022). Однако дрожжевая микрофлора при этом не изучалась.

Целью настоящего исследования является изучение дрожжевой микрофлоры разных молочных продуктов, реализуемых сегодня в России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологические методы. Молочные продукты, из которых проводилось выделение дрожжей, и место их изготовления представлены в табл. 1. Продукты покупали в супермаркетах, на рынке и в специализированных магазинах в Москве и Московской области в 2022 (сентябрь–ноябрь) и 2023 (февраль–март) годах. Стерильным инструментом отбирали пробу молочного продукта и помещали ее в колбу с жидкой средой УР (г/л): глюкоза (“РеаХим”, Россия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”, США) – 10; пептон – 20 (“Difco”). Выращивали при температуре 28°C в течение 2 сут.

После культивирования биомассу рассевали истощающимся штрихом на агаризованную YPD-среду с добавлением антибиотика хлорамфеникола и субстрата X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид). Антибиотик добавляли в виде 3% спиртового раствора в количестве 0.5 мл на 100 мл среды. Состав агаризованной YPD-среды такой же как УР-среды, но с добавлением 2%-ного бакто-агара (“Difco”, США). Среду разливали в количестве 30 мл на одну чашку Петри. После застывания среды на чашку добавляли 200 мкл раствора X-gal с концентрацией 7 мг/мл в ДМФА (диметилформамид) и растирали стерильным шпателем до полного впитывания. Культивировали 2 сут при температуре 28°C. Отбор штаммов дрожжей проводили по морфологии колоний и клеток.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). ДНК выделяли согласно протоколу, разработанному Lboke et al. (2011). Амплификацию 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2, проводили при помощи следующей пары праймеров: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3') (White et al., 1990). Для амплификации домена D1/D2 26S рДНК использовали праймеры NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3'), NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ $MgCl_2$, 0.05 мМ каждого дНТФ, 30 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы ("Helicon", Россия), 20–200 нг ДНК. Режим проведения ПЦР: начальная денатурация при 94°C – 5 мин; затем 35 циклов по следующей схеме: денатурация при 94°C – 45 с, отжиг праймеров при 52°C – 30 с, элонгация при 72°C – 120 с; конечная элонгация при 72°C – 10 мин. Продукты амплификации электрофоретически разделяли в 1% агарозном геле при 50–55 В в 0.5× TBE буфере (45 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота; pH 8.0) в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 1 kb DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) амплифицированных ITS-фрагментов проводили с помощью эндонуклеаз рестрикции *Hae*III, *Hind*III, *Hin*I, *Bsr*DI ("Fermentas", Литва). В качестве контроля использовали видовые тестерные штаммы. Рестрикцию проводили при температуре 37°C в течение 12–16 ч. Разделение полученных фрагментов проводили в 1.5–2% агарозном геле при 50–55 В в 0.5× TBE буфере в течение 2.5–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, а затем промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). Размеры фрагментов определяли при помощи маркера молекулярных весов 100 bp DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

Секвенирование. Видовую принадлежность дрожжей определяли при помощи секвенирования домена D1/D2 26S рДНК. Нуклеотидные последовательности домена D1/D2 определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе "Applied Biosystems 3730" (США). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank. Полученные в данной работе нуклеотидные последовательности заложены в GenBank под регистрационными номерами: PP690503–PP690508, PP691122–PP691129 и PP692094–PP692103.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дрожжи выделяли из молочных продуктов, произведенных из различных видов молока (коровьего, козьего, кобыльего, овечьего) в разных

регионах России, в Белоруссии, Киргизии и Турции (таблица).

Всего было изучено 86 молочных продуктов и 4 закваски; 60 продуктов и все закваски произведены в России. Дрожжевую микрофлору не удалось выделить из 28 продуктов молочнокислого брожения, для изготовления которых традиционно используется бактериальная закваска: варенец, каймак, катык, йогурт, курут, масло сливочное и кисломолочное, простокваша, ряженка, творог, сметана, мацони. Однако из 12 продуктов молочнокислого брожения дрожжи были выделены (таблица). В некоторых кисломолочных продуктах смешанного брожения дрожжи не были обнаружены: в трех образцах кефира (Минск, Белоруссия и г. Коломна, Московская обл.), а также в одной закваске для кефира и одной для айрана (Челябинская область).

Принимая во внимание, что усваивающие и не усваивающие лактозу дрожжи не различаются по морфологии колоний, сначала мы подбирали селективную среду для их четкой дифференциации. Для этого были использованы две питательные селективные среды: минимальная среда с лактозой и YPD-среда с добавлением субстрата X-gal, который расщепляется ферментом β-галактозидазой с образованием 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-индиго, окрашивающего колонии дрожжей в синий или голубой цвет. Более четкие результаты были получены при использовании селективной среды с X-gal, поэтому в дальнейшем именно на ней проводили отбор штаммов (рис. 1).

Видовая идентификация дрожжей. Первичную идентификацию дрожжей проводили по типу колоний, морфологии и размерам клеток. У некоторых штаммов также присутствовала мицелиальная форма. Всего из изученных молочных продуктов было выделено 193 штамма дрожжей, 55 из которых были способны утилизировать лактозу. Видовую принадлежность выделенных дрожжей определяли с помощью рестрикционного (ПДРФ) анализа ПЦР-амплифицированного 5.8-ITS-фрагмента рДНК, включающего внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 и ген 5.8S рРНК. Следует отметить, что ITS1/ITS2-участок является одним из основных молекулярных маркеров (баркодов) для видовой идентификации аскомицетных дрожжей, а в GenBank имеется обширная база дрожжевых ITS-последовательностей (Vu et al., 2016). Известно, что длина 5.8-ITS фрагмента одинакова у видов одного рода, тогда как его последовательность варьирует у разных видов (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Поэтому с помощью рестрикционного анализа ПЦР-амплифицированных 5.8-ITS фрагментов можно проводить видовую идентификацию штаммов дрожжей.

Лактозуусваивающие дрожжи разделились на три группы по размерам 5.8-ITS-фрагмента: 740, 650 и 425 п.н. (рисунок не приводится). Первые два

Таблица. Видовой состав дрожжевой микрофлоры различных молочных продуктов

Молочный продукт и место его изготовления		Видовой состав
Продукты смешанного брожения		
Коровье молоко		
Айран	Кабардино-Балкария, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Айран	Ростов-на-Дону, Россия	<i>Pichia fermentans</i>
Айран	Калужская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Айран фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i>
Айран турецкий	Московская обл., Россия	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Айран турецкий	Рязанская обл., Россия	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Айран турецкий	Московская обл., Россия	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Candida intermedia</i>
Аралаш	Киргизия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Бакай Курут	Киргизия	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Candida parapsilosis</i>
Кефир	Брест, Белоруссия	<i>Maudiozyma turicensis</i>
Кефир	Минск, Белоруссия	<i>Maudiozyma turicensis</i>
Кефир	Белгородская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Кефир	Владимирская обл., Россия	<i>Pichia fermentans</i>
Кефир	Воронеж, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Monosporozyma unispora</i>
Кефир	Воронежская обл., Россия	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida zeylanoides</i>
Кефир	Кабардино-Балкария, Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Кефир	Костромская обл., Россия	<i>Pichia fermentans</i>
Кефир	Краснодарский край, Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Кефир	Липецкая обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i>
Кефир	Пензенская обл., Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Monosporozyma unispora</i>
Кефир, обогащенный лактозой	Пенза, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
Кефир термостатный	Московская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Кефир термостатный	Марий Эл, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Кефир	Калининградская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i>
Кефир фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Pichia cactophila</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Кефирная закваска	Москва, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Курунга	Улан-Удэ, Бурятия, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Тан	Киргизия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Candida boidinii</i>
Тан	Свердловская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
Тан домашний	Рязанская обл., Россия	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Чалап	Бишкек, Киргизия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Козье молоко		
Кефир	Адыгея, Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Кефир	Владимирская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i>
Кобылье молоко		
Кумыс	Тверская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i>
Кумыс татарский фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida tropicalis</i>

Окончание таблицы

Молочный продукт и место его изготовления		Видовой состав
Кумыс	Башкортостан, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia deserticola</i>
Кумыс	Марий Эл, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia manshurica</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Кумысная закваска	Челябинская обл., Россия	<i>Monosporozyma unispora</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
Продукты молочнокислого брожения		
Коровье молоко		
Ацидофилин	Калужская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Мацони	Тверская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia cactophila</i>
Ряженка	Минск, Белоруссия	<i>Geotrichum candidum</i>
Ряженка	Нальчик, Кабардино-Балкария, Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Творог 4%	Тульская обл., Россия	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia fermentans</i>
Творог 9%	Пензенская обл., Россия	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Творог 9%	Борисов, Белоруссия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>
Творог 1%	Брест, Белоруссия	<i>Magnusiomyces suaveolens</i>
Творог 1%	Минск, Белоруссия	<i>Geotrichum galactomycetum</i> , <i>Pichia cactophila</i>
Козье молоко		
Йогурт 4.5%	Удмуртия, Россия	<i>Geotrichum galactomycetum</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia inconspicua</i>
Творог 2%	Белгородская обл., Россия	<i>Pichia fermentans</i>
Творог 4%	Марий Эл, Россия	<i>Pichia cactophila</i> , <i>Candida parapsilosis</i>
Сыры		
Сыр овечьё-козий рассольный	Турция	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>
Сыр рассольный	Турция	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Сыр фета рассольный	Воронежская обл., Россия	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i>
Сыр адыгейский	Адыгея, Россия	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Candida zeylanoides</i>
Сыр камамбер	Московская обл., Россия	<i>Geotrichum galactomycetum</i>
Сыр винный фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
Сыр качокавалло фермерский	Тульская обл., Россия	<i>Debaryomyces hansenii</i>

размера характерны, соответственно, для дрожжей рода *Kluyveromyces* и вида *Debaryomyces hansenii*. С помощью эндонуклеазы *Hind*III можно дифференцировать виды *Kluyveromyces marxianus* и *K. lactis*, тогда как дрожжи *Debaryomyces hansenii* имеют видоспецифичные *Hinf*I и *Hae*III паттерны (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Наумова и соавт., 2012).

На основании ПДРФ-анализа среди штаммов первой группы были идентифицированы два вида: *Kluyveromyces marxianus* (36 штаммов) и *K. lactis* (6 штаммов). Все 11 штаммов второй группы были отнесены к виду *Debaryomyces hansenii*. Видовая принадлежность указанных штаммов была

подтверждена с помощью секвенирования домена D1/D2 26S рДНК у 5–6 представителей каждой группы.

Два штамма, размер 5.8-ITS-фрагмента которых составил 425 п.н., были отнесены к виду *Candida intermedia* на основании секвенирования домена D1/D2 26S рДНК.

Неспособные утилизировать лактозу дрожжи значительно отличались по размерам 5.8-ITS-фрагментов (рис. 2).

Большую группу составили штаммы с характерным для дрожжей рода *Saccharomyces* размером ITS-фрагмента: 850 п.н. Все 25 штаммов имели

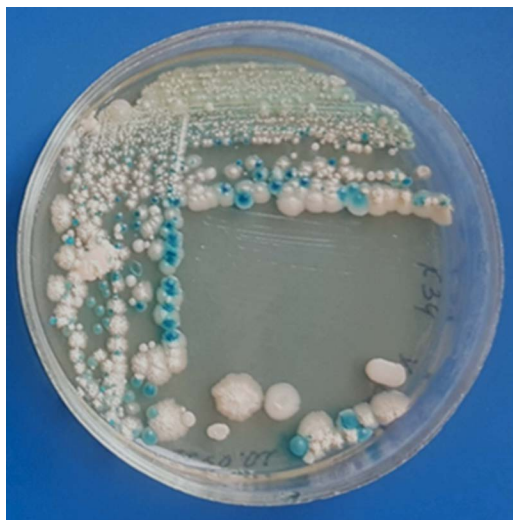


Рис. 1. Дифференциация усваивающих и не усваивающих лактозу дрожжей на селективной среде YPD с добавлением антибиотика хлорамфеникола и субстрата X-gal.

характерный для вида *S. cerevisiae* HaeIII-паттерн с четырьмя фрагментами размером 320, 230, 170 и 130 п.н. (Серпова и соавт., 2011). Секвенирование домена D1/D2 26S рДНК подтвердило их принадлежность к виду *S. cerevisiae*.

Многочисленную группу также составили штаммы с размером ITS-фрагмента около 775 п.н., что характерно для дрожжей *Monosporozyma unispora* (син. *Kazachstania unispora*). Двадцать четыре штамма имели HaeIII-паттерн, характерный для вида *M. unispora*, тогда как два штамма отличались по рестрикционному профилю. Секвенирование

домена D1/D2 26S рДНК показало, что последние два штамма относятся к виду *Maudiozyma turicensis* (син. *Kazachstania turicensis*).

На основании ПДРФ-анализа и последующего секвенирования домена D1/D2 26S рДНК среди выделенных дрожжей было идентифицировано семь видов рода *Pichia*: *P. cactophila*, *P. deserticola*, *P. fermentans*, *P. inconspicua*, *P. kudriavzevii*, *P. membranifaciens* и *P. manshurica*. Большинство штаммов (29) были отнесены к виду *P. fermentans*, тогда как остальные пять видов были представлены единичными изолятами.

Из различных молочных продуктов были также выделены диморфные дрожжи *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum* (син. *Galactomyces candidus*) и *Geotrichum galactomycetum* (син. *Galactomyces geotrichum*). Недавно систематика дрожжей рода *Galactomyces* была изменена с учетом нового международного кодекса номенклатуры водорослей, грибов и растений (Шэньчжэньский кодекс, Китай, 2017), на котором был принят принцип “один гриб – одно название” (Zhu et al., 2024). Принимая во внимание, что анаморфа *Geotrichum* была описана раньше телеоморфы *Galactomyces*, авторами было выбрано название рода *Geotrichum*. В этой же работе была проведена таксономическая ревизия рода *Magnusiomyces*, в который были перенесены дрожжи *Saprochaete suaveolens* под видовым названием *Magnusiomyces suaveolens* (Zhu et al., 2024).

Кроме того, среди выделенных нами дрожжей были идентифицированы единичные штаммы *Clavispora lusitaniae*, *Magnusiomyces suaveolens* и *Candida*: *C. zeylanoides*, *C. parapsilosis*, *C. boidinii*, *C. tropicalis*. Помимо аскомицетовых дрожжей, был идентифицирован один вид базидиомицетовых дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*.

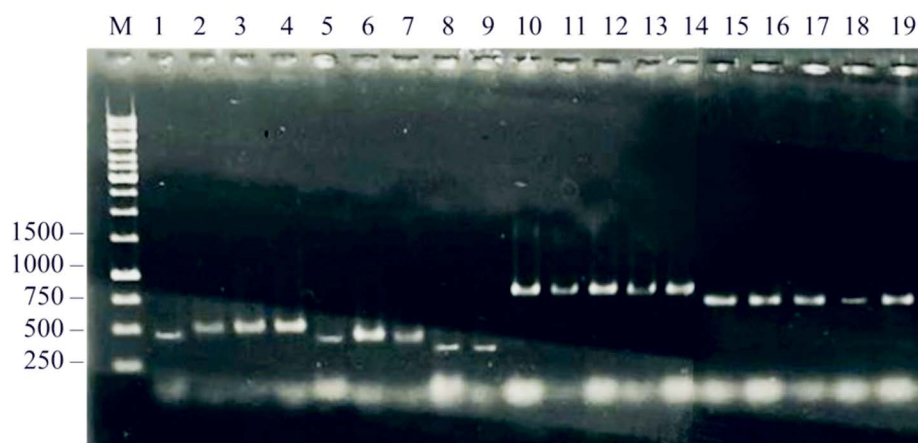


Рис. 2. Размер амплифицированных 5.8S-ITS-фрагментов рДНК штаммов дрожжей, не усваивающих лактозу: 1 – *P. manshurica*; 2 – *P. kudriavzevii*; 3, 4 – *Candida parapsilosis*; 5, 7 – *P. fermentans*; 6 – *Candida boidinii*; 8, 9 – *Yarrowia lipolytica*; 10–14 – *Saccharomyces cerevisiae*; 15–19 – *Monosporozyma unispora*. М – маркер молекулярных весов (п.н.) 1 kb DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Дрожжевая микрофлора молочных продуктов смешанного брожения. Дрожжи были обнаружены в 19 образцах кефира и в одной кефирной закваске (таблица). При этом видовой состав существенно различался у разных производителей.

Доминирующими видами в кефире из коровьего молока были *Monosporozyma unispora*, *Kluveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia fermentans*. Дрожжевая микрофлора образцов кефира, произведенных в Белоруссии, была представлена только одним видом *Maudiozyma turicensis*, который не был обнаружен ни в одном из изученных российских образцов. Кроме того, образец кефира, произведенный в Воронежской области, содержал *Geotrichum candidum*, *Candida zeylanoides* и *Candida parapsilosis*, а из фермерского кефира, произведенного в Тульской области, были выделены *Pichia cactophila* и *Pichia fermentans*. Микрофлора кефира из козьего молока была представлена дрожжами *Monosporozyma unispora* и *Debaryomyces hansenii*, которые также часто выделялись из образцов, произведенных из коровьего молока (таблица).

Дрожжевая микрофлора национального бурятского кисломолочного напитка курунга, который рассматривают как кумыс, приготовленный из коровьего молока, была представлена пятью видами, включая лактозосбраживающие дрожжи *Kluveromyces marxianus* и не усваивающие лактозу виды *Saccharomyces cerevisiae*, *Monosporozyma unispora*, *Pichia fermentans*, *Pichia membranifaciens*.

Дрожжи были обнаружены во всех изученных образцах айрана и тана. Однако их видовой состав различался. Наиболее часто в обоих кисломолочных продуктах встречались ферментирующие лактозу дрожжи *Kluveromyces marxianus*. Родственный вид *K. lactis* был выделен только из айрана турецкого, произведенного в Московской области (таблица). В двух образцах айрана (Московская и Рязанская обл.) и одном образце тана (Рязанская обл.) присутствовали дрожжи *Yarrowia lipolytica*, которые оказались единственными представителями дрожжевой микрофлоры в рязанских продуктах (таблица). В изготовленном в Московской области айране также обнаружены сбраживающие лактозу дрожжи *Candida intermedia*. Дрожжевая микрофлора киргизских национальных кисломолочных продуктов (аралаш и чалап) представлена дрожжами *Kluveromyces marxianus* и *Saccharomyces cerevisiae*. В кисломолочном продукте Бакай Курут (Киргизия) были обнаружены только базидиомитетные дрожжи *Rhodotorula mucilaginosa*. Обычно эти дрожжи выделяются из не полностью выдержанных кисломолочных продуктов и зачастую вызывают их порчу (Garnier et al., 2017).

Дрожжевой состав микрофлоры кумыса, национального напитка из кобыльего молока, различался в зависимости от места его производства (таблица). Наименьшим видовым разнообразием

характеризовались образцы из Центральной России (Тверская и Тульская обл.). В то же время дрожжевая микрофлора кумыса и кумысной закваски из более восточных регионов России (Башкортостан, Марий Эл, Челябинская обл.) отличалась большим разнообразием и была представлена дрожжами *Kluveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* и четырьмя видами рода *Pichia* — *P. fermentans*, *P. kudriavzevii*, *P. deserticola*, *P. manshurica*. Последние два вида были обнаружены нами только в образцах кумыса и отсутствовали в остальных кисломолочных продуктах.

Мы сравнили видовой состав дрожжей изученных кисломолочных продуктов смешанного брожения (рис. 3).

В кисломолочных напитках с высоким содержанием углекислого газа (кефир, кумыс и тан), независимо от использованного для их изготовления вида молока, преобладали дрожжи *Monosporozyma unispora*, *Kluveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia fermentans* (рис. 3). Несмотря на то, что в айране доминирующими видами также были *Kluveromyces marxianus* и *Pichia fermentans*, ни в одном из изученных образцов не были обнаружены дрожжи *Monosporozyma unispora*.

В то же время, присутствовали два вида лактозуусваивающих дрожжей (*K. lactis* и *Candida intermedia*), не обнаруженные в других кисломолочных напитках смешанного брожения (рис. 3). Следует отметить, что достаточно часто встречающийся в кефире вид усваивающих лактозу дрожжей *Debaryomyces hansenii* не был обнаружен ни в одном из изученных национальных напитков (тан, айран, кумыс, курунга и др.). Дрожжи *Yarrowia lipolytica* обнаружены только в танае и айране, преимущественно в образцах с более высокой жирностью (айран турецкий и тан домашний).

Дрожжевая микрофлора продуктов молочнокислого брожения. Дрожжи удалось выделить только из мацони (Тверская обл.), двух образцов ряженки, ацидофилина из Калужской области и одного образца йогурта, произведенного из цельного козьего молока в Удмуртии (таблица). Были идентифицированы следующие виды дрожжей: *Clavispora lusitanae*, *Kluveromyces marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum galactomycetum*, *Pichia cactophila* и *Pichia inconspicua*.

Дрожжи были обнаружены в семи образцах творога с разной массовой долей жира (от 1 до 9%) и изготовленных как из коровьего, так и из козьего молока (таблица). Обладающие высокой липолитической активностью дрожжи *Yarrowia lipolytica* присутствовали только в твороге с массовой долей жира 9%. В белорусском образце 9%-ной жирности также обнаружены лактозосбраживающие дрожжи *Kluveromyces marxianus*. Дрожжевая микрофлора изученных образцов творога с массовой долей жира от 1 до 4% представлена пятью видами: *Geotrichum*

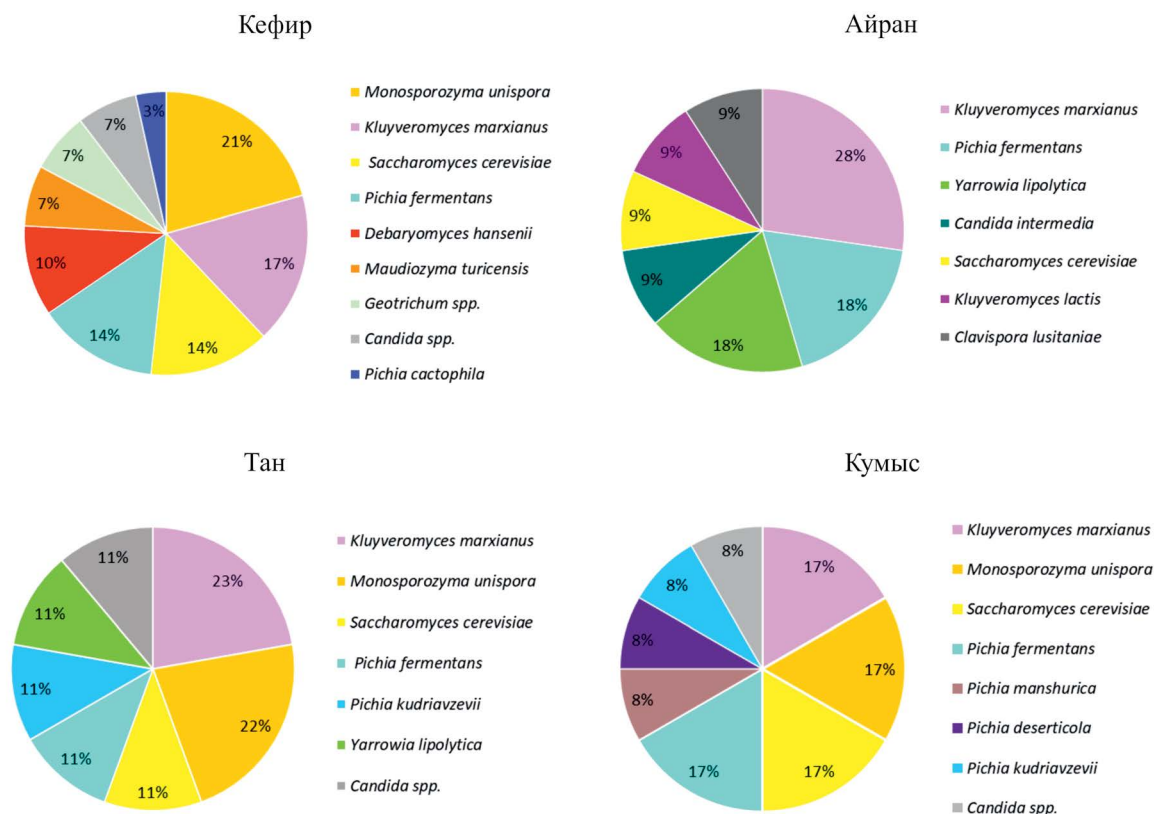


Рис. 3. Сравнительный анализ дрожжевой микрофлоры кисломолочных продуктов смешанного брожения.

galactomycetum, *Kluyveromyces lactis*, *Magnusiomyces suaveolens*, *Pichia fermentans* и *Pichia cactophila*. Наличие дрожжеподобных грибов рода *Geotrichum* в образцах творога, по-видимому, связано с достаточно высокой протеолитической и липолитической активностью этих дрожжей (Grygier et al., 2017).

Дрожжевая микрофлора сыра. Из 14 изученных образцов дрожжи удалось выделить только из мягких и рассольных сыров, а также из двух полутвердых фермерских сыров (таблица). В целом, микрофлора исследуемых сыров характеризуется преобладанием трех видов дрожжей: *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* и *Kluyveromyces lactis*. Следует отметить, что дрожжи *Debaryomyces hansenii* присутствовали только в фермерских сырах, тогда как в других образцах они отсутствовали. *Yarrowia lipolytica* была обнаружена только в двух рассольных турецких сырах с высоким содержанием жира (25.5 г/100 г), тогда как из рассольного сыра более низкой жирности (16 г/100 г) эти дрожжи не выделялись. Кроме того, турецкий рассольный сыр был изготовлен с добавлением овечьего молока, которое характеризуется более высоким содержанием жира по сравнению с молоком других млекопитающих (Malacarne et al., 2002; Оноприйко и соавт., 2011).

Сыр камамбер, из которого были выделены только дрожжи рода *Geotrichum*, также имеет высокое

содержание жира (23 г/100 г). Важное значение этих дрожжей при производстве сыра заключается в том, что в процессе протеолиза молочного белка казеина они способствуют снижению горечи за счет гидролиза горьких пептидов (Wyder et al., 1999). Дрожжи рода *Pichia* были обнаружены только в двух рассольных сырах (таблица), однако в разных видах сыра присутствовали различные виды этого рода: *P. fermentans* в фете, а *P. membranifaciens* в турецком рассольном сыре. Лактозоусваивающие дрожжи *Kluyveromyces lactis* удалось обнаружить в двух видах сыра, винном и адыгейском, тогда как родственный вид *K. marxianus* был выделен из рассольного сыра фета.

Как в сыре, так и в твороге обнаружены два вида *Kluyveromyces* (*K. lactis* и *K. marxianus*), дрожжи *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans* и *Geotrichum galactomycetum* (рис. 4).

В то же время, видовой состав дрожжевой микрофлоры этих продуктов существенно различался. Дрожжи *Pichia membranifaciens* присутствовали только в сыре, тогда как в твороге обнаружен другой вид этого рода — *P. cactophila* (рис. 4). В образцах творога также отсутствовали лактозоусваивающие дрожжи *Debaryomyces hansenii*. Эти дрожжи имеют большое значение для процесса созревания сыров, так как в процессе своей жизнедеятельности повышают

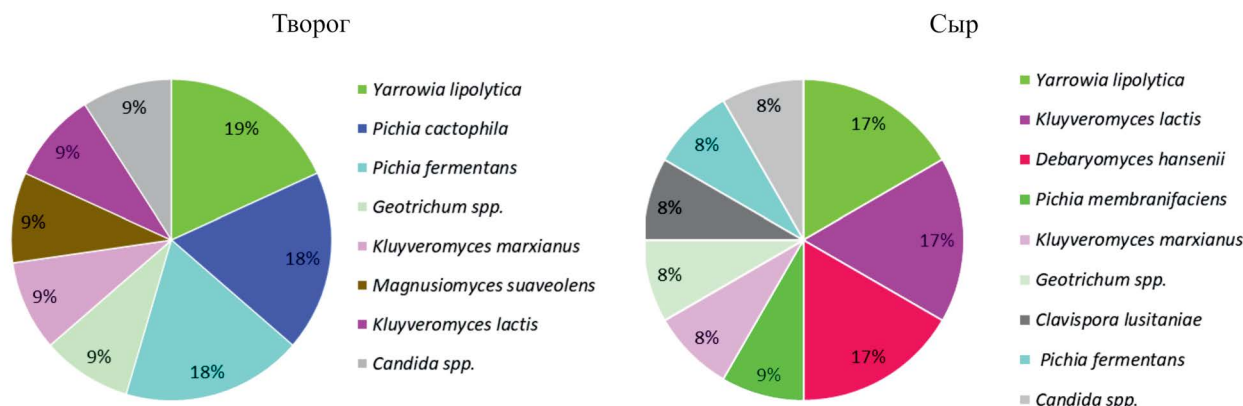


Рис. 4. Сравнительный анализ дрожжевой микрофлоры творога и сыра.

pH среды и, тем самым, способствуют росту молочнокислых бактерий (Fleet, 1990). Следует отметить, что все обнаруженные нами дрожжи находили в соответствующих сырах ранее (Bintsis, 2021).

В отличие от исследованных нами напитков смешанного брожения, в сырах, как и в твороге, отсутствовали виды *Saccharomyces cerevisiae* и *Monosporozyma unispora*, которые активно выделяют углекислый газ в ходе спиртового брожения (рис. 3 и 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о значительном видовом разнообразии дрожжей, присутствующих в различных молочных продуктах, реализуемых в России. При этом дрожжи не были обнаружены в трех образцах кефира, а также в некоторых заквасках для кефира (и айрана). Поскольку это продукты смешанного брожения, то отсутствие в них дрожжей, которые играют ключевую роль в формировании вкуса, аромата и образуют ряд биологически активных веществ, не может не сказаться на их качестве. Именно дрожжи, которые образуют небольшое количество спирта и углекислый газ, придают кисломолочным напиткам определенную остроту. Кроме того, дрожжи препятствуют быстрому их закислению, поскольку частично усваивают молочную кислоту, в которую превращают лактозу молочнокислые бактерии. Интересно отметить, что отсутствие дрожжей было установлено при микробиологическом исследовании двух промышленных образцов кефира в Греции, тогда как ампликон-метагеномный анализ ITS-участка рДНК свидетельствовал об их наличии. Вероятно, это было связано с ПЦР-амплификацией фрагментов рДНК нежизнеспособных клеток (Kazou et al., 2021).

С другой стороны, дрожжи были обнаружены в некоторых изученных нами продуктах

молочнокислого брожения, для изготовления которых традиционно используются закваски на основе молочнокислых бактерий. По-видимому, это нельзя отнести к нарушению технологии их изготовления, поскольку дрожжи не только могут придавать дополнительный вкус и аромат, привлекая покупателей, но и улучшать полезные свойства молочных продуктов.

Дрожжевая микрофлора изученных молочных продуктов представлена как усваивающими лактозу (*Kluyveromyces*, *Debaryomyces* и *Candida*), так и негативными по этому признаку дрожжами *Saccharomyces*, *Maudiozyma*, *Monosporozyma*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Geotrichum*, *Clavispora*, *Magnusiomyces*, *Candida* и *Rhodotorula*. В различных молочных продуктах обнаружено семь видов рода *Pichia*: *P. fermentans*, *P. inconspicua*, *P. kudriavzevii*, *P. cactophila*, *P. membranifaciens*, *P. manshurica* и *P. deserticola*. Последние два вида характерны только для кумыса, в изготовлении которого используется кобылье молоко. Наиболее часто встречающимся видом рода *Pichia* были дрожжи *P. fermentans*.

В ряде исследованных продуктов были обнаружены дрожжи *Candida*. Как известно, эти микроорганизмы являются симбионтами человека и животных, но некоторые штаммы и при определенных условиях (например, при избыточном размножении), у ослабленных лиц с пониженным иммунитетом могут вызывать тяжелые и угрожающие жизни заболевания (Levenson et al., 1991; Ruan et al., 2010). Следует отметить, что в микробных сообществах сыров с благородной плесенью (сыры с белой плесенью, голубые сыры) обнаруживается целый ряд представителей *Candida* (Desmaures, 2014). В частности, там присутствует *Candida zeylanoides*, обнаруженный нами в одном из образцов кефира и в адыгейском сыре, и *Candida intermedia*, присутствующий в одном из образцов айрана турецкого (Levenson et al., 1991; Ruan et al., 2010).

Сбраживающие лактозу дрожжи рода *Kluyveromyces* были выделены как из национальных напитков (айран, тан, кумыс, мацони и др.), так и из традиционных продуктов (кефир, ацидофилин, ряженка, сыр, творог). Наиболее часто встречались дрожжи *K. marxianus*, которые были выделены из большинства изученных молочных продуктов, тогда как родственный вид *K. lactis* обнаружен только в четырех продуктах: айран турецкий, творог, сыр адыгейский и сыр винный. По-видимому, преобладание дрожжей *K. marxianus* связано с их физиологическими особенностями (термо- и осмоотолерантность) и, как следствие, с большей приспособленностью к промышленным условиям ферментации (например, пастеризации).

В кисломолочных продуктах смешанного брожения преобладающими видами были также дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Monosporozyma unispora*, которые полностью отсутствовали в продуктах молочнокислого брожения и сырах. Дрожжи *Monosporozyma unispora* не обнаружены во всех изученных образцах айрана. Способные расщеплять жиры дрожжи *Yarrowia lipolytica* присутствовали, в основном, в молочных продуктах повышенной жирности: творог, сыр, айран и тан.

Исследование микрофлоры молочных продуктов с применением различных молекулярных методов, включая метагеномный анализ, в последние годы проводилось многими исследователями в разных странах мира. Особенно большое внимание уделялось изучению микробиоты кефирных зерен и кефира (Marsh et al., 2013; Gut et al., 2019; Wang et al., 2020; Pikkan et al., 2021). Следует отметить, что дрожжи *Monosporozyma unispora*, *Kluyveromyces marxianus* и *Saccharomyces cerevisiae* преобладали повсеместно, хотя их соотношение варьировало в зависимости от географического происхождения кисломолочного продукта (Wang et al., 2020). Считается, что даже небольшое изменение микробиоты в кефирных зернах может привести к значительным изменениям физико-химических, сенсорных и питательных свойств кефирных продуктов. Интересно отметить, что метагеномный анализ впервые показал наличие в кефирных зернах дрожжей *Naumovozyma dairensis*, а также анаэробных бактерий, в частности, *Bifidobacterium* sp. (Pikkan et al., 2021).

Полученные нами результаты и литературные данные указывают на то, что видовой состав дрожевой микрофлоры в значительной степени зависит от конкретного молочного продукта, вида молока и места производства.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бачинская-Райченко А.А. Микроорганизмы кумысной закваски “катык” и кумыса // Тр. СПб. об-ва естествоисп. 1911. Т. XLII. С. 417.
- Бачинская А.А. Микроорганизмы кумыса // Русский врач. 1913. № 13. С. 1.
- Бачинская А.А., Юницкая Ф.А. Микроорганизмы донского кислого молока // Журн. микробиологии. 1916. Т. III. С. 23.
- Богданов В.М. Исследование кубанской простокваши // Тр. Волог. мол.-хоз. ин-та. 1930. № 86.
- Войткевич А.Ф., Халдина М.Ф., Садокова И.П. О выработке кефира на чистых культурах // Микробиология. 1936. Т. V. № 1. С. 116.
- Дин Ф., Красильникова А.А., Леонтьева М.Р., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Анализ кефирных зерен из разных регионов планеты с применением высокопроизводительного секвенирования // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2022. Т. 77. С. 266–272.
- Козырева И.И., Кабисов Р.Г., Цугкиев Б.Г. Свойства микроорганизмов, выделенных из кефирных грибков // Молочная промышленность. 2009. № 3. С. 60–61.
- Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 427с.
- Наумова Е.С., Наумов Г.И., Никитина Т.Н., Садыкова А.Ж., Кондратьева В.И. Молекулярно-генетическая и физиологическая дифференциация дрожжей *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus*: анализ штаммов из Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM) // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 236–236.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Nikitina T.N., Sadykova A.h., Kondratieva V.I. Molecular genetic and physiological differentiation of *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*: analysis of strains from the All-Russian collection of microorganisms (VKM) // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 216–223.
- Николаева Е.М. Микроорганизмы кефира // Изв. СПб. ботанич. сада. 1907. Т. VII. № 4.
- Оноприйко А.В., Оноприйко В.А., Маслий Е.А. Молочная лестница // Пищевая промышленность. 2011. № 3. С. 8–9.

- Саруханян Ф.Г., Ерзинкян Л.А. Микрофлора и приготовление мацуна на чистых культурах // Молочн. пром-сть СССР. 1936. № 8. С. 31.
- Серпова Е.В., Кишковская С.А., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярно-генетическая идентификация винных дрожжей Крыма // Биотехнология. 2011. № 6. С. 47–54.
- Скородумова А.Н. Дрожжи молока и молочных продуктов и их производственное значение. М.: Пищевая промышленность, 1969. 117 с.
- Старыгина Л., Халдина М. Изучение микрофлоры кефира с целью приготовления его на чистых культурах // Микробиология. 1934. Т. III. № 1. С. 88.
- Холодина А.М., Лайкова А., Сережкин И. Кумыс: микробный состав и особенности ферментации // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 6. С. 58–73.
- Azizi N.F., Kumar M.R., Yeap S.K., Abdullah J.O., Khalid M., Omar A.R., Osman M.A., Mortadza S.A.S., Alitheen N.B. Kefir and its biological activities // Foods. 2021. V. 10. Art. 1210.
- Bintsis T. Yeasts in different types of cheese // AIMS Microbiol. 2021. V. 7. P. 447–470.
- Charlton S., Ramsøe A., Collins M., Craig O.E., Fischer R., Alexander M., Speller C.F. New insights into Neolithic milk consumption through proteomic analysis of dental calculus // Archaeol. Anthropol. Sci. 2019. V. 11. P. 6183–6196.
- Desmasures N. Mold-ripened varieties // Encyclopedia of food microbiology. 2nd ed. / Eds. Batt C.A., Tortello M.R. London: Academic Press, 2014. V. 2. P. 409–416.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 329–337.
- Farnworth E. Kefir – a complex probiotic // Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods. 2005. V. 2. P. 1–17.
- Fleet G.H. Yeasts in dairy products // J. Appl. Bacteriol. 1990. V. 68. P. 199–211.
- Fröhlich-Wyder M.T. Yeasts in dairy products // Yeasts in food / Eds. Boekhout T., Robert V. Woodhead Publishing, 2003. P. 209–237.
- Fröhlich-Wyder M.T., Arias-Roth E., Jakob E. Cheese yeasts // Yeast. 2019. V. 36. P. 129–141.
- Garnier L., Valence F., Mounier J. Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: an update // Microorganisms. 2017. V. 5. Art. 42.
- González-Orozco B.D., García-Cano I., Jiménez-Flores R., Álvarez V.B. Invited review: milk kefir microbiota – direct and indirect antimicrobial effects // J. Dairy Sci. 2022. V. 105. P. 3703–3715.
- Grygier A., Myska K., Rudzińska M. *Galactomyces geotrichum* moulds from dairy products with high biotechnological potential // Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 2017. V. 16. P. 5–16.
- Guo L., Ya M., Guo Y.S., Xu W.L., Li C.D., Sun J.P., Zhu J.J., Qian J.P. Study of bacterial and fungal community structures in traditional koumiss from Inner Mongolia // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. P. 1972–1984.
- Gut A.M., Vasiljevic T., Yeager T., Donkor O.N. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties // J. Funct. Foods. 2019. V. 58. P. 56–66.
- Jastrzębska E., Wadas E., Daszkiewicz T., Pietrzak-Fiećko R. Nutritional value and health-promoting properties of mare's milk – a review // Czech. J. Anim. Sci. 2017. V. 62. P. 511–518.
- Ilkkan Ö.K., Bağdat E.Ş. Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis // LWT – Food Sci. Technol. 2021. V. 152. Art. 112375.
- Kazou M., Grafakou A., Tsakalidou E., Georgalaki M. Zooming Into the microbiota of home-made and industrial kefir produced in Greece using classical microbiological and amplicon-based metagenomics analyses // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 621069.
- Kochetkova T.V., Grabarnik I.P., Klyukina A.A., Zayulina K.S., Gavirova L.A., Shcherbakova P.A., Kachmazov G.S., Shestakov A.I., Kublanov I.V. Microbial communities of artisanal fermented milk products from Russia // Microorganisms. 2022. V. 10. P. 21–40.
- Levenson D., Pfaller M.A., Smith M.A., Hollis R., Gerarden T., Tucci C.B., Isenberg H.D. *Candida zeylanoides*: another opportunistic yeast // J. Clin. Microbiol. 1991. V. 29. P. 1689–1692.
- Löoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications // Biotechniques. 2011. V. 50. P. 325–328.
- Malacarne M., Martuzzi F., Summer A., Mariani P. Protein and fat composition of mare's milk: Some nutritional remarks with reference to human and cow's milk // Int. Dairy J. 2002. V. 12. P. 869–877.
- Marsh A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources // PLoS One. 2013. V. 8. Art. e69371.
- Nejati F., Junne S., Neubauer P. A big world in small grain: a review of natural milk kefir starters // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 192.
- Ruan S.Y., Chien J.Y., Hou Y.C., Hsueh P.R. Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia* // Int. J. Infect. Dis. 2010. V. 14. P. 147–149.
- Vu D., Groenewald M., Szöke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkleij G.J.M., Crous P.W., Boekhout T., Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.
- Wang H., Wang C., Guo M. Autogenic successions of bacteria and fungi in kefir grains from different origins when sub-cultured in goat milk // Food Res. Int. 2020. V. 138. Art. 109784.
- White T.J., Bruns T., Lee E., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. N.Y.: Academic Press, 1990. P. 315–322.

- Wilkin S. The mystery of early milk consumption in Europe // *Nature*. 2022. V. 608. P. 268–269.
- Wszolek M., Kupiec-Teahan B., Skov Guldager H., Tamime A. Y. Production of kefir, koumiss and other related products // *Fermented Milks* / Ed. Tamime A. NJ: Blackwell Science Ltd, 2006. P. 174–216.
- Wyder M. T., Bachmann H. P., Puhani Z. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in foil wrapped Raclette cheese // *LWT – Food Sci. Technol.* 1999. V. 32. P. 333–343.
- Zhu H. Y., Shang Y. J., Wei X. Y., Groenewald M., Robert V., Zhang R. P., Lie A. H., Han P. J., Ji F., Li J. N., Liu X. Z., Bai F. Y. Taxonomic revision of *Geotrichum* and *Magnusiomyces*, with the descriptions of five new *Geotrichum* species from China // *Mycology*. 2024. P. 1–24. <https://doi.org/10.1080/21501203.2023.2294945>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Yeast Microflora of Dairy Products Sold in Russia

A. Yu. Tuaeva¹, A. M. Ponomareva^{1, 2}, V. A. Livshits¹, E. S. Naumova^{1, *}

¹ Kurchatov Institute National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182, Russia

² Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047, Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Abstract. Using restriction analysis of the 5.8S-ITS rDNA fragment and sequencing of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the yeast microflora of various dairy products sold in Russia was studied. Most of the fermented milk products studied were dominated by lactose-utilizing yeasts *Kluyveromyces* and *Debaryomyces*, as well as lactose-negative yeasts *Saccharomyces*, *Monosporozyma*, *Pichia*, *Geotrichum* and *Yarrowia*. The yeast *Kluyveromyces marxianus* was present in most of the fermented milk products studied, while the related species *K. lactis* was found only in some samples of ayran, curds and cheese. The dominance of *K. marxianus* is apparently associated with their physiological characteristics (thermo- and osmotolerance), which provide these yeasts with better adaptation to industrial fermentation conditions. The dominant species in mixed-fermentation dairy products, *Saccharomyces cerevisiae* and *Monosporozyma unispora*, were completely absent in cheeses and lactic acid fermentation products. In general, the species composition of yeasts largely depended on the fermented milk product, the type of milk and the specific manufacturer.

Keywords: yeast microflora, dairy products sold in Russia, dominant species *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Monosporozyma unispora*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans*

УДК 579.222+579.24

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НОВЫХ ШТАММОВ ПОЧВЕННЫХ СТРЕПТОМИЦЕТОВ

© 2024 г. Н. А. Боков^{a, b, *}, А. В. Бакулина^a, Е. А. Бессолицына^a, И. Г. Широких^{a, b}

^aФедеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, Киров, 610007, Россия

^bВятский государственный университет, Киров, 610000, Россия

*e-mail: nikita-bokov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2024 г.

После исправления 30.04.2024 г.

Принята к опубликованию 01.04.2024 г.

С целью получения новых штаммов микроорганизмов-целлюлолитиков для использования в технологиях переработки растительных и других целлюлозосодержащих отходов выделены из различных источников четыре новых бактериальных штамма рода *Streptomyces*. В тестах с Конго красным у изолятов определяли способность к деструкции карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) и природных целлюлозосодержащих материалов – соломы, опила березы и дуба. Количественно активность целлюлазы оценивали при ферментации соломы. На средах с каждым из модельных источников углерода определяли радиальную скорость роста, как показатель, характеризующий способность изолятов к колонизации различных субстратов. Сопряженная характеристика целлюлазной активности и радиальной скорости роста на субстратах различной природы позволила оценить перспективы дальнейшего использования исследуемых штаммов в качестве деструкторов целлюлозосодержащих отходов. Лидировал в исследованной выборке штамм *Streptomyces thermocarboxydus* T1-3, отличающийся наиболее активным ферментативным гидролизом всех модельных источников целлюлозы, высокой радиальной скоростью роста (до 87 ± 3 мкм/ч) и достижением в течение 24 ч максимальной активности целлюлазы (171.25 ± 8.13 Ед/мл) при ферментации соломы.

Ключевые слова: целлюлоза, *Streptomyces*, деструкция, эндо-ксилоглюканазы, колонизация субстрата, скорость радиального роста

DOI: 10.31857/S0026365624050111

В Российской Федерации ежегодно накапливается около 300 млн. тонн отходов сельскохозяйственного производства (солома, стебли, жмых) и целлюлозно-бумажной промышленности (лигнин), а также порядка 50 млн. тонн бытовых целлюлозосодержащих отходов (бумага, картон) (Громова, 2012). Целлюлоза в окружающей среде без ферментативного гидролиза разлагается крайне медленно, поэтому сокращение количества отходов и сведение к минимуму неблагоприятного воздействия отходов на экономику, окружающую среду и здоровье человека – одна из серьезных задач современной биотехнологии.

Разложение целлюлозы до глюкозы осуществляется посредством скоординированного действия по меньшей мере трех ферментов целлюлазного комплекса: β -1,4-эндоглюканазы (ЕС 3.2.1.4), β -1,4-экзоглюканазы (ЕС 3.2.1.91) и β -D-глюкозидазы (целлобиазы) (ЕС 3.2.1.21), продуцировать которые способен довольно широкий круг микроорганизмов (Jayasekara, Ratnayake, 2019).

Наиболее изученными и практически востребованными продуцентами целлюлаз являются грибы, в основном, представители родов *Trichoderma* и *Aspergillus*, благодаря более высокой, чем у бактерий, продуктивности и стабильности ферментов, а также способности мицелия к проникновению вглубь целлюлозосодержащей биомассы. Однако, в сравнении с грибами, целлюлазные системы бактерий могут обладать рядом биотехнологических преимуществ: субстратной специфичностью, термоустойчивостью, особыми оптимумами активности (Gupta et al., 2012; Franco-Cirigliano et al., 2013; Escudero-Agudelo et al., 2023).

Бактерии рода *Streptomyces* – наиболее многочисленная группа мицелиальных прокариот в почвах, где они осуществляют разнообразные химические превращения сложных субстратов, которые подчас недоступны или труднодоступны другим микроорганизмам. Гены важных для расщепления целлюлозы ферментов (Carbohydrate-Active enZymes – CAZy) – гликозилгидролазы, гликозилтрансферазы,

углевод-эстеразы и некоторые окислительно-восстановительные ферменты, обладающие вспомогательной активностью, — широко распространены среди стрептомицетов, однако практически значимые уровни целлюлолитической активности в действительности встречаются у стрептомицетов достаточно редко (Book et al., 2016). На основании данных сравнительной геномики авторы связывают это с отсутствием у большинства представителей рода *Streptomyces*, не ассоциированных с хозяевами-эукариотами, фактора транскрипции CebR, как главного регулятора катаболизма целлюлозы (Marushima et al., 2009). Геномы высокоактивных штаммов включают особую комбинацию семейств, важных для расщепления целлюлозы ферментов. Отсутствие у стрептомицетов любого из генов, кодирующих ферменты CAZy, относящиеся к семействам GH9, GH12 и GH74 (с предполагаемой активностью эндоглюканазы), GH48 (целлобиогидраза), GH10 и GH11 (ксиланазы), приводит к ограничению целлюлолитической активности штаммов (Book et al., 2016).

Традиционные стратегии генетических манипуляций со стрептомицетами для корректировки их метаболического потенциала значительно уступают по результативности тем, что уже используются на практике в отношении продуцентов грибных целлюлаз (Рожкова, Кислицин, 2021). Причины такого отставания связывают, прежде всего, с высоким содержанием гуанина (G) и цитозина (C) в геномах актиномицетов и ограниченным выбором генетических инструментов в связи со слабой рекомбинацией у стрептомицетов гомологичной ДНК (Kieser et al., 2000; Zhao et al., 2020). Многообещающим инструментом для геной инженерии стрептомицетов стала технология редактирования генома на основе системы CRISPR-Cas9 (Kormanec et al., 2019). Однако на практике, при разработке надежных процедур редактирования, еще предстоит преодолеть многочисленные технические трудности (Ye et al., 2020).

Несмотря на успехи синтетической биологии в отношении многих биотехнологически значимых микроорганизмов, целенаправленный поиск новых штаммов с более высокой активностью и уникальными свойствами продолжает сохранять свое значение, о чем свидетельствуют многочисленные работы последних лет, направленные на разработку технологий и биопрепаратов на основе целлюлолитически активных стрептомицетов (Bispo et al., 2018; Celaya-Herrera et al., 2021; Waheeb et al., 2021; Shrestha et al., 2023; Escudero-Agudelo et al., 2023). Деструктивный потенциал стрептомицетов в технологиях конверсии растительной биомассы использован далеко не в полной мере. Информация о ферментативных системах отдельных видов и обусловленных ими различиях в утилизации различных целлюлозных субстратов носит фрагментарный характер. Недостаточно исследована способность стрептомицетов колонизировать различные субстраты в качестве источника углерода.

Цель настоящей работы — оценка радиальной скорости роста и способности к деструкции различных целлюлозных субстратов у природных изолятов стрептомицетов для выявления штаммов, наиболее пригодных к использованию в технологиях переработки растительных отходов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы, выделение и культивирование. Объектами исследования служили четыре природных изолята бактерий, полученные из почв разного генезиса (таблица). Выделение осуществляли с использованием селективного приема — образцы почв перед посевом прогревали при 70°C в течение 4 ч для ограничения роста немикелиальных бактерий. Для посева использовали казеин-глицериновый агар (Нетрусов и соавт., 2005). Инкубация посевов при 28°C длилась в течение двух недель.

Таблица. Происхождение и филогенетическое положение штаммов по результатам анализа фрагментов гена 16S рНК

Источник выделения	Штамм	№ доступа по базе данных NCBI	Ближайшие родственники по базе данных NCBI	Сходство, %
Подзол песчаный на древнеаллювиальных песках, Кировская обл.	Mb4-2	ON164840.1	<i>S. griseoaurantiacus</i> BQAB-05d <i>S. indiaensis</i> 1910ICU61	99.37
Выработанный торфяник низинного типа, Кировская обл.	T1-3	ON164813.1	<i>S. thermocarboxydus</i> EGI124	98.52
Серая лесная почва, Нижегородская обл.	N27-25	OR215430	<i>S. hygrosopicus</i> XM201 <i>S. geldanamycininus</i> Z374	99.82
Серая лесная почва, Нижегородская обл.	H13-3	OR215467.1	<i>S. ryensis</i> zw24	99.47

Отсев отдельных колоний производили на овсяный агар. После процедуры очистки культуры тестировали с Конго красным на минеральной среде с 1% карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) (Wood et al., 1988). Объем тестируемой выборки составил 87 изолятов. Для дальнейшей работы были отобраны штаммы Mb4-2, T1-3, N27-25 и H13-3, обеспечившие в тесте наиболее значительные (35 мм) зоны гидролиза КМЦ.

Филогенетический анализ. Таксономическое положение исследуемых штаммов определяли на основе анализа фрагментов гена 16S рРНК в НПК “Синтол” (г. Москва). ДНК экстрагировали из чистых изолятов, ген 16S рРНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием универсальных бактериальных праймеров 16SF75 – AGTGGCGGACGGGTGAGTAA и 16SR1100 – TTAAGTAGCGATTCCGACTTCA. Условия для ПЦР использовали следующие: начальная денатурация при 95°C в течение 4 мин, 32 цикла при 94°C в течение 20 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 45 с, конечная элонгация 5 мин при 68°C. Продукты ПЦР секвенировали на анализаторе ДНК ABI3130xl (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для установления процента сходства полученных нуклеотидных последовательностей с имеющимися в GenBank проводили множественные выравнивания последовательностей с помощью программы MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Полученные в работе последовательности генов 16S рРНК бактерий были депонированы в GenBank с присвоением соответствующих номеров (таблица).

ПЦР-амплификация генов целлюлазы. Для выявления генов целлюлаз у стрептомицетов проводили ПЦР с использованием двух специфичных к генам ферментов семейства GH74 праймеров, которые были сконструированы в ходе работы. Разработку праймеров начинали с поиска аминокислотных последовательностей эндоглюканаз семейства GH74 из имеющихся в базе данных CAZy (<http://www.cazy.org/>) для представителей рода *Streptomyces*. Затем находили соответствующие им нуклеотидные последовательности в полных геномах *Streptomyces* spp., представленных в базе GenBank Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе Clustal Omega (Sievers, Higgins, 2014) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Подбор праймеров к консервативным участкам генов ферментов семейства GH74 осуществляли вручную. Специфичность праймеров оценивали в программе BLAST Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Разработанные праймеры GH74F2 5'-GTTCCGGCTGGTGGATCCAG-3' и GH74R2 5'-GTGGTACATCACGCCGATGTC-3' (размер ампликона 216 п.н.) синтезированы в НПК “Синтол” (г. Москва).

Суммарные нуклеиновые кислоты выделяли по методике (Sambrook et al., 1989). Реакционная смесь (10 мкл) содержала 1 нг ДНК, 200 мкМ dNTPs, 10 pM каждого праймера, 1× PCR-буфер и 3.75 ед. *Taq*-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия). ПЦР проводили на программируемом термостате ТП4-ПЦР-01 Терцик (НПО “ДНК-Технология”, Россия) при следующем режиме: 1 цикл 95°C – 5 мин, 35 циклов по 95°C – 30 с, 72°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с, 1 цикл 72°C – 8 мин. Продукты реакции разделяли методом вертикального электрофореза в 7.0% полиакриламидном геле, который окрашивали бромистым этидием (Sambrook et al., 1989). Визуализацию результатов электрофореза проводили с помощью трансиллюминатора Квант-312 (“Helicon”, Россия). Секвенирование по Сэнгеру ПЦР-продуктов, полученных в ходе амплификации с праймерами GH74F2 и GH74R2, выполнено в НПК “Синтол” (г. Москва). Биоинформатический анализ полученных последовательностей проводили в два этапа: 1) автоматический с использованием сервиса BLAST на сайте NCBI; 2) попарные выравнивания в программе Clustal Omega с исходными аминокислотными последовательностями, использованными для дизайна праймеров, после их обратной трансляции *in silico* (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss_backtranseq). Процент сходства рассчитывали на сайте <https://molbiol.kirov.ru/>.

Эксперименты по деструкции целлюлозных субстратов. Для разных вариантов опыта в агаризованную среду Гетчинсона вносили в качестве единственного источника углерода (10 г/л): КМЦ, микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ), а также природные целлюлозосодержащие материалы – солому, опил березы и опил дуба, которые предварительно размалывали до состояния порошка. Микроорганизмы засевали на чашку уколом в трехкратной повторности, в каждом варианте использовали по три чашки. Инкубировали посевы при 28°C в течение 14 сут. Затем поверхность заливали 0.1% водным раствором Конго красного, экспонировали 15 мин при комнатной температуре, раствор сливали и поверхность промывали 1М раствором NaCl в течение 10 мин. О продукции целлюлаз на различных субстратах судили по величине обесцвеченной зоны вокруг колонии тестируемого штамма, поскольку продукты разрушения целлюлозы не окрашиваются красителем (Wood et al., 1988).

Определение радиальной скорости роста. Для измерения радиальной скорости роста (Кр) культуры стрептомицетов засевали на агаризованную среду Гетчинсона с каждым из модельных целлюлозных субстратов таким же образом, как описано выше – по 9 уколов для каждого штамма. В контроле производили посев штаммов на минеральный агар Гаузе 1, источник углерода в котором представлен крахмалом (20 г/л) (Гаузе и соавт., 1983). Чашки с посевами инкубировали при 28°C. Измерение

диаметров колоний проводили через 48, 96, 120, 168, 216 и 336 ч от начала культивирования. За диаметр отдельной колонии в данный момент времени принимали среднее арифметическое 9 измерений. Радиальную скорость роста определяли по формуле:

$$K_r = (d_2 - d_1)/(t_2 - t_1),$$

где d_1 и d_2 — диаметр колоний (мкм) в начальный (t_1) и конечный (t_2) моменты времени измерения соответственно (ч) (Билай, 1973).

Определение активности целлюлаз при разложении соломы. Культуры выращивали в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): K_2HPO_4 — 2; NH_4Cl — 2, $NaCl$ — 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1; $MnSO_4$ — 0.05; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.05; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0.1. В качестве единственного источника углерода в среду вносили измельченную солому в количестве 10 г/л. Культивирование осуществляли в стационарных условиях при 28°C в течение 6 сут. Для определения целлюлазной активности мицелий осаждали центрифугированием при 6000 об./мин в течение 10 мин. Для анализа использовали надосадочную жидкость. Активность фермента измеряли при 50°C и pH 5 по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров, концентрацию которых определяли спектрофотометрически при 540 нм с реагентом на основе 3,5-динитросалициловой кислоты согласно методике (Ghose, 1987). За единицу активности принимали такое количество фермента, при действии которого на субстрат в условиях ферментативной реакции за 1 ч образуется 1 мкмоль редуцирующих сахаров в пересчете на глюкозный эквивалент. Все измерения проводили в трех повторностях, погрешность измерений не превышала 5%.

Статистическая обработка результатов и построение графиков выполнены с использованием программ Microsoft Excel и Statgraphics. Результаты определения способности стрептомицетов к деградации различных целлюлозных субстратов были кластеризованы и представлены в виде тепловой карты с помощью веб-сервиса NGCHM-web-builder (Ryan et al., 2019).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная идентификация штаммов-целлюлолитиков, основанная на анализе фрагмента гена 16S рРНК, подтвердила, что выделенные штаммы Mb4-2, T1-3, N27-25 и H13-3 являются представителями рода *Streptomyces*, семейства *Streptomycetaceae*, порядка *Kitasatosporales*, класса *Actinomycetes*. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с другими представленными в NCBI последовательностями позволило

с высокой долей вероятности (уровень сходства составил более 98.5%) заключить, что изучаемые микроорганизмы являются ближайшими генетическими родственниками видов *S. griseoaurantiacus*/*S. indiaensis* (Mb4-2), *S. thermocarboxydus* (T1-3) *S. hygrosopicus*/*S. geldanamycininus* (N27-25) и “*S. ryensis*” (H13-3) (таблица). Осторожность в интерпретации результатов в отношении видов рода *Streptomyces* обусловлена тем, что сходство генов 16S рРНК не всегда гарантирует достаточно высокий уровень родственности бактериальных геномов, и в большинстве случаев для видовой идентификации стрептомицетов необходим мультилокусный или полногеномный анализ (Komaki, 2023).

В образцах ДНК всех выделенных по способности к гидролизу КМЦ штаммов в ходе ПЦР-амплификации с праймерами GH74F2/ GH74R2 был выявлен целевой ампликон — 216 п.н. Для проверки идентичности амплифицированных фрагментов генам целлюлаз ПЦР-продукты исследуемых штаммов подвергли секвенированию. Сервисом BLAST установлено сходство (87.6–98.2%) полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями полных геномов *Streptomyces* spp. В связи с тем, что данные полных геномов не дают информации о конкретном гене, полученные последовательности ПЦР-продуктов стрептомицетов парно выравнивали с исходными аминокислотными последовательностями, использованными для дизайна праймеров, после их обратной трансляции *in silico*. Процент сходства с последовательностями гликозид-гидролаз семейства GH74 изменялся от 57.9 до 78.0% в зависимости от штамма. Наиболее высокое (78.0%) сходство ПЦР-продукта с последовательностью β-1,4-эндоглюканазы *S. viridosporus* T7A (регистрационный номер QEU87985.1 в GenBank), принадлежащей к семейству GH74, установлено для штамма “*S. ryensis*” H13-3. Последовательности ампликонов, полученные для штаммов *S. griseoaurantiacus* Mb4-2 и *S. thermocarboxydus* T1-3, совпадали с последовательностью β-1,4-эндоглюканазы *S. pristinaespiralis* (ALC25053.1) на 61.4 и 59.9% соответственно. ПЦР-продукт штамма *S. hygrosopicus* N27-25 был гомологичен целевому ферменту *S. glaucescens* (QEU68415.1) только на 57.9%. Невысокий уровень выявленного сходства может быть обусловлен как наличием генного полиморфизма исследуемых ферментов, так и пока ограниченным количеством представленных в GenBank данных (López-Mondéjar et al., 2016). Тем не менее результаты указывают на наличие у исследуемых культур генов, кодирующих синтез 1,4-β-эндоглюканаз, относимых по международной классификации ферментов к семейству GH74.

Эндо-1,4-глюканазы (ЕС 3.2.1.4) катализируют гидролиз 1,4-β-D-гликозидных связей в различных β-глюканах, что является одним из необходимых условий процесса конверсии растительной биомассы.

В целлюлозе при этом гидролизу подвергаются преимущественно ее аморфные области, однако известны эндоглюканазы, способные разлагать кристаллическую целлюлозу (Cecchini et al., 2018).

Стрептомицеты характеризуются неодинаковой способностью к утилизации различных источников углерода. Чтобы выяснить возможность деструкции тех или иных целлюлозосодержащих субстратов новыми изолятами, их высевали на синтетические среды, содержащие в качестве единственного источника углерода КМЦ, МКЦ, а также природные целлюлозосодержащие материалы – солому, опил березы и опил дуба. Результаты определения в тесте с Конго красным величины зон их деструкции различными штаммами представлены в виде тепловой карты (рис. 1).

Столбцы обозначают различные источники целлюлозы, а строки – исследуемые штаммы. Наибольшей активностью деструкции модельных целлюлозных субстратов, судя по величине зон гидролиза, характеризовался *S. thermocarboxydus* T1-3. Так, обесцвеченные зоны гидролиза МКЦ и КМЦ составили у этого штамма 51 ± 3 и 48 ± 2 мм соответственно, т.е. существенно превысили зоны гидролиза КМЦ, образуемые лучшими целлюлолитическими изолятами стрептомицетов из почв Египта – 25 мм (Waheeb et al., 2021) и соляных лагун Мексики – от 30 мм (Escudero-Agudelo et al., 2023). Кластеризация полученных данных автоматизированным алгоритмом выделила штамм *S. thermocarboxydus* T1-3 в отдельный кластер А, объединив в кластер Б три другие культуры *S. griseoaurantiacus* Mb4-2, *S. hygrosopicus* N27-25 и «*S. ryensis*» H13-3, менее эффективно разлагающие как кристаллические формы целлюлозы, так и природные целлюлозосодержащие субстраты. Между собой штаммы кластера Б различались, в основном, по способности к деструкции дубового опила и КМЦ.

При построении тепловой карты были сгруппированы по доступности для микробного разложения также сами модельные субстраты. В кластер I вошли природные целлюлозосодержащие материалы, доступность которых снижалась в ряду: солома–березовый опил–дубовый опил (рис. 1). Второй кластер (II) объединил субстраты, представляющие собой кристаллические формы целлюлозы.

Величина зон гидролиза МКЦ (35–41 мм) и КМЦ (19–48 мм) почти у всех изолятов существенно превышала величину зон гидролиза природных целлюлозных материалов (12–25 мм). Только у штамма *S. hygrosopicus* N27-25 способность разлагать КМЦ (20 ± 3 мм), солому (17 ± 1 мм) и опил березы (19 ± 1 мм) существенно не различалась.

С помощью двухфакторного дисперсионного анализа полученных данных было установлено, что на варьирование величины зоны гидролиза фактор «субстрат» ($F = 76.06$; $p \leq 0.05$) оказал втрое большее влияние, чем фактор «штамм» ($F = 25.62$; $p \leq 0.05$). Варьирование показателя, обусловленное взаимодействием факторов «штамм» $\times$ «субстрат» ($F = 24.28$; $p \leq 0.05$), оказалось близким по силе к влиянию самого фактора «штамм». Известно, что целлюлаза представляет собой многокомпонентную ферментную систему, синтез отдельных компонентов которой индуцируется используемым субстратом (Rajagopal, Kannan, 2017). Различия исследуемых штаммов по способности утилизировать модельные целлюлозные субстраты, очевидно, обусловлены особенностями состава их ферментного комплекса.

Процесс разложения целлюлозной массы тесно связан с колонизацией субстрата микроорганизмами-деструкторами. Мицелиальное строение стрептомицетов позволяет им с успехом распространяться на поверхности и проникать внутрь субстратов. Радиальную скорость роста (K_r) каждого изолята оценивали путем периодического

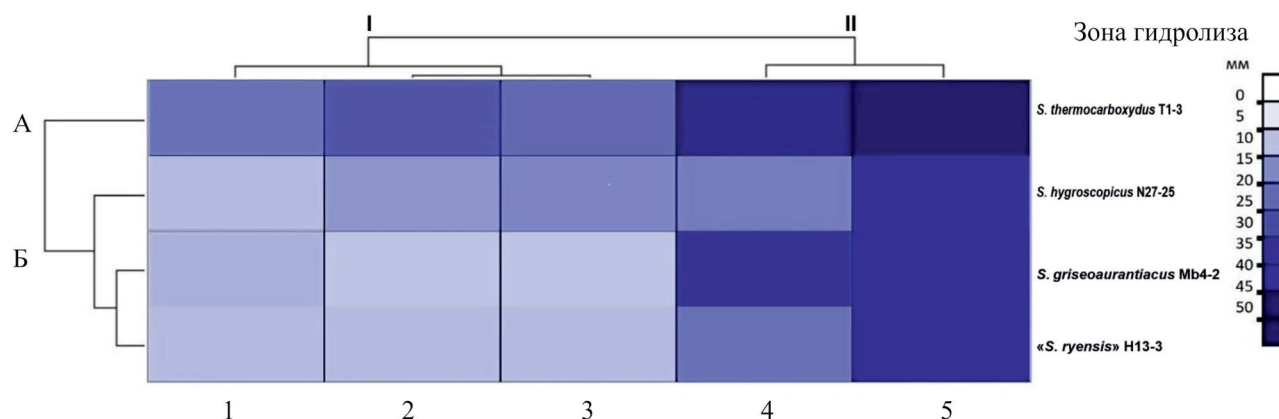


Рис. 1. Тепловая карта, отражающая различия в величине зон гидролиза стрептомицетами целлюлозы в составе различных субстратов: 1 – опил дуба; 2 – солома; 3 – опил березы; 4 – КМЦ; 5 – МКЦ.

замера диаметра колоний, растущих в чашках Петри на средах с модельными целлюлозными субстратами в качестве единственного источника углерода. K_r определяли за определенный промежуток времени. На рис. 2 приведены зависимости значений K_r от времени роста на модельных источниках углерода. Рост культур на целлюлозосодержащих средах начинался на 2–3 сут позже, чем на контрольной среде с крахмалом.

Динамика роста стрептомицетов на разных средах при одинаковых условиях инкубации была неодинакова. Так, *S. thermocarboxydus* T1-3 развивался на всех модельных источниках целлюлозы с высокой скоростью, близкой к росту на среде с крахмалом (63 ± 6 мкм/ч), за исключением среды с МКЦ ($K_r = 29 \pm 13$ мкм/ч) (рис. 3).

Наиболее быстрым ростом в течение всего времени экспозиции ($K_r = 87 \pm 3$ мкм/ч) штамм характеризовался на среде с соломой. На всех средах, содержащих природные растительные материалы, до 168 ч экспозиции K_r была примерно одинакова, затем на средах с древесным опилом, как и на среде с КМЦ, постепенно снижалась (рис. 2).

S. griseoaurantiacus Mb4-2 рос на всех источниках углерода, включая крахмал, с одинаково невысокой скоростью (K_r от 31 ± 1 до 43 ± 7 мкм/ч). Продолжительность фазы логарифмического роста у этой культуры варьировала от 48 и 96 ч на средах

с соломой и древесным опилом до 168 ч на средах с КМЦ и МКЦ. В промежутке 216–336 ч для этого штамма отмечена вторая лог-фаза, наиболее интенсивная на среде с дубовым опилом ($K_r = 67 \pm 16$ мкм/ч).

S. hygroscopicus N27-25 тоже рос с 7-суточной периодичностью при культивировании на средах с природными растительными материалами. На среде с КМЦ рост этой культуры проявился только в самом конце экспозиции (216–336 ч), K_r составляла 29 ± 4 мкм/ч.

Рост “*S. ryensis*” H13-3 наблюдали на средах со всеми модельными источниками углерода, кроме дубового опила, что можно объяснить как чувствительностью штамма к танинам (Scalbert, 1991), так и отсутствием соответствующих субстрат-специфичных ферментов. Наиболее высокая скорость роста выявлена на средах с соломой ($K_r = 50 \pm 2$ мкм/ч) и опилом березы ($K_r = 55 \pm 5$ мкм/ч) (рис. 3).

На варьирование параметра K_r , как показали результаты двухфакторного дисперсионного анализа, существенное влияние оказывали оба фактора – “штамм” ($F = 934$; $p \leq 0.05$) и “субстрат” ($F = 383$; $p \leq 0.05$), а также взаимодействие факторов “субстрат” $\times$ “штамм” ($F = 83$; $p \leq 0.05$). При этом варьирование величины K_r , обусловленное фактором “штамм”, более чем в два раза превышало варьирование, обусловленное фактором “субстрат”, и на

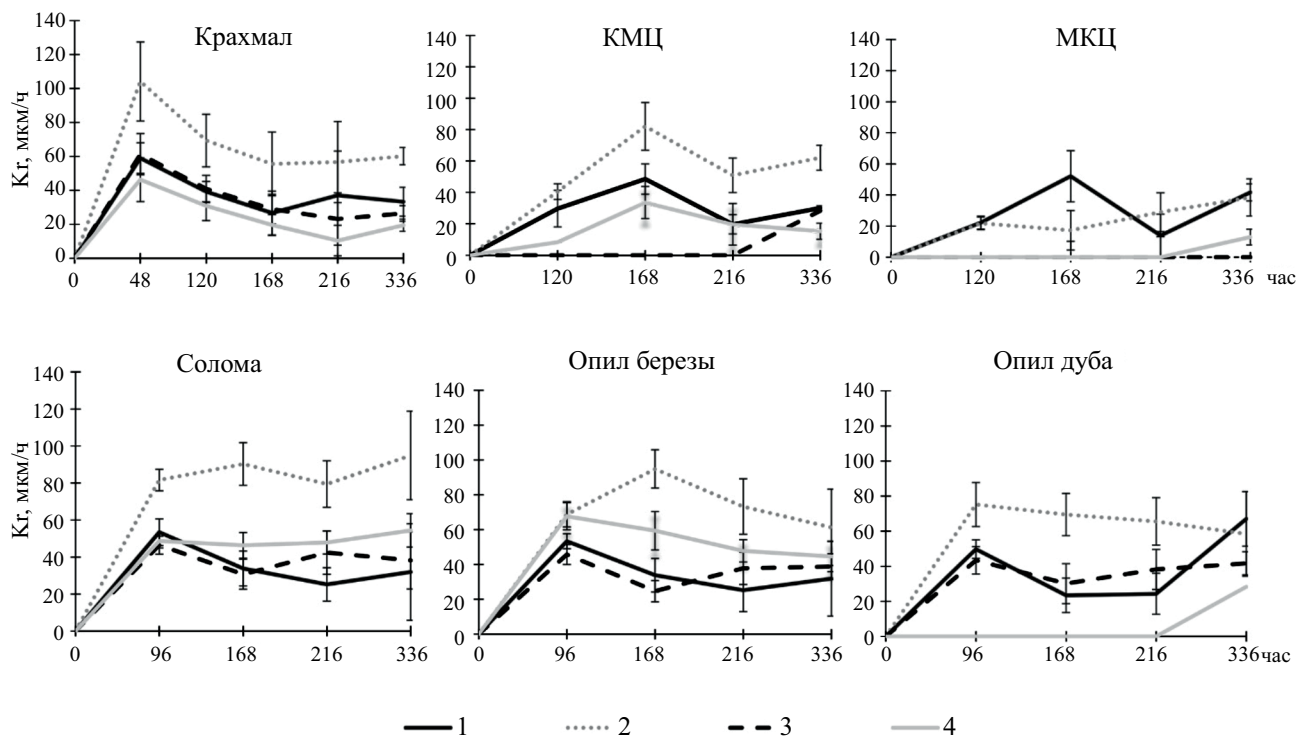


Рис. 2. Динамика скорости радиального роста на средах с различными источниками углерода штаммов: 1 – *S. griseoaurantiacus* Mb4-2; 2 – *S. thermocarboxydus* T1-3; 3 – *S. hygroscopicus* N27-25; 4 – “*S. ryensis*” H13-3.

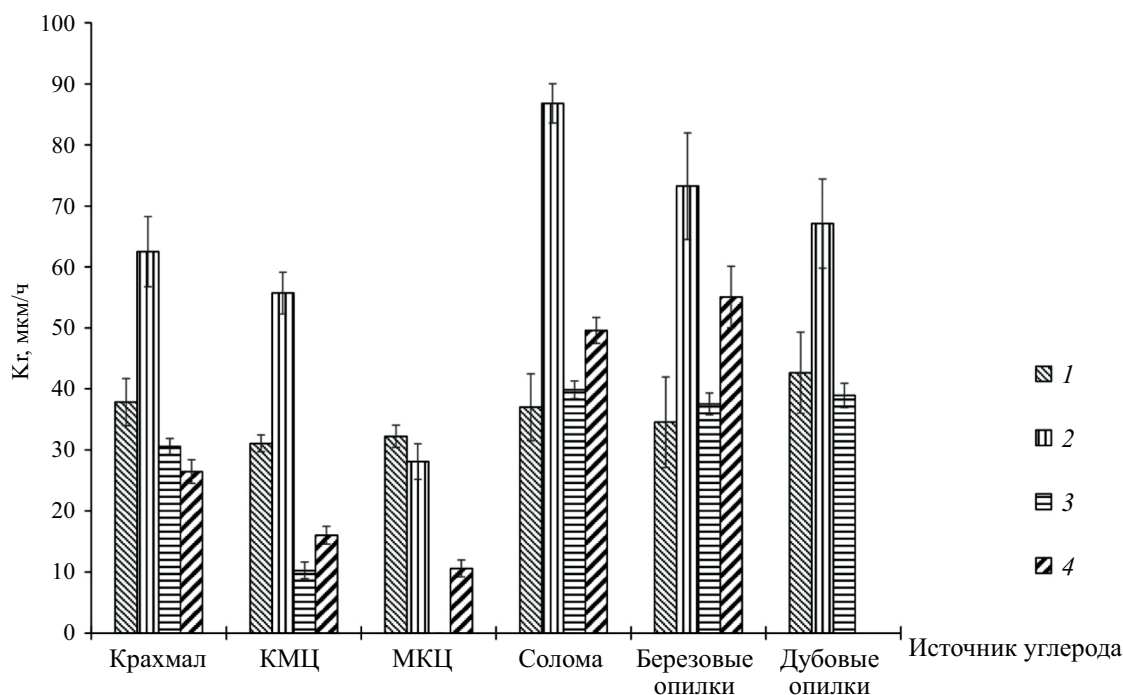


Рис. 3. Скорость радиального роста на различных субстратах штаммов: 1 – *S. griseoaurantiacus* Mb4-2; 2 – *S. thermocarboxydus* T1-3; 3 – *S. hygrosopicus* N27-25; 4 – "*S. ryensis*" N13-3 (среднее за 14 сут).

порядок – изменчивость, обусловленную взаимодействием этих факторов. Главенствующую роль штамма в скорости заселения субстрата необходимо учитывать при выявлении культур стрептомицетов, пригодных для деструкции целлюлозосодержащих материалов.

Сопоставление данных по радиальной скорости роста с результатами определения целлюлазной активности стрептомицетов на средах с различными источниками углерода, вопреки ожиданию, не выявило строгого соответствия между этими параметрами ни для одной из культур. Если зоны деструкции природных растительных субстратов в тесте с Конго красным и диаметры колоний совпадали по величине, или расхождение составляло не более 1–2 мм, то в отношении КМЦ и МКЦ такое соответствие прослеживалось не всегда. Величина колоний, образуемых штаммами N27-25 и N13-3, значительно уступала величине зон ферментативного гидролиза. Согласно литературным данным, регуляция размера колоний связана у стрептомицетов с феноменом программируемой клеточной смерти (ПКС), происходит в соответствии с доступностью источников углерода и тем самым способствует установлению оптимального соотношения размеров колонии с реальным запасом ресурсов среды (Филиппова, Виноградова, 2017). Согласно этим представлениям, все исследуемые штаммы хорошо метаболизируют растительные субстраты, поскольку зоны деструкции целлюлозы и колонизации пространства

по величине совпадают, и гораздо хуже – кристаллическую целлюлозу, о чем свидетельствуют не только меньшие значения радиальной скорости роста, но и перекрывание у штаммов N27-25 и N13-3 размеров колоний зонами деструкции целлюлозы.

Оценка связи между целлюлазной активностью и средней скоростью радиального роста стрептомицетов с помощью корреляционного анализа выявила слабую, но достоверную обратную зависимость ($r = -0.22$, $p \leq 0.05$) между этими показателями. Возможно, у некоторых стрептомицетов недостаточная активность целлюлазного комплекса отчасти компенсируется скоростью их расселения в пространстве для поиска более доступных источников углерода.

Определение целлюлазной активности по количеству редуцирующих сахаров с ДНС-реагентом проводили при выращивании стрептомицетов в жидкой среде с соломой в качестве единственного источника углерода. Результаты позволили ранжировать исследуемые штаммы в порядке возрастания активности фермента: *S. hygrosopicus* N27-25 (63.00 ± 9.45 Ед/мл) < *S. griseoaurantiacus* Mb4-2 (124.38 ± 18.67 Ед/мл) < "*S. ryensis*" N13-3 (149.38 ± 10.52 Ед/мл) < *S. thermocarboxydus* T1-3 (171.25 ± 8.13 Ед/мл). Продолжительность ферментации соломы до момента достижения максимальной активности целлюлазы у этих штаммов составила 96, 48, 24 и 24 ч соответственно. Особый интерес представляет *S. thermocarboxydus* T1-3, продемонстрировавший максимальную активность

уже через 24 ч ферментации соломы. Хотя сравнение наших результатов с данными, известными из литературы, затруднено из-за различий в условиях определения активности и синтеза фермента, все же отметим, что исследуемые изоляты обладают достаточно высокой специфической ферментативной активностью по сравнению с другими целлюлолитическими представителями рода *Streptomyces*. Например, в предыдущих исследованиях при росте штамма *Streptomyces* sp. F262 на среде с измельченной пшеничной соломой (1.2%) и добавлением дрожжевого экстракта максимальная активность эндоглюконазы наблюдалась только после 7-дневной ферментации и составила 1.73 Ед/мл (Tuncer et al., 2004). В другой работе оценка способности *S. thermocarboxydus* использовать для синтеза ферментов восемь различных видов агроотходов в погруженной культуре выявила максимальную активность целлюлазы только через 72 и 96 ч ферментации при росте штамма на кожуре граната (1.07 Ед/мл) и апельсина (5.53 Ед/мл) соответственно (Shrestha et al., 2023). Эндоглюконазная активность штамма *Streptomyces* sp. STCH565-A в жидкой среде с КМЦ и добавлением глюкозы изменялась от 0.15 до 0.27 Ед/мл, начиная с 4-х сут роста (Escudero-Agudelo et al., 2023). Результаты, сопоставимые по величине активности фермента с нашими, были получены для штамма *S. diastaticus* PA-01 на 4-е сут ферментации кукурузного жмыха (154.45 Ед/мл) и на 5-е сут ферментации жома сахарного тростника (148.11 Ед/мл). Но максимальную активность (1180.3 Ед/мл) этот штамм проявил после 5-сут ферментации на среде и в условиях, оптимизированных с помощью метода поверхности отклика в многофакторном эксперименте (Bisro et al., 2018). Все другие приведенные значения ферментативной активности получены авторами в условиях без проведения процедуры их оптимизации.

Таким образом, наилучшим кандидатом для использования в качестве деструктора растительных отходов стал штамм *S. thermocarboxydus* T1-3, отличающийся наиболее активным ферментативным гидролизом всех модельных источников целлюлозы, высокой радиальной скоростью роста на большинстве субстратов, максимальной активностью целлюлазы, достигаемой при ферментации соломы за рекордно короткое время.

Использование несложных, но эффективных методик по обнаружению и оценке целлюлазной активности у новых штаммов актиномицетов позволит шире использовать их потенциал для нужд биотехнологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках государственного задания ФГБНУ “Федеральный аграрный научный центр

Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого” (тема № FNWE-2022-0005).

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

- Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. М.: Рипол Классик, 1973. 240 с.
- Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешикова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983. 245 с.
- Громова Н.Ю. Теоретические аспекты биоконверсии целлюлозосодержащих отходов // Известия Международной академии аграрного образования. 2012. Т. 1. С. 8–12.
- Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Динариева Т.Ю. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
- Рожкова А.М., Кислицин В.Ю. Редактирование геномов мицелиальных грибов: применение системы CRISPR/Cas // Успехи биологической химии. 2021. Т. 61. С. 253–294.
- Филиппова С.Н., Виноградова К.А. Программируемая клеточная смерть как одна из стадий дифференцировки стрептомицетов // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 421–438.
<https://doi.org/10.7868/S0026365617040073>
- Filippova S.N., Vinogradova K.A. Programmed cell death as one of the stages of streptomycete differentiation // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 439–454.
- Bispo A.S.R., Andrade J.P., Souza D.T., Teles Z.N.S., Nascimento R.P. Utilization of agroindustrial by-products as substrate in endoglucanase production by *Streptomyces diastaticus* PA-01 under submerged fermentation // Braz. J. Chem. Eng. 2018. V. 35. P. 429–440.
<https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160415>
- Book A.J., Lewin G.R., McDonald B.R., Takasuka T.E., Wendt-Pienkowski E., Doering D.T., Suh S., Raffa K.F., Fox B.G., Currie C.R. Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinate gene expression // PLoS Biol. 2016. V. 14. № 6. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002475>
- Cecchini D.A., Pepe O., Pennacchio A., Fagnano M., Faraco V. Directed evolution of the bacterial

- endo- β -1,4-glucanase from *Streptomyces* sp. G12 towards improved catalysts for lignocellulose conversion // *Amb. Express*. 2018. V. 8. Art. 74. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0602-7>
- Celaya-Herrera S., Casados-Vázquez L. E., Valdez-Vázquez I., Barona-Gómez F., Bideshi D.K., Barboza-Corona J. E. A cellulolytic *Streptomyces* sp. isolated from a highly oligotrophic niche shows potential for hydrolyzing agricultural wastes // *Bioenerg. Res*. 2021. V. 14. P. 333–343. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10174-z>
- Escudero-Agudelo J., Martínez-Villalobos J., Arocha-Garza H., Galán-Wong L.J., Avilés-Arnaut H., De la Torre-Zavala S. Systematic bioprospection for cellulolytic actinomycetes in the Chihuahuan Desert: isolation and enzymatic profiling // *Peer J*. 2023. V. 11. Art. e16119. <https://doi.org/10.7717/peerj.16119>
- Franco-Cirigliano M. N., de Carvalho-Rezende R., Gravina-Oliveira M. P., Pereira P.H. F., Do Nascimento R.P., Bon E.P. D. S., Macrae A., Coelho R.R. R. *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates // *Biomed. Res. Int*. 2013. V. 2013. Art. 584207. <https://doi.org/10.1155/2013/584207>
- Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // *Pure & Appl. Chem*. 1987. V. 59. P. 257–268.
- Gupta P., Samant K., Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential // *Int. J. Microbiol*. 2012. V. 2012. Art. 578925. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>
- Jayasekara S., Ratnayake R. Microbial cellulases: an overview and applications. *Cellulose*. IntechOpen. 2019. 130 p. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation; Norwich, UK: 2000. 620 p.
- Komaki H. Recent progress of reclassification of the genus *Streptomyces* // *Microorganisms*. 2023. V. 11. Art. 831. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040831>
- Kormanec J., Režuchová B., Homerová D., Čsolleiová D., Sevciková B., Nováková R., Fecková L. Recent achievements in the generation of stable genome alterations/mutations in species of the genus *Streptomyces* // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2019. V. 103. P. 5463–5482. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09901-0>
- López-Mondéjar R., Zühlke D., Becher D., Riedel K., Baldrian P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems // *Sci. Rep*. 2016. V. 6. Art. 25279. <https://doi.org/10.1038/srep25279>
- Marushima K., Ohnishi Y., Horinouchi S. CebR as a master regulator for cellulose/cellooligosaccharide catabolism affects morphological development in *Streptomyces griseus* // *J. Bacteriol*. 2009. V. 191. P. 5930–5940. <https://doi.org/10.1128/jb.00703-09>
- Rajagopal G., Kannan S. Systematic characterization of potential cellulolytic marine actinobacteria *Actinoalloteichus* sp. MHA15 // *Biotechnol. Rep*. 2017. V. 13. P. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.003>
- Ryan M.C., Stucky M., Wakefield C., Melott J.M., Akbani R., Weinstein J.N., Broom B.M. Interactive Clustered Heat Map Builder: An easy web-based tool for creating sophisticated clustered heat maps // *F1000Research*. 2019. V. 8. P. 1–17. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20590.2>
- Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983. 545 p. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(83\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90068-7)
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins // *Phytochemistry*. 1991. V. 30. P. 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Shrestha S., Khatiwada J.R., Kognou A.L.M., Chio C., Qin W. Biomass-degrading enzyme(s) production and biomass degradation by a novel *Streptomyces thermocarboxydus* // *Curr. Microbiol*. 2023. V. 80. Art. 71. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03174-z>
- Sievers F., Higgins D.G. Clustal omega // *Curr. Prot. Bioinform*. 2014. V. 48. P. 3.13.1–3.13.16. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 // *Mol. Biol. Evol*. 2021. V. 38. P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Waheeb M.S., Elkhatib W.F., Yassien M.A., Hassouna N.A. Production of cellulase by soil isolated *Streptomyces* sp. // *Arch. Pharm. Sci. ASU*. 2021. V. 5. P. 225–233.
- Wood P.J., Erfle J.D., Teather R.M. Use of complex formation between Congo Red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharide hydrolases // *Methods Enzymol*. 1988. V. 160. P. 59–74.
- Ye S., Enghiad B., Zhao H., Takano E. Fine-tuning the regulation of Cas9 expression levels for efficient CRISPR-Cas9 mediated recombination in *Streptomyces* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2020. V. 47. P. 413–423.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Cellulolytic Potential of New Strains of Soil Streptomyces**N. A. Bokov^{1, 2, *}, A.V. Bakulina¹, E. A. Bessolitsyna¹, I. G. Shirokikh^{1, 2}**¹*Federal Agricultural Scientific Center of the North-East named N.V.Rudnitsky, Kirov, 610007, Russia*²*Vyatka State University, Kirov, 610000, Russia*^{*}*e-mail: nikita-bokov@mail.ru*

Abstract. In order to obtain new strains of cellulolytic microorganisms for use in technologies for processing plant and other cellulose-containing waste, four new bacterial strains of the genus *Streptomyces* have been isolated from various sources. In tests with Congo red, the isolates' ability to degrade carboxymethylcellulose (CMC), microcrystalline cellulose (MCC) and natural cellulose-containing materials – straw, birch and oak sawdust was determined. The activity of cellulase was quantified during fermentation of straw. On media with each of the model carbon sources, the radial growth rate was determined as an indicator characterizing the ability of isolates to colonize various substrates. The conjugate characteristic of cellulase activity and radial growth rate on substrates of various natures made it possible to assess the prospects for further use of the studied strains as destructors of cellulose-containing waste. The strain *Streptomyces thermocarboxydus* T1-3 was the leader in the studied sample, characterized by the most active enzymatic hydrolysis of all model cellulose sources, a high radial growth rate (up to 87 ± 3 microns/hour), and the achievement of maximum cellulase activity (171.25 ± 8.13 U/ml) during straw fermentation within 24 hours.

Keywords: cellulose, *Streptomyces*, destruction, endoxyloglucanases, substrate colonization, radial growth rate

УДК 57.083.13:579.66+579.222

ВЛИЯНИЕ СДВИГА pH НА ОБОГАЩЕННОЕ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ СООБЩЕСТВО В БИОРЕАКТОРЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. А. Г. Дорофеев^{a, *}, А. В. Пелевина^a, Е. В. Груздев^b,
А. В. Марданов^b, Н. В. Пименов^a

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

^bИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

*e-mail: dorofeevag@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2024 г.

После доработки 30.04.2024 г.

Принята к публикации 02.05.2024 г.

В биореакторе последовательно-периодического действия прослежены изменения структуры и свойств обогащенного фосфат-аккумуляирующими микроорганизмами (ФАО) сообщества после сдвига pH в слабокислую область (pH 6.7–7.1). Доля *Candidatus Accumulibacter* снизилась с 43.6 до 13.9%, тогда как возросло количество потенциальных ФАО, относящихся к *Dechloromonas* и *Thauera*. При этом доля суммарного количества ФАО изменилась незначительно и составила 40–43%. Доля основных конкурентов ФАО – гликоген-аккумуляирующих микроорганизмов (ГАО) в течение эксперимента оставалась незначительной: фрагменты гена 16S рРНК *Competibacter* до и после изменения pH составили 2–4%. Снижение pH привело к падению количества выделяемых в анаэробной фазе фосфатов, однако количество фосфора в биомассе и его удаление оставалось высоким – 15–17 и 92–94% соответственно.

Ключевые слова: биологическое удаление фосфора, фосфат-аккумуляирующие бактерии (ФАО), очистка воды, *Ca. Accumulibacter*, *Dechloromonas*, *Thauera*

DOI: 10.31857/S0026365624050124

Жизнедеятельность осуществляющих биологическое удаление фосфора фосфат-аккумуляирующих организмов (ФАО) зависит от многих факторов: температуры, pH, состава и концентрации органических и неорганических субстратов, концентрации кислорода, режима работы биореактора (Zhao et al., 2022). Один из важнейших факторов, определяющих эффективность биологических процессов очистки сточных вод от биогенных элементов, – кислотность среды. В биореакторах с активным илом значение pH лежит, как правило, в пределах 6–9. В этом диапазоне влияние кислотности на эффективность удаления органического вещества и денитрификацию не критично, тогда как ФАО и нитрифицирующие микроорганизмы более чувствительны к варьированию кислотности (Metcalf, Eddy, 2018). Следует отметить, что при высоких концентрациях аммонийных соединений и нитритов влияние pH может быть связано не с внеклеточной концентрацией протонов, а с ингибированием биологических процессов аммиаком

или недиссоциированной формы азотистой кислоты, доля которых возрастает, соответственно, с повышением или понижением значения pH (Liu et al., 2019; Andreadakis et al., 2021).

В ряде работ показано, что биологическое удаление фосфора (P) в интервале pH 6.5–8.6 возрастает с увеличением pH, и оптимум лежит, как правило, в слабощелочных условиях (pH 7.1–8.0) (Schuler, Jenkins, 2002; Pijuan et al., 2004; Zhang et al., 2005; Chen, Gu, 2006). Считается, что основная причина снижения фосфат-аккумуляирующей способности консорциума – результат конкуренции за субстрат между гликоген-аккумуляирующими организмами (ГАО) и ФАО, и при снижении pH преимущество получают ГАО. Эти микроорганизмы имеют сходный с ФАО циклический тип метаболизма, но не обладают способностью к циклированию фосфатов при смене анаэробно/аэробных условий (Serafim et al., 2002; Oehmen et al., 2005). В отличие от ФАО, ГАО в анаэробный период цикла поглощают органическое вещество не за счет энергии

гидролиза полифосфатов, а за счет использования внутриклеточного гликогена. В работах (Filipe et al., 2001a, 2001b) было показано, что в анаэробной фазе SBR-цикла с повышением pH преимущество получают ФАО за счет поддержания высокой скорости потребления ацетата, сопряженным с гидролизом полифосфатов. В аэробной фазе при снижении pH до 6.5 активность ФАО (прирост биомассы, расход полигидроксикарбоновых кислот) падает, тогда как у ГАО активность в этом диапазоне практически неизменна. Увеличение преимущества ФАО при повышении pH установлено на примере активного ила и культур, обогащенных такими представителями ФАО как *Ca. Accumulibacter* и *Tetrasphaera* (Nguyen et al., 2023), причем эта закономерность проявлялась при использовании не только ацетата, но и других субстратов, используемых ФАО (Oehmen et al., 2005; Chen, Gu., 2006; Zhang et al., 2007).

Для биологического удаления фосфора наиболее нестабильной оказалась область значений pH 6.5–7.0. Даже при незначительном сдвиге pH в эту область наблюдались радикальные изменения состава сообщества и падение эффективности удаления фосфора (Zhang et al., 2005; Tu, Schuler, 2013). Несмотря на то, что слабокислые условия характерны для биореакторов очистки сточных вод, функциональные свойства и структура сообщества ФАО в этой области остаются малоизученными.

Учитывая, что pH может иметь критическое значение для существования в микробном сообществе ФАО и эффективности удаления фосфора, в настоящей работе мы исследовали реакцию обогащенной ФАО культуры на сдвиг pH из благоприятной в неблагоприятную для ФАО слабокислую область. Исходной культурой было обогащенное *Ca. Accumulibacter* сообщество, сформировавшееся в лабораторном реакторе последовательно-периодического действия (SBR – Sequencing Batch Reactor) в течение длительного времени культивирования (более 2 лет) в слабощелочных условиях.

Выращивание микробного сообщества проводили в SBR с рабочим объемом 2 л в циклических условиях, способствующих развитию ФАО, при температуре $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Один SBR-цикл продолжительностью 6 ч включал последовательные фазы: подача свежей среды, анаэробная и аэробная фазы, отстаивание и вывод избыточной (приросшей) биомассы. Время удержания биомассы составило 17.5 сут. Экзогенным источником углерода и энергии служил ацетат (Ац). Отношение ацетат/фосфор в исходной среде составляло 12 мг Ац/мг Р. Для регулирования pH в исходную среду добавляли 0.1 н HCl. В пробах из биореактора определяли вес сухой биомассы (СБ), концентрации растворенных фосфатов и ацетата. Основные характеристики биореактора, состав среды и методы исследования детально описаны нами ранее (Pelevina et al., 2023). Таксономический состав сообщества определяли

методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, описанным ранее (Пелевина и соавт., 2021).

Содержание фосфора в биомассе рассчитывали по формуле

$$P\% = 100 \times (P_{in} - P_{out}) \times SRT / (СБ \times HRT),$$

где P_{in} и P_{out} – концентрации $P-PO_4$ в подающейся и отводящейся среде (мг/л), SRT – время удержания биомассы (ч), HRT – гидравлическое время пребывания в биореакторе (ч).

В исходной культуре до изменения кислотности в течение SBR-цикла pH циклически изменялся от близкого к нейтральному (pH 7.0–7.1) в анаэробной фазе до 7.5–8.3 в аэробной фазе, что соответствовало типичной динамике pH, характерной для обогащенных ФАО культур. Известно, что без pH-корректировки изменение pH в биореакторе связано с потреблением ацетата, а также с циклом поглощения/выделения фосфатов и выбросом углекислоты (Serralta et al., 2006). В этот период культура проявляла типичный ФАО-фенотип: в анаэробную фазу весь ацетат потреблялся, что сопровождалось выходом фосфатов в среду, в аэробную фазу фосфаты почти полностью поглощались (рис. 1). Отношение выделенного в анаэробной фазе фосфора к потребленному ацетату (Р/Ац) составило 1.1–1.6 Р-моль/Ац-моль.

После изменения кислотности значения pH в анаэробной и аэробной фазах снизились до 6.6–6.8 и 6.9–7.4 соответственно. Ацетат в анаэробной фазе полностью потреблялся, однако количество выделенного фосфата снизилось вдвое, и Р/Ац понизилось до 0.5–0.6 Р-моль/Ац-моль. Этот факт соответствует существующим представлениям о снижении расхода энергии на транспорт ацетата при более низких pH и, соответственно, снижении гидролиза внутриклеточных полифосфатов и выбросу ортофосфата из клеток ФАО (Filipe et al., 2001c). Вместе с тем содержание фосфора в биомассе в конце аэробной фазы оставалась высоким (15–16%), и эффективность удаления фосфатов в течение эксперимента существенно не изменилась, составив 92–94%.

После сдвига pH произошли изменения таксономического состава сообщества (рис. 2).

Доля *Ca. Accumulibacter* в течение 58 сут снизилась с 43.6 до 13.9 %, тогда как доли двух других таксонов, включающих представителей ФАО, – *Dechloromonas* и *Thauera* возросли с 2.24 до 11.83 и с 0.82 до 17.58% соответственно. Замещения ФАО типичными представителями группы ГАО мы не наблюдали: в течение эксперимента доля фрагментов гена 16S рРНК основного представителя ГАО – *Ca. Competibacter* была незначительной и составляла 1–4%. Подобное частичное замещение *Ca. Accumulibacter* представителями *Dechloromonas*

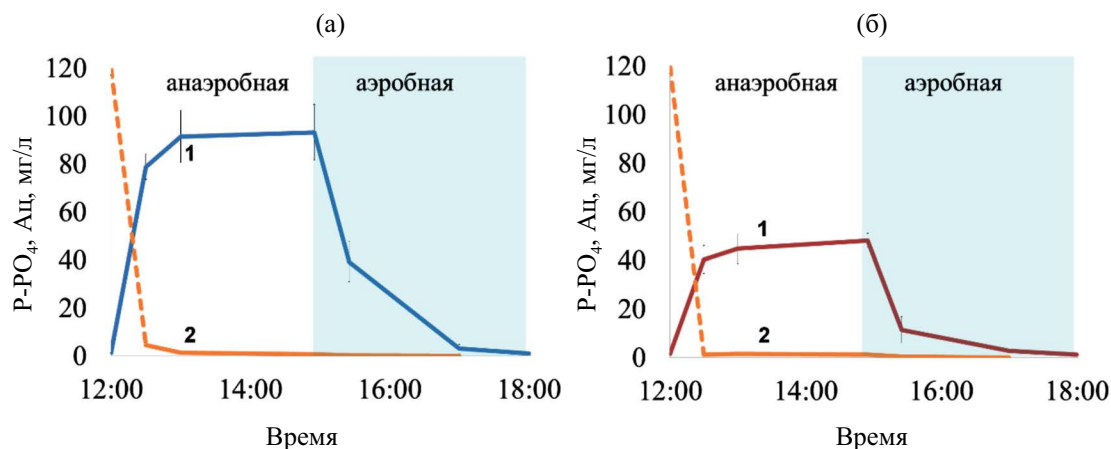


Рис. 1. Динамика концентрации фосфатов (1) и ацетата (2) в биореакторе в течение одного SBR-цикла: а – до снижения pH; б – через 39–58 сут после снижения pH. Концентрация ацетата в первой точке (12:00) рассчитана с использованием концентрации ацетата в подающей среде.

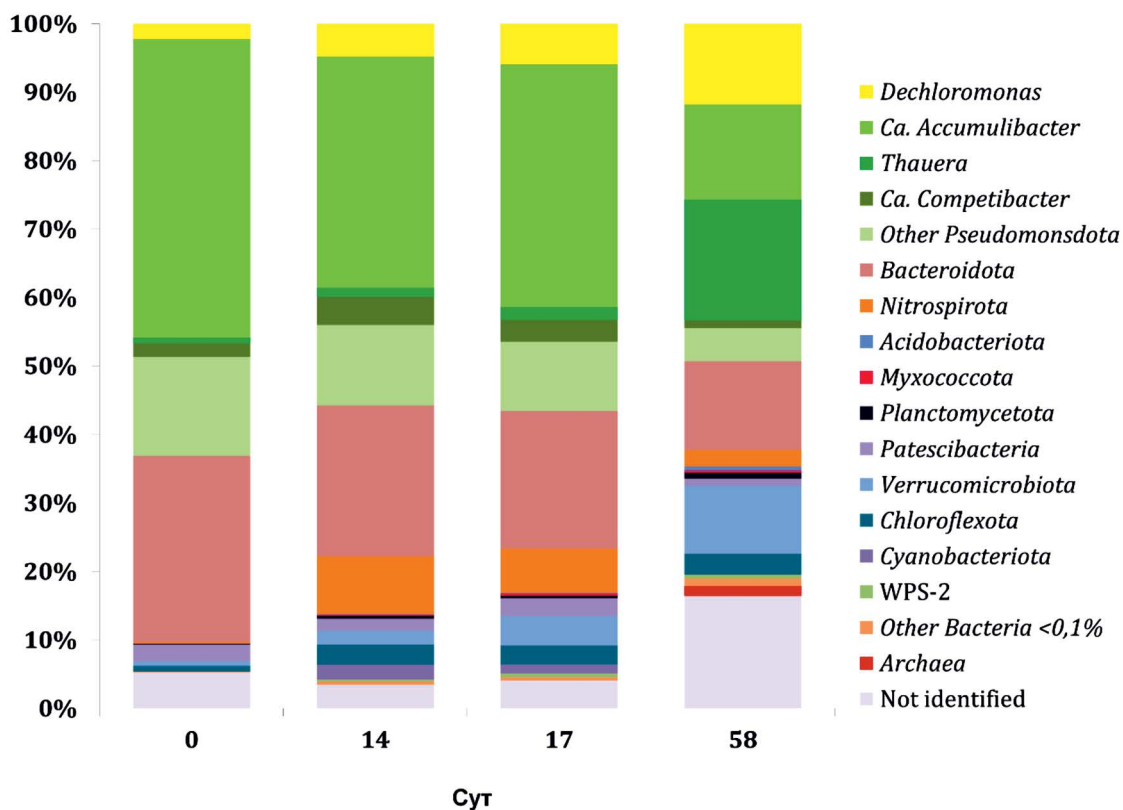


Рис. 2. Изменение таксономического состава сообщества после смены pH.

в слабокислой области отмечено в работе (Tu, Schuler, 2013): выращивание ФАО-сообщества при pH 6.4–7.0 (но при обязательном условии низкой концентрации ацетата в биореакторе) привело к снижению доли ОТЕ *Ca. Accumulibacter* с 80 до 60%, тогда как доля *Dechloromonas* увеличилась

до 16%. При этом в сумме представители этих таксонов составили 76–80%, и сохранился ФАО-фенотип культуры.

Dechloromonas и *Thauera* обычно относят к денитрифицирующим ФАО, способным использовать в качестве конечных акцепторов электронов

как кислород, так и нитраты и нитриты (Wang, He, 2020; Petriglieri et al., 2021). Однако протекание значимой для материального баланса денитрификации в наших экспериментах маловероятно: концентрация нитратов в подающейся в биореактор среде не превышала 2 мг N-NO₃/л, для ингибирования нитрификации (как основного продуцента нитратов и нитритов) мы добавляли в среду тиомочевину, а концентрация кислорода на протяжении 80% аэробного периода превышала 3 мг O₂/л (рис. 3).

Мы полагаем, что *Dechloromonas* и *Thauera* проявляли типичный ФАО-фенотип, используя кислород в качестве акцептора электронов, что обеспечило сохранение высокой эффективности удаления фосфора после сдвига pH. Участие *Thauera* в анаэробно/аэробном удалении фосфора подтверждается в работах Wang and He (2020) и Ren et al. (2021), установивших, что выделенные ими штаммы *Thauera* были способны к ФАО-фенотипу, используя в качестве акцептора электронов кислород. На участие *Thauera* в циклировании фосфатов косвенно указывает и значительное снижение отношения Р/Ац в анаэробной фазе SBR-цикла после сдвига pH. Ожидаемое, в соответствии с существующими представлениями о “классическом” метаболизме ФАО, расчетное падение отношения Р/Ац, не должно превысить 15–25% (Filipe et al., 2001), тогда как реальное снизилось вдвое. Это можно объяснить “разбавлением” *Ca. Accumulibacter* представителями *Thauera*, имеющими более низкое отношение Р/Ац (Ren et al., 2021). Таким образом, в наших экспериментах после снижения pH произошло частичное замещение *Ca. Accumulibacter* другими представителями ФАО – *Dechloromonas* и *Thauera*, при этом суммарная доля ФАО в сообществе изменилась незначительно и составляла 40–43%.

Результаты нашей работы указывают на то, что в слабокислых условиях способные к денитри-

фикации представители ФАО *Dechloromonas* и *Thauera* при использовании в качестве акцептора электронов кислорода становятся более конкурентоспособными по отношению к *Ca. Accumulibacter* и ГАО.

Наши результаты расходятся с результатами ряда работ, выполненных в этом направлении. Было показано, что снижение значения pH с 7 до 6.5 в течение 14 сут привело к потере ФАО-фенотипа и падению способности накапливать и удалять фосфор с 99.9 до 17% (Zhang et al., 2005). При этом авторы отметили кардинальную смену состава сообщества. В работе (Fukushima et al., 2010) снижение уровня pH в кислую область привело к снижению популяции *Ca. Accumulibacter* и падению фосфат-аккумулирующей способности культуры. Эти расхождения могут быть связаны с различиями в условиях проведения экспериментов и в составе изучаемых микробных сообществ:

(1) в экспериментах (Zhang et al., 2005) и (Oehmen et al., 2005) на протяжении SBR-цикла pH поддерживался на постоянном уровне, тогда как в нашей работе в течение SBR-цикла pH не контролировался, и диапазон варьирования pH составил в среднем 6.7–7.1 единиц. В связи с этим следует отметить публикации, свидетельствующие о том, что для ФАО оптимальными являются условия с переменным (неконтролируемым) pH, тогда как при фиксированном на протяжении SBR-цикла pH преимущества получают ГАО (Jeon et al., 2001; Serafim, 2002);

(2) результаты ряда работ указывают на то, что для доминирования ФАО pH в аэробный период должен превышать 7.0 (Filipe et al., 2001a). Возможно, что значение pH 6.5 – критическая точка для анаэробного периода, ниже которой происходит быстрая смена ФАО-сообщества на ГАО-сообщество, тогда как в нашей работе pH 6.5 не достигался.

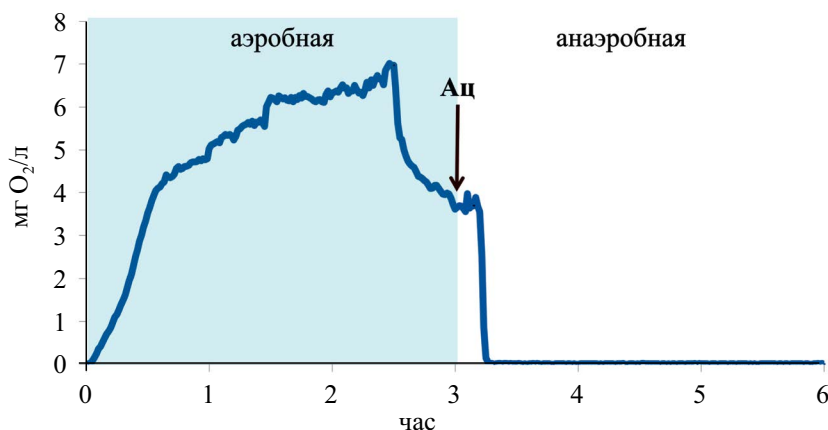


Рис. 3. Динамика концентрации растворенного O₂ в течение одного SBR-цикла. 0–3 ч – аэробный период; 3–6 ч – анаэробный период. Стрелкой отмечено начало подачи субстрата (ацетата).

Таким образом, даже незначительный сдвиг pH в слабокислую область в течение 1–2 мес. приводит к существенному изменению состава обогащенного ФАО микробного сообщества, однако доля ФАО (по крайней мере, при pH выше 6.5) в значительной мере сохраняется, и замещения ФАО конкурентной группой ГАО не происходит. При этом содержание фосфора в биомассе и эффективность удаления фосфора остаются на постоянном высоком уровне.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00019) и Министерства 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

- Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачев В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфатов в циклическом аэробно-анаэробном культивировании // *Микробиология*. 2021. Т. 90. С. 76–89.
- Pelevina A.V., Berestovskaya Y.Y., Grachev V.A., Dorofeeva I.K., Sorokin V.V., Dorofeev A.G., Kallistova A.Y., Nikolaev Y.A., Pimenov N.V., Kotlyarov R.Y., Beletskii A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V., Mardanov A.V. A microbial consortium removing phosphates under conditions of cyclic aerobic-anaerobic cultivation // *Microbiology (Moscow)*. 2021. V. 90. P. 66–77.
- Andreadakis D., Noutsopoulos C., Fragkiskatos G., Mamais D., Misirli T., Argyropoulou K., Themeli E., Malamis S. Inhibition of free nitrous acid and free ammonia on polyphosphate accumulating organisms: Evidence of insufficient phosphorus removal through nitrification-denitrification // *J. Environ. Manage.* 2021. V. 297. Art. 113390.
- Chen Y., Gu G. Effect of changes of pH on the anaerobic/aerobic transformations of biological phosphorus removal in wastewater fed with a mixture of propionic and acetic acids // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006. V. 81. P. 1021–1028.
- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady Jr. C.P.L. Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms // *Water Environ. Res.* 2001a. V. 73. P. 213–222.
- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady Jr. C.P.L. pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms // *Water Environ. Res.* 2001b. V. 73. P. 223–232.
- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady Jr. C.P.L. Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs // *Biotechnol. Bioeng.* 2001c. V. 76. P. 32–43.
- Fukushima T., Onuki M., Satoh H., Mino T. Effect of pH reduction on polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal processes // *Water Sci. Technol.* 2010. V. 62. P. 1432–1439.
- Liu Y., Ngo H.H., Guo W., Peng L., Wang D., Ni B. The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: a review // *Environ. Int.* 2019. V. 123. P. 10–19.
- Metcalf & Eddy Inc., Tchobanoglous G., Stensel H.D., Tsuchihashi R., Burton F.L., Abu-Orf M., Bowden G., Burton F.L., Pfarr W. Wastewater engineering: treatment and resource recovery. McGraw-Hill, New York, 2014. 5th edn. 2018 p.
- Nguyen P.Y., Marques R., Wang H., Reis M.A., Carvalho G., Oehmen A. The impact of pH on the anaerobic and aerobic metabolism of *Tetrasphaera*-enriched polyphosphate accumulating organisms // *Water. Res.* X. 2023. V. 19. Art. 100177.
- Oehmen A., Teresa Vives M., Lu H., Yuan Z., Keller J. The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms // *Water. Res.* 2005. V. 39. P. 3727–3737.
- Pelevina A., Gruzdev E., Berestovskaya Y., Dorofeev A., Nikolaev Y., Kallistova A., Beletsky A., Ravin N., Pimenov N., Mardanov A. New insight into the granule formation in the reactor for enhanced biological phosphorus removal // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Art. 1297694.
- Petriglieri F., Singleton C., Peces M., Petersen J.F., Nierychlo M., Nielsen P.H. “*Candidatus* Dechloromonas phosphorotropha” and “*Ca. D. phosphorivorans*”, novel polyphosphate accumulating organisms abundant in wastewater treatment systems // *ISME J.* 2021. V. 15. P. 3605–3614.
- Pijuan M., Saunders A., Guisasola A., Baeza J., Casas C., Blackall L. Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 5. P. 56–67.
- Ren T., Chi Y., Wang Y., Shi X., Jin X., Jin P. Diversified metabolism makes novel *Thauera* strain highly competitive in low carbon wastewater treatment // *Water. Res.* 2021. V. 206. Art. 117742.

- Schuler A.J., Jenkins D. Effects of pH on enhanced biological phosphorus removal metabolisms // Water Sci. Technol. 2002. V. 46. P. 171–178.
- Serafim L.S., Lemos P.C., Reis M.A.M. Effect of pH control on EBPR stability and efficiency // Water Sci. Technol. 2002. V. 46. P. 179–184.
- Serralia J., Ferrer J., Borrás L., Seco A. Effect of pH on biological phosphorus uptake // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 95. P. 875–882.
- Tu Y., Schuler A.J. Low acetate concentrations favor polyphosphate-accumulating organisms over glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal from wastewater // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. P. 3816–3824.
- Wang Q., He J. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5 // Water Res. 2020. V. 185. Art. 116300.
- Jeon C.O., Lee D.S., Lee M.W., Park J.M. Enhanced biological phosphorus removal in an anaerobic–aerobic sequencing batch reactor: effect of pH // Water Environ. Res. 2001. V. 73. P. 301–306.
- Zhang T., Liu Y., Fang H. Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process // Biotechnol. Bioeng. 2005. V. 92. P. 173–182.
- Zhang C., Chen Y., Liu Y. The long-term effect of initial pH control on the enrichment culture of phosphorus- and glycogen-accumulating organisms with a mixture of propionic and acetic acids as carbon sources // Chemosphere. 2007. V. 69. P. 1713–1721.
- Zhao W., Bi X., Peng Y., Bai M. Research advances of the phosphorus-accumulating organisms of *Candidatus Accumulibacter*, *Dechloromonas* and *Tetrasphaera*: metabolic mechanisms, applications and influencing factors // Chemosphere. 2022. V. 307. Art. 135675.

SHORT COMMUNICATIONS

Influence of pH Shift on the Community Enriched in Phosphate-Accumulating Microorganisms in a Sequential-Periodic Action Bioreactor

A. G. Dorofeev^{1, *}, A. V. Pelevina¹, E. V. Gruzdev², A. V. Mardanov², N. V. Pimenov¹

¹ Winogradsky Institute of Microbiology, FRC Fundamentals of Biotechnology RAS, Moscow, 119071, Russia

² Skryabin Institute of Bioengineering, FRC Fundamentals of Biotechnology RAS, Moscow, 119071, Russia
*e-mail: dorofeevag@mail.ru

Abstract. In a sequentially periodic bioreactor, changes in the structure and properties of a community enriched with phosphate-accumulating microorganisms (PAO) after a shift in pH to more acidic values (pH 6.7–7.1) were traced. The proportion of *Candidatus Accumulibacter* decreased from 43.6 to 13.9%, while the number of potential FAOs belonging to *Dechloromonas* and *Thauera* increased. At the same time, the share of the total amount of FAO changed slightly and amounted to 40–43%. The share of the main competitors of FAO – glycogen-accumulating microorganisms (GAM) during the experiment remained insignificant: *Competibacter* 16S rRNA gene fragments before and after pH changes amounted to 2–4%. A decrease in pH led to a drop in the amount of phosphates released in the anaerobic phase, but the amount of phosphorus in the biomass and its removal remained high – 15–17 and 92–94%, respectively.

Keywords: biological phosphorus removal, phosphate accumulating bacteria (PAB), water treatment, *Ca. Accumulibacter*, *Dechloromonas*, *Thauera*

УДК 579.258:574.24+579.222

АЛКАН МОНООКСИГЕНАЗА ALKB1 ШТАММА *RHODOCOCUS QINGSHENGII* X5 НЕ ОБЯЗАТЕЛЬНА ДЛЯ РОСТА НА АЛКАНАХ

© 2024 г. К. В. Петриков^{а, *}, А. А. Режепова^а, И. Ю. Позднякова-Филатова^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН –
особое подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290, Россия

*e-mail: petrikov_kv@pbcras.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 22.12.2023 г.

Принята к опубликованию 29.01.2024 г.

Изучение монооксигеназных систем, отвечающих за первичное окисление алканов, необходимо для понимания бактериального метаболизма этих углеводов. Выполненный анализ генома штамма *Rhodococcus qingshengii* X5 показал большое разнообразие генов, кодирующих соответствующие ферменты, в том числе 5 гомологов алкан монооксигеназ AlkB-типа. Был сконструирован штамм, дефектный по гену *alkB1*. Сравнение способности штамма дикого типа и мутантного штамма к росту на алканах с различной длиной цепи при двух температурах (6 и 28°C) показало сохранение базового фенотипа: хотя рост мутанта при низкой температуре был ослаблен, спектр окисляемых субстратов не изменился. Это говорит о наличии других функционирующих монооксигеназных систем, активных при разных температурах в отношении широкого спектра алканов.

Ключевые слова: алкан монооксигеназы, алкан гидроксилазы, родококки, нефтедеструкторы, психротрофы, биодegradация

DOI: 10.31857/S0026365624050132

Микроорганизмы, способные к использованию углеводов в качестве единственного ростового субстрата, достаточно широко распространены в природе (Long et al., 2017; Tomasino et al., 2021). Бактериальная деградация углеводов не только вносит существенный вклад в естественный цикл углерода, но и находит практическое применение в технологиях биоремедиации, используемых при ликвидации последствий антропогенного загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами (Ławniczak et al., 2020). Типичным классом нефтяных углеводов являются алканы, поступление которых в окружающую среду обусловлено не только добычей и переработкой полезных ископаемых, но и разнообразными естественными источниками (Wiesenberg et al., 2009; Schulz et al., 2012).

Ключевыми ферментами бактериального метаболизма алканов являются алкан монооксигеназы, катализирующие реакцию гидроксилирования субстрата (Moreno, Rojo, 2017). Известно несколько типов этих ферментов, среди которых к наиболее распространенным у углеводородокисляющих

микроорганизмов относят негемовые мембранные алкан монооксигеназы AlkB-типа, относящиеся к суперсемейству десатураз жирных кислот (Pérez-de-Mora et al., 2011; Smith et al., 2013).

Организация соответствующих генов и путь метаболизма n-алканов в аэробных условиях были достаточно подробно описаны на примере OCT-плазмиды штамма *Pseudomonas putida* TF4-1L (GPo1) (van Beilen, Funhoff, 2007). Однако следует отметить, что к настоящему времени значительную долю исследований составляют работы практического характера. Многочисленные алкан-окисляющие системы других микроорганизмов, равно как и важные аспекты их функционирования, например, при адаптации к экстремальным условиям окружающей среды, изучены лишь поверхностно. Понимание особенностей метаболизма алканов важно как с точки зрения получения фундаментальных знаний, так и для расширения возможностей биотехнологического использования бактерий-нефтедеструкторов (Müller et al., 2016; Tsai et al., 2017).

К хорошо известным углеводородокисляющим микроорганизмам относятся представители рода *Rhodococcus* (Kim et al., 2018). Одной из особенностей бактерий этого рода является наличие в геноме до 5 копий гомологичных генов, кодирующих алкан монооксигеназы AlkB-типа (van Beilen et al., 2002). Роль такого разнообразия, особенности функционирования конкретных генетических и ферментных систем остаются до конца не выясненными.

Целью настоящей работы было определение роли гена *alkB1* в метаболизме алканов у штамма *Rhodococcus qingshengii* X5 при умеренной и низкой положительной температурах.

Штамм *Rhodococcus qingshengii* (*erythropolis*) X5 (ВКМ Ас-2532Д) получен из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН. Полные аннотированные геномные последовательности *R. qingshengii* X5, включающие кольцевую хромосому и линейную плазмиду, депонированы в GenBank (номера CP044284 и CP044283 соответственно) (Delegan et al., 2019).

Для выращивания культур использовали лизогенный бульон (среда LB) (Sambrook, Russell, 2001), плотную среду получали добавлением 2% вес. агара. При необходимости вносили добавки, как указано далее.

Оценку способности изучаемых штаммов к росту на различных алканах выполняли визуально. Культивирование проводили на модифицированной минеральной среде Эванса (среда Е) (Petrikov et al., 2013) в течение 4 сут при 27°C и 25 сут при 6°C. В качестве единственного источника углерода и энергии добавляли алканы в количестве 2% об. для жидких (н-декан, н-ундекан, н-додекан, н-гексадекан, пристан, изоцетан) и 0.5% вес. для твердых (н-эйкозан, н-докозан, смесь парафинов C₄₆–C₄₈); выращивание с н-октаном проводили в парах, внося субстрат в специальный отросток.

Выравнивание последовательностей и построение филогенетического дерева выполняли в программе MEGA X (Kumar et al., 2018).

Штамм *R. qingshengii* X5, дефектный по гену *alkB1* (координаты гена в GenBank CP044284: 844 049..845 224), конструировали путем замены этого гена на мутантный аллель при помощи гомологичной рекомбинации. Два фрагмента, фланкирующих целевой ген, амплифицировали, используя две пары праймеров: *alkB1_up_F* (5'-CGGCCGCTCTAGAAGTAGTGTGGCCATATCGGGAGGACG-3') и *alkB1_up_R* (5'-CATCGAATTCTCCAGTTCTCGTTC-3') для upstream-участка, *alkB1_down_F* (5'-GACGAGAAGTGGAGAATTCGATGGCCTACGGGTGAACGCATG-3') и *alkB1_down_R* (5'-CGAATTCCTGCAGCCCGGGGGTAGTTTCCTTCGACAGCGCC-3') для downstream-участка. Полученные фрагменты клонировали в плазмидном векторе pJQ200KS по методу T5 exonuclease DNA assembly (Xia et al., 2019). Скрещивание штамма-донора *E. coli* S17-1(pJQ200KSΔ*alkB1*) и штамма-реципиента *R. qingshengii* X5 проводили на плотной среде LB с добавлением гентамицина (80 мкг/мл) и налидиксовой кислоты (10 мкг/мл). Для обнаружения меродиплоидов устойчивые клоны тестировали методом ПЦР. Отбор продуктов двойного кроссинговера проводили на среде LB с добавлением сахарозы (20% вес.). У клонов, устойчивых к сахарозе и чувствительных к гентамицину, наличие делеции гена *alkB1* проверяли с помощью ПЦР с парой специфичных праймеров, расположенных upstream и downstream от целевой мутации: *alkB1_seq_F* (5'-ACGACCAAGGGCCGTATTT-3') и *alkB1_seq_R* (5'-TCGATACCCTGCTCGGTCC-3') при следующих условиях: 98°C – 3 мин, далее 30 циклов: 98°C – 10 с, 60°C – 20 с, 72°C – 1 мин 30 с, финальная достройка: 72°C – 2 мин. Корректность мутации подтверждали с помощью

Таблица. Характеристика способности штамма дикого типа *R. qingshengii* X5 и мутантного штамма *R. qingshengii* X5(Δ*alkB1*), содержащего делецию гена *alkB1*, к росту на алканах при двух температурах

Субстрат	<i>R. qingshengii</i> X5		<i>R. qingshengii</i> X5(Δ <i>alkB1</i>)	
	6°C	28°C	6°C	28°C
н-Октан	Н.п.	+	Н.п.	+
н-Декан	+	++	+	++
н-Ундекан	++	++	+	++
н-Додекан	++	++	++	++
н-Гексадекан	++	++	+	++
н-Эйкозан	++	++	+	++
н-Докозан	++	++	+	++
Смесь C ₄₆ –C ₄₈	+	++	+	++
Пристан	0	++	0	++
Изоцетан	0	0	0	0

Примечание. ++ – Интенсивный рост; + – умеренный рост; 0 – отсутствие роста; н.п. – не проверялась.

секвенирования по Сэнгеру с праймерами alkB1_seq_F и alkB1_seq_R.

В нашей работе была получена характеристика способности к росту штамма *R. qingshengii* X5 на различных алканах при двух температурах (таблица). Интенсивный рост был отмечен для обеих температур на всем спектре проверенных линейных алканов.

Кроме н-алканов в качестве субстратов были использованы и два разветвленных алкана: пристан, у которого субтерминальный атом углерода является третичным, и изоцетан, с четвертичным субтерминальным атомом углерода. Известно, что разветвленные алканы значительно хуже подвергаются биодegradации, чем линейные, и деструкторы таких соединений встречаются гораздо реже (Rojo, 2009).

В нашей работе рост на пристане у штамма *R. qingshengii* X5 наблюдался только при 28°C, а потреблять изоцетан штамм оказался неспособен. Ранее было описано несколько представителей родококков, растущих на пристане: *R. erythropolis* E1 (Sokolovska et al., 2003), *Rhodococcus* sp. TMP2 (Kunihiro et al., 2005), *Rhodococcus* sp. 094 (также не мог потреблять изоцетан) (Bredholt, Eimhjellen, 1999), но о зависимости этой способности от температуры не сообщалось.

Полученные результаты говорят о наличии у штамма *R. qingshengii* X5 алкан-деградирующих систем с широкой субстратной специфичностью, сохраняющих активность и при низких положительных температурах.

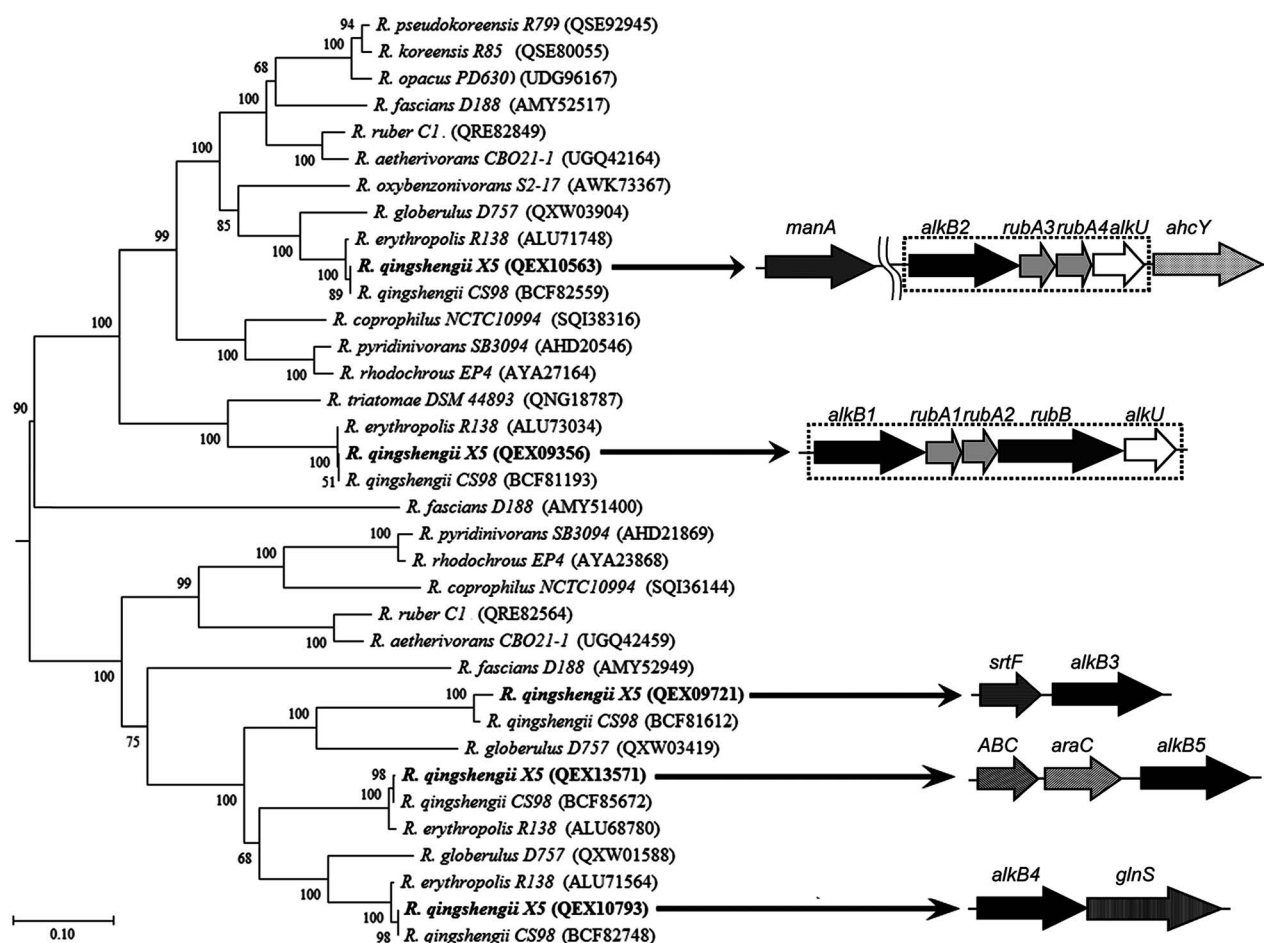


Рисунок. Слева: филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей алкан монооксигеназ AlkB-типа представителей рода *Rhodococcus*, построенное по методу Neighbor-Joining; бутстреппы рассчитаны для 1000 повторений, величина поддержки бутстрепа указана цифрами. Последовательности штамма *R. qingshengii* X5 выделены жирным шрифтом. Стрелками отмечено соответствие консервативному региону. Справа: организация консервативных регионов, в которых локализованы гены *alkB* разных подтипов. Рамкой обведены кластеры функциональных генов, непосредственно участвующих в метаболизме алканов. Обозначения генов: *alkB1-alkB5* – алкан монооксигеназы соответствующего подтипа; *rubA1-rubA4* – рубредоксины; *rubB* – рубредоксин редуктаза; *alkU* – регуляторный белок семейства TetR; *manA* – маннозо-6-фосфат изомеразы; *ahcY* – аденозил гомоцистеиназа; *srtF* – сортаза типа F; *glnS* – глутамил-тРНК синтаза; ABC – белок-транспортер; *araC* – транскрипционный регулятор AraC-типа.

В соответствии с представленной в базе данных GenBank аннотацией, в геноме штамма *R. qingshengii* X5 содержатся 5 генов алкан монооксигеназ AlkB-типа, все имеют хромосомную локализацию. Впервые такое разнообразие генов *alkB* у родококков было показано в работе van Beilen et al. (2002). Затем этой же группой было предложено разделить обнаруженные гены на 4 группы, отличающиеся не только соответствующей кластеризацией нуклеотидных последовательностей, но и локализацией в характерных регионах генома, сохраняющих консервативность окружения (Whyte et al., 2002). Так, гены подтипа *alkB1* располагались в кластере, включающем в себя гены других необходимых участников реакции гидроксилирования алканов: рубредоксина (две копии, *rubA1* и *rubA2*) и рубредоксин редуктазы (*rubB*), также в кластер входит ген регуляторного белка AlkU, относящегося к семейству TetR. Ген *alkB2* отличался отсутствием в кластере гена *rubB*, к консервативному окружению гена *alkB3* относился ген сортазы класса F, а *alkB4* — глутамил-тРНК синтетазы (Whyte et al., 2002). Впоследствии были опубликованы работы, сообщающие об обнаружении новых подтипов генов *alkB* у родококков (Takei et al., 2008; Xiang et al., 2022). К настоящему времени для генов из окружения всех подтипов *alkB*, кроме 1 и 2, не известно никакой функциональной связи с потреблением алканов.

По результатам филогенетического анализа можно заключить, что каждая из 5 алкан монооксигеназ относится к своему подтипу, которые характерны для представителей рода *Rhodococcus* (рисунок).

Поскольку кластер гена *alkB1* содержит функционально необходимые для окисления алканов детерминанты, он представляется важнейшим среди всех остальных гомологов *alkB*. Ранее была показана сильная связь индукции генов этого типа с ростом на алканах (Takei et al., 2008; Gibu et al., 2019), а в экспериментах по гетерологичной экспрессии — связь гена с деградирующей активностью (Zampolli et al., 2014). Исходя из этого, ген был выбран как целевой для получения мутантного штамма с соответствующей делецией.

В ходе выполнения настоящей работы был получен мутантный штамм *R. qingshengii* X5Δ*alkB1*, содержащий делецию гена *alkB1*, кодирующего алкан монооксигеназу AlkB1 (QEX09356.1). Была проведена оценка его способности к росту в тех же условиях, что и для штамма дикого типа (таблица). В результате у мутантного штамма наблюдалось ослабление роста при температуре 6°C для некоторых алканов, однако полностью способность к их потреблению не пропадала. При 28°C различий между фенотипами мутантного штамма и штамма дикого типа не было обнаружено.

Таким образом, очевидно, что ген *alkB1* не является обязательным элементом для метаболизма алканов у штамма X5. Вероятно, этот ген играет существенную роль для потребления алканов при низких температурах, но и в этом случае очевидно наличие других функционирующих в таких условиях систем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00192, <https://rscf.ru/project/23-24-00192/>

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

- Bredholt H., Eimhjellen K. Induction and development of the oil emulsifying system in an alkane oxidizing *Rhodococcus* species // Can. J. Microbiol. 1999. V. 45. P. 700–708.
- Delegan Y., Valentovich L., Petrikov K., Vetrova A., Akhremchuk A., Akimov V. Complete genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* X5, a psychrotrophic hydrocarbon-degrading biosurfactant-producing bacterium // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. Art. e01234-19.
- Gibu N., Kasai D., Ikawa T., Akiyama E., Fukuda M. Characterization and transcriptional regulation of *n*-alkane hydroxylase gene cluster of *Rhodococcus jostii* RHA1 // Microorganisms. 2019. V. 7. Art. 479.
- Kim D., Choi K. Y., Yoo M., Zylstra G. J., Kim E. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways // J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 28. P. 1037–1051.
- 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.
- Kunihiro N., Haruki M., Takano K., Morikawa M., Kanaya S. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. strains TMP2 and T12 that degrade 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) at moderately low temperatures // J. Biotechnol. 2005. V. 115. P. 129–136.

- Ławniczak Ł., Woźniak-Karczewska M., Loibner A.P., Heipieper H.J., Chrzanowski Ł. Microbial degradation of hydrocarbons – basic principles for bioremediation: a review // *Molecules*. 2020. V. 25. Art. 856.
- Long H., Wang Y., Chang S., Liu G., Chen T., Huo G., Zhang W., Wu X., Tai X., Sun L., Zhang B. Diversity of crude oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes from the Qinghai-Tibet Plateau // *Environ. Monit. Assess.* 2017. V. 189. Art. 116.
- Moreno R., Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes in bacteria // *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* / Ed. F. Rojo. Springer International Publishing, 2017. P. 1–25.
- Müller C.A., Weingartner A.M., Dennig A., Ruff A.J., Gröger H., Schwaneberg U. A whole cell biocatalyst for double oxidation of cyclooctane // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 43. P. 1641–1646.
- Pérez-de-Mora A., Engel M., Schlöter M. Abundance and diversity of *n*-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on *alkB* homologous genes // *Microbial. Ecol.* 2011. V. 62. P. 959–972.
- Petrikov K., Deegan Y., Surin A., Ponamareva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: formation and structure // *Proc. Biochem.* 2013. V. 48. P. 931–935.
- Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 2477–2490.
- Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Schulz S., Giebler J., Chatzinotas A., Wick L.Y., Fetzer I., Welzl G., Harms H., Schlöter M. Plant litter and soil type drive abundance, activity and community structure of *alkB* harbouring microbes in different soil compartments // *ISME J.* 2012. V. 6. P. 1763–1774.
- Smith C.B., Tolar B.B., Hollibaugh J.T., King G.M. Alkane hydroxylase gene (*alkB*) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. Art. 730.
- Sokolovska I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P.G., Agathos S.N., Wattiau P. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 7019–7027.
- Takei D., Washio K., Morikawa M. Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. P. 1447–1452.
- Tomasino M., Aparício M., Ribeiro I., Santos F., Caetano M., Almeida C., de Fátima Carvalho M., Mucha A. Diversity and hydrocarbon-degrading potential of deep-sea microbial community from the Mid-Atlantic Ridge, south of the Azores (North Atlantic Ocean) // *Microorganisms*. 2021. V. 9. Art. 2389.
- Tsai Y.-F., Luo W.-I., Chang J.-L., Chang C.-W., Chuang H.-C., Ramu R., Wei G.-T., Zen J.-M., Yu S.S.-F. Electrochemical hydroxylation of C3–C12 *n*-alkanes by recombinant alkane hydroxylase (AlkB) and rubredoxin-2 (AlkG) from *Pseudomonas putida* GPo1 // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 8369.
- van Beilen J.B., Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 74. P. 13–21.
- van Beilen J.B., Smits T.H.M., Whyte L.G., Schorcht S., Röthlisberger M., Plaggemeier T., Engesser K.-H., Witholt B. Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains // *Environ. Microbiol.* 2002. V. 4. P. 676–682.
- Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 5933–5942.
- Wiesenberg G.L.B., Lehnndorff E., Schwark L. Thermal degradation of rye and maize straw: Lipid pattern changes as a function of temperature // *Org. Geochem.* 2009. V. 40. P. 167–174.
- Xia Y., Li K., Li J., Wang T., Gu L., Xun L. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. P. e15.
- Xiang W., Liang Y., Hong S., Wang G., You J., Xue Y., Ma Y. Degradation of long-chain *n*-alkanes by a novel thermal-tolerant *Rhodococcus* strain // *Arch. Microbiol.* 2022. V. 204. Art. 259.
- Zampolli J., Collina E., Lasagni M., Di Gennaro P. Biodegradation of variable-chain-length *n*-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism // *AMB Express*. 2014. V. 4. Art. 73.

SHORT COMMUNICATIONS

**Alkane Monooxygenase AlkB1 of *Rhodococcus qingshengii* strain X5
Does not Required for Growth on Alkanes****K. V. Petrikov^{1, *}, A. A. Rejepova¹, I. Y. Pozdnyakova-Filatova¹**

¹*Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",
Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290, Pushchino, Russia*

**e-mail: petrikov_kv@pbcras.ru*

Abstract. The study of monooxygenase systems responsible for the primary oxidation of alkanes is necessary to understand the bacterial metabolism of these hydrocarbons. Genome analysis of the *Rhodococcus qingshengii* strain X5 showed a wide variety of genes encoding the corresponding enzymes, including 5 homologs of AlkB-type alkane monooxygenases. A strain with knockout of the *alkB1* gene was constructed. A comparison of the ability of the wild-type strain and the mutant strain to grow on alkanes of various lengths at two temperatures (6°C and 28°C) reveals the preservation of the basic phenotype: although the growth of the mutant at low temperatures was weakened, the spectrum of oxidizable substrates did not change. This suggests that other functioning monooxygenase active at different temperatures towards a wide range of alkanes.

Keywords: alkane monooxygenases, alkane hydroxylases, rhodococci, oil destructors, psychrotrophs, biodegradation

УДК 579.24+576.54

О РОЛИ ДИОКСИДА УГЛЕРОДА В РЕГУЛЯЦИИ АДАПТИВНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ БАКТЕРИЙ

© 2024 г. О. Е. Петрова^{а, *}, О. И. Парфирова^а, В. Н. Воробьев^{а, b}, В. Ю. Горшков^{а, b}

^аКазанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, 420111, Россия

^bИнститут фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань, 420008, Россия

*e-mail: roe60@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2023 г.

После доработки 02.03.2024 г.

Принята к публикации 21.03.2024 г.

Адаптивная пролиферация бактерий или клеточное деление в отсутствие экзогенного органического субстрата контролируется с помощью плотно-зависимых механизмов при участии АГЛ- и АИ-2-зависимых систем кворум сенсинга. Наряду с сигнальными молекулами этих систем бактериальной коммуникации в регуляции также могут принимать участие метаболиты бактерий, которые перманентно выделяются в процессе микробного метаболизма, например, CO₂, и, таким образом, могут служить биомаркерами клеточной плотности. Установлено, что диоксид углерода необходим для инициации адаптивной пролиферации, а повышенное содержание атмосферного CO₂ вызывает преждевременную остановку этого процесса. Таким образом, CO₂ способен регулировать адаптивные реакции бактерий, в том числе, вероятно, является одним из сигналов, участвующих в инициации и терминеции процесса адаптивной пролиферации. Показано, что CO₂ в виде бикарбонат-иона HCO₃⁻ может активировать цАМФ-зависимый сигнальный каскад, а также включается в клеточную массу бактерий.

Ключевые слова: адаптация, диоксид углерода, клеточная плотность, межклеточная коммуникация, цАМФ, *Pectobacterium atrosepticum*

DOI: 10.31857/S0026365624050145

Адаптивные реакции бактерий регулируются на популяционном уровне с участием систем межклеточной коммуникации (кворум сенсинга) (Williams, Camara, 2009; Striendnig, Hilbi, 2022). Когда численность клеток в популяции недостаточна для активации адаптивных ответов, бактерии могут увеличить ее до уровня кворума посредством деления клеток. Это явление, адаптивная пролиферация, то есть клеточное деление в отсутствие экзогенного органического субстрата, описано для ряда гетеротрофных бактерий при голодании (Мясник, 1969; Gorshkov et al., 2010; Petrova et al., 2014; 2023). Поскольку адаптивная пролиферация осуществляется за счет внутренних резервов клеток бактерий, крайне важно ее своевременное прекращение по достижении плотности популяции, необходимой для активации систем кворума и реализации адаптивного ответа. В нашем недавнем исследовании было показано, что сигнальные молекулы ацилгомосеринлактон-зависимой и АИ-2-зависимой систем кворум сенсинга участвуют в прекращении адаптивной пролиферации фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*, однако подавляя этот процесс не полностью, а лишь частично (Petrova

et al., 2023). Это предполагает участие других бактериальных метаболитов в регуляции адаптивной пролиферации. В том числе, остается открытым вопрос о сигнале/сигналах, индуцирующих процесс адаптивной пролиферации.

Мы предположили, что в регуляции адаптивной пролиферации могут участвовать метаболиты микроорганизмов, которые не являются специализированными сигнальными молекулами бактериальной коммуникации. Они перманентно выделяются в процессе микробного метаболизма, такие, например, как диоксид углерода, и, следовательно, могут служить биомаркерами клеточной плотности (Stretton, Goodman, 1998). CO₂ оказывает как прямое, так и опосредованное воздействие на различные группы микроорганизмов, включая гетеротрофные бактерии. Благодаря своим физико-химическим свойствам, CO₂ влияет на функцию биологических мембран, препятствуя делению клеток, поглощению или транспорту субстрата; снижение pH, вызванное гидратацией CO₂, может нарушить внутриклеточный гомеостаз и целостность клеток (Stretton, Goodman, 1998; Jo et al., 2013). CO₂ может принимать участие в передаче сигналов бактерий,

активируя цАМФ-зависимые сигнальные каскады в ответ на действие стрессовых факторов: осмолярность, голодание, высокую плотность клеток или состояние организма-хозяина в случае патогенных микроорганизмов (Merlin et al., 2003). Депривация атмосферного CO_2 ведет к ингибированию роста и даже гибели гетеротрофных микроорганизмов (Sorokin, 1962; Dehority, 1971).

Целью исследования было выяснение роли диоксида углерода в инициации и/или терминации процесса адаптивной пролиферации на примере фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum*SCRI1043.

Клетки *P. atrosepticum* культивировали в герметичных сосудах в питательной среде LB (Luria-Bertani бульон) или в безуглеродной среде АВ в отсутствие CO_2 или при его повышенной концентрации — 5, 10, 20%. Для удаления газообразного CO_2 использовали химический поглотитель натронную известь (ХП-И, “Лен-Реактив”) в концентрации 0.85 г/л в пересчете на общий объем сосуда. Постоянная циркуляция газовой фазы осуществлялась при помощи перистальтического насоса ВТ100-1L. Проводили постоянный контроль pH среды. Уровень экспрессии целевых генов определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Количество транскриптов целевых генов нормализовали на нормирующий фактор, рассчитанный для транскриптов генов домашнего хозяйства *ffh*, *tuf*, *recA* *P. atrosepticum* в этих же образцах с помощью алгоритма geNorm. Нормализованные значения отражают относительный уровень экспрессии изучаемых генов. Включение

радиоактивной метки в биомассу клеток измеряли методом жидкостной сцинтилляции с помощью сцинтилляционного анализатора Tri-Carb.

Удаление CO_2 из газовой фазы снижало титр КОЕ пектобактерий, растущих на питательной среде LB, на два порядка величин по сравнению с бактериями, растущими в присутствии атмосферного CO_2 . В то же время отсутствие CO_2 в газовой фазе губительно действовало на клетки *P. atrosepticum* при культивировании бактерий на безуглеродной среде АВ: титр клеток снижался до неопределяемых величин уже на первые сутки культивирования (рис. 1).

Таким образом, присутствие диоксида углерода, по-видимому, является необходимым условием для инициации процесса адаптивной пролиферации и выживания пектобактерий в условиях голодания.

Для проверки влияния повышенных концентраций CO_2 на рост и на адаптивную пролиферацию бактерий, *P. atrosepticum* культивировали на питательной среде LB или безуглеродной среде АВ в присутствии разных концентраций диоксида углерода. CO_2 не влиял на рост бактерий на питательной среде (рис. 2а).

Процесс адаптивной пролиферации несколько угнетался (т.е. снижался титр клеток, при котором происходила терминация клеточного деления) при концентрации уже 5% CO_2 , а 20% CO_2 полностью подавляли адаптивную пролиферацию (процесс не иницировался), при этом бактерии оставались жизнеспособными (рис. 2б). Т.е. в условиях эксперимента повышение уровня CO_2 могло служить сигналом для преждевременной (до достижения уровня кворума) терминации адаптивной пролиферации.

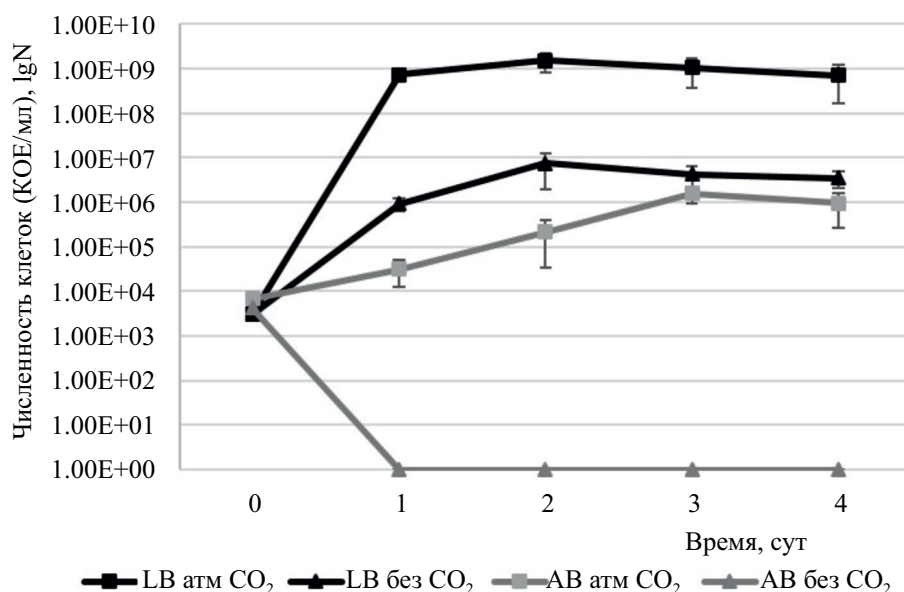


Рис. 1. Динамика численности КОЕ в культурах *P. atrosepticum* SCRI1043, растущей на питательной среде LB (черные линии), или культивируемой на безуглеродной среде АВ (серые линии) в присутствии атмосферного CO_2 (квадраты) или в его отсутствии (треугольники).

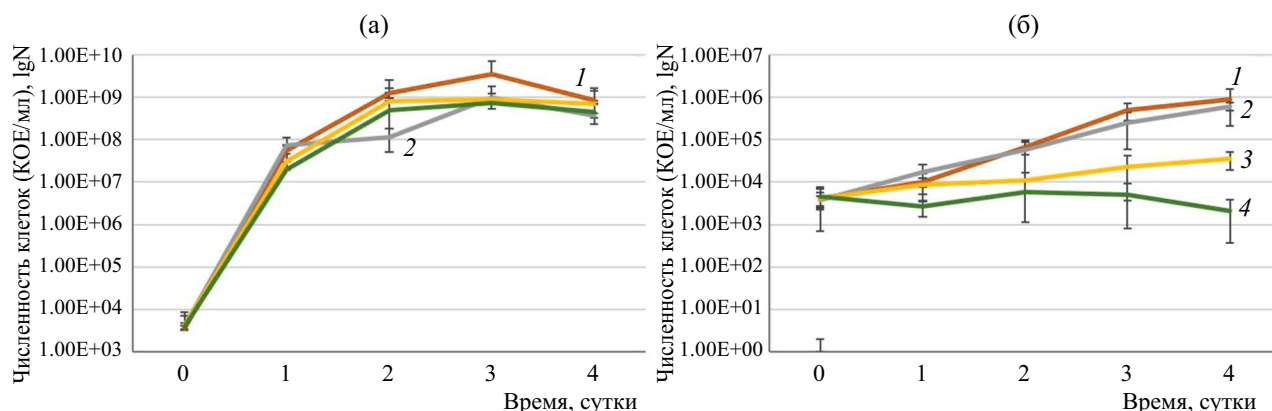


Рис. 2. Динамика численности КОЕ в культурах *P. atrosepticum* SCRI1043, растущей на питательной среде LB (а), или культивируемой на безуглеродной среде АВ (б) в присутствии разных концентраций CO_2 : 1 – атм CO_2 ; 2 – 5% CO_2 ; 3 – 10% CO_2 ; 4 – 20% CO_2 .

Таким образом, терминация клеточного деления при голодании, вероятно, является следствием формирования многокомпонентного сигнального фона, в состав которого, наряду с медиаторами систем кворума АГЛ и АИ-2 (Petrova et al., 2023), может входить и диоксид углерода.

Газообразный CO_2 хорошо растворим в водных растворах и липидах и может свободно диффундировать в клетку и из нее (Smith et al., 2000). В клетке CO_2 при участии карбоновой ангидразы преобразуется в бикарбонат-ион HCO_3^- , который участвует в бактериальном сигналинге и в анаболических процессах. Экспрессия гена *eca3327*, кодирующего цитоплазматическую ангидразу *P. atrosepticum*, индуцировалась в первые часы голодания на безуглеродной среде АВ и сохранялась на постоянном уровне в течение трех суток, т.е. в процессе адаптивной пролиферации (рис. 3а).

Бактериальная сигнализация связана с функционированием глобального регулятора – цАМФ, действующего как сигнальная молекула и регулирующего многие биологические процессы у млекопитающих и микроорганизмов (Kalia et al., 2013; Stulke Kruger, 2020). Синтез цАМФ происходит при участии фермента аденилатциклазы. Бикарбонат не участвует напрямую в каталитическом процессе, но стимулирует активность аденилатциклазы, кратковременно взаимодействуя с ферментом в течение каждого каталитического цикла и вызывая конформационные изменения фермента (Steegborn et al., 2005). Растворимые аденилатциклазы чувствительны к физиологическим колебаниям бикарбоната в концентрации от 5 до 25 М и считаются ферментами “обнаружения” CO_2 (Chen et al., 2000). Экспрессия гена *suuA*, кодирующего аденилатциклазу *P. atrosepticum*, заметно активировалась к третьим суткам голодания

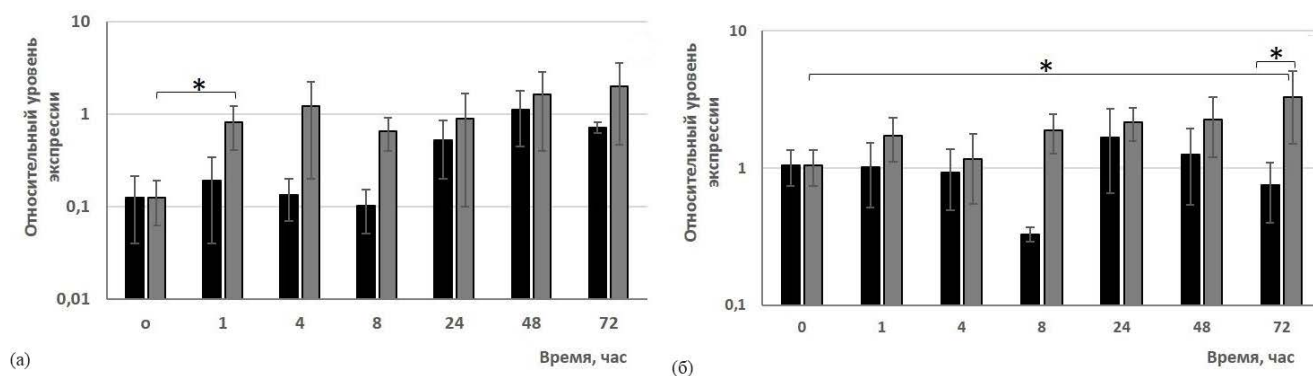


Рис. 3. Экспрессия генов карбоновой ангидразы (а) и аденилатциклазы (б) в *P. atrosepticum* SCRI1043, растущей на питательной среде LB (черные столбики), или культивируемой на безуглеродной среде АВ (серые столбики) в присутствии атмосферного CO_2 . Уровень экспрессии целевых генов определялся относительно нормирующего фактора, рассчитанного для генов домашнего хозяйства *fhh*, *tuf*, *recA* *P. atrosepticum*. Представленные значения являются средними значениями из пяти биологических повторностей. Звездочки (*) показывают достоверные различия (двусторонний тест Манна–Уитни, $p < 0.05$) между вариантами, обозначенными скобками.

Таблица. Включение ¹⁴C в биомассу *P. atrosepticum* SCRI1043 при росте на среде LB или голодании на безуглеродной среде AB

Условия культивирования	¹⁴ HCO ₃ ⁻ импульсов в минуту на 1 клетку			
	0 ч	1 день	2 день	3 день
Рост на среде LB	1.15 × 10 ⁻²	4.6 × 10 ⁻⁵	2.8 × 10 ⁻⁵	1.3 × 10 ⁻⁵
Голодание на безуглеродной среде AB	—	1.2 × 10 ⁻⁴	1.8 × 10 ⁻⁴	8.7 × 10 ⁻⁵

и более чем в 4 раза превышала экспрессию этого гена у клеток пектобактерий, выросших на питательной среде LB. При росте пектобактерий на среде LB не было отмечено достоверного увеличения уровня экспрессии гена *суаА* (рис. 36). Таким образом, при адаптивной пролиферации, вероятно, происходила активация сигнальной ветви включения диоксида углерода в метаболизм *P. atrosepticum*.

Гетеротрофная фиксация CO₂ поставляет 1–8% углерода клеточной массы гетеротрофных бактерий в ростовых условиях и до 9% при голодании (Braun et al., 2021). Об использовании CO₂ в процессах анаболизма может свидетельствовать включение меченого углерода бикарбоната ¹⁴HCO₃⁻ в клеточную массу бактерий. В процессе адаптивной пролиферации гетеротрофная бактерия *P. atrosepticum* ассимилировала диоксид углерода. При этом эффективность включения меченого углерода в биомассу голодающих бактерий, была несколько выше, чем у бактерий при росте на питательной среде LB (таблица).

Бактерии обладают так называемым чувством диффузии “diffusion sensing”, способны воспринимать колебания уровня CO₂ и реагировать на них. Полученные результаты указывают на то, что CO₂ способен регулировать адаптивные реакции бактерий, в том числе, вероятно, является одним из сигналов, участвующих в инициации и терминции процесса адаптивной пролиферации *P. atrosepticum*. Включение углерода из CO₂ в биомассу гетеротрофных бактерий, вероятно, может частично (хотя и в очень малой степени) компенсировать дефицит экзогенного углерода при голодании.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено при поддержке гранта Российского Научного Фонда 22-24-00787.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Мясник М.Н. Динамика клеточной популяции бактерий при исчезающе малых количествах питательных веществ в среде // Тез. докладов II Всесоюзного совещания “Управляемый синтез и биофизика популяций”. Красноярск, 1969. С. 287.

Braun A., Spona-Friedl M., Avramov M., Elsner M., Baltar F., Reinthaler T., Herndl G., Griebler C. Reviews and syntheses: heterotrophic fixation of inorganic carbon – significant but invisible flux in environmental carbon cycling // Biogeosci. 2021. V. 18. P. 3689–3700.

Chen Y., Cann M.J., Litvin T.N., Iourgenko V., Sinclair M.L., Levin L.R., Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor // Science. 2000. V. 289. P. 625–628.

Dehority B.A. Carbon dioxide requirement of various species of rumen bacteria // J. Bacteriol. 1971. V. 105. P. 70–76.

Gorshkov V., Petrova O., Gogoleva N., Gogolev Y. Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043 during adaptation to stress conditions // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010. V. 59. P. 378–385.

Jo B.H., Kim I.G., Seo J.H., Kang D.G., Cha H.J. Engineered *Escherichia coli* with periplasmic carbonic anhydrase as a biocatalyst for CO₂ sequestration // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 6697–6705.

Kalia D., Merey G., Nakayama S., Zheng Y., Zhou J., Luo Y., Guo M., Roembke B., Sintim H.O. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 305–341.

Merlin C., Masters M., McAteer S., Coulson A. Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 6415–6424.

Petrova O., Gorshkov V., Daminova A., Ageeva M., Moleleki L.N., Gogolev Y. Stress response in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 under starvation conditions: adaptive reactions at a low population density // Res. Microbiol. 2014. V. 165. P. 119–127.

- Petrova O., Parfirova O., Gogoleva N., Vorob'ev V., Gogolev Y., Gorshkov V. The role of intercellular signaling in the regulation of bacterial adaptive proliferation // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Art. 7266.
- Smith K.S., Ferry J.G. Prokaryotic carbonic anhydrases // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. P. 335–366.
- Sorokin C. Inhibition of cell division by carbon dioxide // Nature. 1962. V. 194. P. 496–497.
- Steeghorn C., Litvin T.N., Levin L.R., Buck J., Wu H. Bicarbonate activation of adenyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. P. 32–37.
- Stretton S., Goodman A.E. Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms // Antonie Van Leeuwenhoek. 1998. V. 73. P. 79–85.
- Striednig B., Hilbi H. Bacterial quorum sensing and phenotypic heterogeneity: how the collective shapes the individual // Trends Microbiol. 2022. V. 3. P. 379–389.
- Stulke J., Kruger L. Cyclic di-AMP signaling in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2020. V. 74. P. 159–179.
- Williams P., Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules // Curr. Opin. Microbiol. 2009. V. 12. P. 182–191.

SHORT COMMUNICATIONS

The Role of Carbon Dioxide in the Regulation of Bacterial Adaptive Proliferation

O. E. Petrova^{1, *}, O. I. Parfirova¹, V. N. Vorob'ev^{1, 2}, and V. Yu. Gorshkov^{1, 2}

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center KazSC RAS, Kazan, 420111, Russia

²Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008, Russia

*e-mail: poe60@mail.ru

Abstract. The adaptive proliferation of bacteria or cell division in the absence of an exogenous organic substrate is controlled by density-dependent mechanisms with the participation of AHL- and AI-2-dependent quorum sensing systems. Along with the signaling molecules of these bacterial communication systems, bacterial metabolites that are permanently released during microbial metabolism, for example, CO₂, can also participate in regulation and can serve as biomarkers of cell density. It has been established that carbon dioxide is necessary for the adaptive proliferation launch, and the increased content of atmospheric CO₂ causes a premature stop to this process. Thus, CO₂ is able to regulate the adaptive reactions of bacteria, including, probably, being one of the signals involved in the initiation and termination of the process of adaptive proliferation. It has been shown that CO₂ in the form of the bicarbonate ion HCO₃⁻ can activate the cAMP-dependent signaling cascade and is also included in the bacterial cell mass.

Keywords: adaptation, carbon dioxide, cell density, intercellular communication, cAMP, *Pectobacterium atrosepticum*

УДК 57.083.16+576.526

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ C-DAG ДЛЯ АНАЛИЗА СПОСОБНОСТИ АМИЛОИДОВ ИНДУЦИРОВАТЬ АГРЕГАЦИЮ БЕЛКА *IN VITRO*

© 2024 г. Н. П. Трубицина^a, О. М. Землянко^{a, b}, Г. А. Журавлева^{a, b}, С. А. Бондарев^{a, b, *}

^aСанкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии,
199034, Санкт-Петербург, Россия

^bСанкт-Петербургский государственный университет, Научная лаборатория биологии амилоидов,
199034, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: s.bondarev@spbu.ru; stanislavspbg@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 21.12.2023 г.

Поиск новых амилоидных белков, а также изучение их свойств является актуальной задачей, решать которую позволяет ряд различных модельных систем. Одной из наиболее популярных является методика C-DAG. Она основана на анализе агрегации исследуемых белков на поверхности клеток *Escherichia coli*. Согласно оригинальному протоколу, с ее помощью можно продемонстрировать одно из характерных свойств амилоидов: способность связывать амилоид-специфический краситель Конго красный и демонстрировать при этом двойное зеленое лучепреломление. Кроме этого, методика C-DAG позволяет анализировать морфологию агрегатов и их устойчивость к детергентам. В работе мы проверили на примере Sup35NM, могут ли агрегаты, представленные на поверхности клеток бактерий, выступать в качестве индукторов агрегации соответствующего белка.

Ключевые слова: амилоиды, C-DAG, *E. coli*, кинетика агрегации, Sup35

DOI: 10.31857/S0026365624050156

Амилоиды представляют собой белковые агрегаты с кросс-β структурой, и на сегодняшний день известно более сотни белков с амилоидными или амилоидоподобными свойствами (Матив и соавт., 2020). Идентификация новых амилоидов является трудоемкой задачей, для решения которой был предложен ряд подходов. Удобным инструментом для массового скрининга амилоидов *in vitro* стала тест-система C-DAG (Curli-dependent amyloid generator) (Sivanathan, Hochschild, 2013). Она основана на способности бактерий образовывать на своей поверхности структуры из амилоидогенных белков. У *Escherichia coli* они носят название “curli”, а их основным компонентом является белок CsgA. За транспорт этого белка на поверхность клетки отвечает специфическая сигнальная последовательность (CsgAss). Слияние других белков с CsgAss позволяет также направлять их на экспорт из клетки, и если такой белок обладает амилоидными свойствами, то на поверхности бактериальных клеток будут формироваться амилоидные фибриллы. Впервые это было продемонстрировано на примере амилоидогенного фрагмента Sup35NM

(Sivanathan, Hochschild, 2012). Методика C-DAG позволяет в короткие сроки проверять взаимодействие белковых агрегатов с амилоид-специфическим красителем Конго красный. Колонии бактерий с амилоидами, культивируемые на этой среде, становятся красными. Последующий анализ клеток с помощью поляризационной микроскопии позволяет протестировать наличие двойного зеленого лучепреломления образцов. Две эти проверки свидетельствуют о наличии свойств, характерных для амилоидов, а также позволяют выдвинуть предположение о кросс-β структуре агрегатов исследуемого белка. Фибриллярную морфологию агрегатов на поверхности клеток можно продемонстрировать с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Наконец, биохимические методы позволяют также протестировать устойчивость исследуемых белковых агрегатов к детергентам (Sivanathan, Hochschild, 2013). Методика C-DAG была успешно использована для проверки амилоидных свойств различных белков: Gas1 и Ygp1 (Ryzhova et al., 2018), RopA и RopB (Kosolapova et al., 2019), Esp (Taglialegna et al., 2020), RAD51 (Kachkin et al.,

2022), FXR1 (Sopova et al., 2019), YghJ (Belousov et al., 2018) и других. Однако методика C-DAG позволяет проанализировать далеко не все свойства амилоидов. В частности, она не дает информации о способности агрегатов индуцировать агрегацию такого же белка, хотя это также является характерным свойством амилоидов (Chiti, Dobson, 2017; Матив и соавт., 2020; Willbold et al., 2021). Мы решили заполнить этот пробел и протестировали это на примере Sup35NM.

Рекомбинантный белок Sup35NM выделяли из клеток *E. coli* BL21(DE3), несущих вектор pET20b-SUP35NM (Allen et al., 2005), согласно ранее опубликованной методике (Serio, Lindquist, 1999). Полученный белок осаждали метанолом и хранили при -80°C . Перед экспериментами осадок белка растворяли в 6 М ГГХ в течение ночи при 4°C . Для получения агрегатов Sup35NM измеряли концентрацию белка и разводили его минимум в 100 раз в буфере для сборки фибрилл (буфер F, 5 мМ калий фосфатный буфер pH 7.5, 150 мМ NaCl) до конечной концентрации 0.5 мг/мл. Полученный раствор инкубировали при 25°C на ротаторе с переворачиванием (60 об./мин) в течение 12–24 ч. Для анализа кинетики агрегации Sup35NM белок разводили в буфере F (минимум в 50 раз) до концентрации не менее 0.5 мг/мл и центрифугировали при скорости 21130 g и температуре 4°C в течение 30 мин. Этот этап был необходим для удаления не растворившихся агрегатов белка.

Для получения клеток *E. coli* в системе C-DAG использовали штамм VS39, который трансформировали плазмидой pVS72, несущей ген *SUP35NM* (Sivanathan, Hochschild, 2013). Подготовку клеток проводили согласно опубликованному протоколу. Для контроля исходный штамм VS39 высевали на среду LB с хлорамфениколом. Чашки с культурами инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Клетки собирали с твердой среды и ресуспендировали в 100 мкл буфера F. Суспензию термически инактивировали при 75°C в течение 20 мин. Концентрации клеток в пробах выравнивали на основании оптической плотности суспензий.

Для анализа кинетики агрегации белка использовали следующие компоненты в различных сочетаниях (указаны конечные концентрации в реакционной смеси): мономерный Sup35NM (0.1 мг/мл), фибриллы Sup35NM (0.002 мг/мл), бактериальные клетки ($\text{OD}_{600} = 0.01$), краситель тиофлавин Т (2.5 мМ). Конечный объем одной пробы составлял 150 мкл, реакция проходила в буфере F. Изменение флуоресценции тиофлавина Т (широко используемый амилоид-специфический краситель) в пробах проводили в планшетах с темными стенками (Corning 3603) на приборе Clariostar Plus (“BMG Labtech”) через каждые 240 с. Флуоресценцию считывали при длине волны 483 ± 10 нм (возбуждение при 448 ± 10 нм).

Результаты нормировали, принимая за ноль минимальное значение, а за единицу — медиану флуоресценции на стадии “плато”. Затем для каждой реакции мы подбирали параметры следующей модели (Vaneysk et al., 2021):

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x - x_0)}{dx}}},$$

где A_1 и A_2 — начальный и финальный уровень флуоресценции, x_0 — время полуреакции, dx — величина, обратная скорости агрегации. С учетом подобранных параметров мы также рассчитывали время lag-фазы реакции: $\text{lag} = x_0 - 2dx$.

Нам удалось проследить процесс агрегации Sup35NM в присутствии бактериальных клеток. В этом эксперименте в качестве положительного контроля мы использовали фибриллы Sup35NM, полученные *in vitro*. Ранее в ряде работ было показано, что агрегаты Sup35NM ускоряют агрегацию этого белка (Glover et al., 1997; Chen et al., 2007; Sant’Anna et al., 2016). Мы продемонстрировали, что амилоидные фибриллы Sup35NM, а также бактериальные клетки штамма VS39 с агрегатами этого белка на поверхности клеток, сокращают время начала агрегации (lag-фазы) Sup35NM *in vitro* (рисунок).

При этом клетки VS39, не продуцирующие гетерологичных белков, не имеют подобного эффекта.

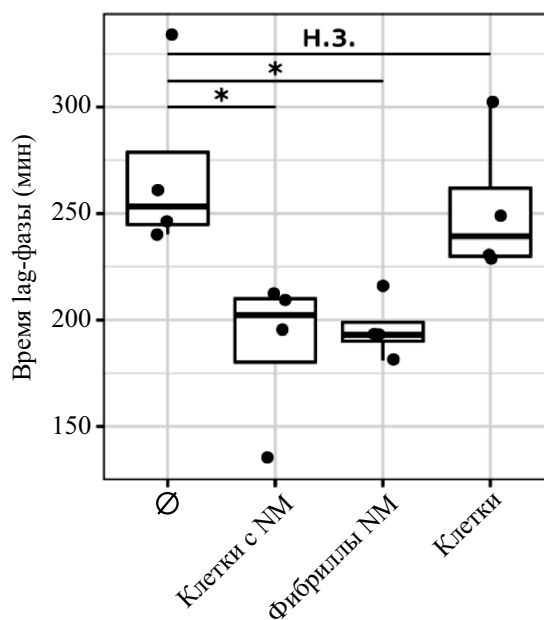


Рисунок. Бактериальные клетки с фибриллами Sup35NM ускоряют агрегацию белка Sup35NM *in vitro*. □ — спонтанная агрегация Sup35NM. “Н.з.” — отсутствие значимых отличий; * — p -value < 0.05 (критерий Вилкоксона).

Таким образом, мы показали, что амилоидные агрегаты на поверхности бактериальных клеток могут индуцировать агрегацию белка *in vitro*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Статья посвящается 300-летию СПбГУ. Работа выполнена с использованием ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” СПбГУ. Авторы также благодарят Л.Г. Данилова за техническую помощь в экспериментах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-74-10042.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Матиив А.Б., Трубицина Н.П., Матвеев А.Г., Барбитов Ю.А., Журавлева Г.А., Бондарев С.А. Амилоидные и амилоидоподобные агрегаты: многообразие и кризис термина // *Биохимия*. 2020. Т. 85. № 9. С. 1213–1239.
- Matiiv A. B., Trubitsina N. P., Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Amyloid and amyloid-like aggregates: diversity and the term crisis // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. V. 85. P. 1011–1034.
- Allen K. D., Wegrzyn R. D., Chernova T. A., Müller S., Newnam G. P., Winslett P. A., Wittich K. B., Wilkinson K. D., Chernoff Y. O. Hsp70 chaperones as modulators of prion life cycle: novel effects of Ssa and Ssb on the *Saccharomyces cerevisiae* prion [PSI⁺] // *Genetics*. 2005. V. 169. P. 1227–1242.
- Belousov M. V., Bondarev S. A., Kosolapova A. O., Antonets K. S., Sulatskaya A. I., Sulatsky M. I., Zhouravleva G. A., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Nizhnikov A. A. M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils. // *PLoS One*. 2018. V. 13. Art. e0191317.
- Chen B., Newnam G. P., Chernoff Y. O. Prion species barrier between the closely related yeast proteins is detected despite coaggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 2791–2796.
- Chiti F., Dobson C. M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 27–68.
- Glover J. R., Kowal A. S., Schirmer E. C., Patino M. M., Liu J. J., Lindquist S. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae* // *Cell*. 1997. V. 89. P. 811–819.
- Kachkin D. V., Volkov K. V., Sopova J. V., Bobylev A. G., Fedotov S. A., Inge-Vechtomov S. G., Galzitskaya O. V., Chernoff Y. O., Rubel A. A., Aksenova A. Y. Human RAD51 protein forms amyloid-like aggregates *in vitro* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. Art. 11657.
- Kosolapova A. O., Belousov M. V., Sulatskaya A. I., Belousova M. V., Sulatsky M. I., Antonets K. S., Volkov K. V., Lykholay A. N., Shtark O. Y., Vasileva E. N., Zhukov V. A., Ivanova A. N., Zykin P. A., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Tikhonovich I. A., Nizhnikov A. A. Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* // *Biomolecules*. 2019. V. 9. Art. 694.
- Ryzhova T. A., Sopova J. V., Zadorsky S. P., Siniukova V. A., Sergeeva A. V., Galkina S. A., Nizhnikov A. A., Shenfeld A. A., Volkov K. V., Galkin A. P. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Curr. Genet.* 2018. V. 64. P. 469–478.
- Sant’Anna R., Fernández M. R., Batlle C., Navarro S., de Groot N. S., Serpell L., Ventura S. Characterization of amyloid cores in prion domains // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 34274.
- Serio T. R., Lindquist S. L. [PSI⁺]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999. V. 15. P. 661–703.
- Sivanathan V., Hochschild A. Generating extracellular amyloid aggregates using *E. coli* cells // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 2659–2667.
- Sivanathan V., Hochschild A. A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. P. 1381–1390.
- Sopova J. V., Koshel E. I., Belashova T. A., Zadorsky S. P., Sergeeva A. V., Siniukova V. A., Shenfeld A. A., Velizhanina M. E., Volkov K. V., Nizhnikov A. A., Kachkin D. V., Gaginskaya E. R., Galkin A. P. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 18983.
- Taglialegna A., Matilla-Cuenca L., Dorado-Morales P., Navarro S., Ventura S., Garnett J. A., Lasa I., Valle J. The biofilm-associated surface protein Esp of *Enterococcus faecalis* forms amyloid-like fibers // *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2020. V. 6. P. 15. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0125-2>
- Vaneyck J., Segers-Nolten I., Broersen K., Claessens M. M. A. E. Cross-seeding of alpha-synuclein aggregation by amyloid

fibrils of food proteins // J. Biol. Chem. 2021. V. 296.
Art. 100358.
Willbold D., Strodel B., Schröder G.F., Hoyer W., Heise H.
Amyloid-type protein aggregation and prion-like

properties of amyloids // Chem. Rev. 2021. V. 121.
P. 8285–8307.

SHORT COMMUNICATIONS

Application of the Bacterial C-Dag System to Analyze the Ability of Amyloids to Seed Protein Aggregation *In Vitro*

N. P. Trubitsina¹, O. M. Zemlyanko^{1, 2}, G. A. Zhouravleva^{1, 2}, S. A. Bondarev^{1, 2, *}

¹Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg State University, 199034, Saint Petersburg, Russia

²Laboratory of Amyloid Biology, Saint Petersburg State University, 199034, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: s.bondarev@spbu.ru; stanislavspbg@gmail.com

Abstract. The search for new amyloid proteins, as well as the study of their properties, is an actual task, which can be solved by a number of different model systems. One of the most popular is the C-DAG approach. It is based on the analysis of aggregation of the investigated proteins on the surface of *Escherichia coli* cells. According to the original protocol, it can be used to demonstrate one of the characteristic properties of amyloids: the ability to bind the amyloid-specific dye Congo red and demonstrate apple-green birefringence. In addition, the C-DAG technique allows one to analyze the morphology of aggregates and their resistance to detergents. In this work, we tested using Sup35NM as an example whether aggregates on the surface of bacterial cells can act as inducers of aggregation of the corresponding protein.

Keywords: amyloids, C-DAG, *E. coli*, aggregation kinetics, Sup35

УДК 579.64:579.24

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2024 г. Н. А. Ушакова^{а, *}, В. Г. Правдин^б, И. В. Правдин^б, Л. З. Кравцова^б,
Е. С. Бродский^а, А. И. Амбарян^а

^аИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071, Россия

^бООО НТЦ БИО, Белгородская область, Шебекино, 309292, Россия

*e-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

Разработана технология получения пробиотического препарата путем твердофазного культивирования смешанной культуры *Bacillus subtilis* В-8130, *B. subtilis* В-2984, *B. subtilis* В-4099 на свекловичном жоме, что показано на двух препаратах (ПроСтор и ГербаСтор). Твердофазная ферментация проводилась в условиях ограниченного доступа кислорода при температуре $40 \pm 5^\circ\text{C}$, pH 7.5–8.0 и влажности смеси $45 \pm 3\%$ в течение 48–50 ч. При ферментации наблюдалось закисление реакционной массы, достоверное повышение титра клеток и образование биопленки на фитосорбенте. Среди идентифицированных летучих продуктов к 48 ч ферментации содержание уксусной кислоты, 3-метилбутановой кислоты, *n*-гваякола и 2-н-пентилфурана увеличивалось, а ароматических веществ фенольного ряда уменьшалось. Получены дополнительные метаболиты, усиливающие антибактериальные свойства и вкусовые качества пробиотического препарата. Образование биопленки позволило сохранить при высушивании (45°C) жизнеспособных клеток: в ПроСторе 1.2×10^8 КОЕ/г, и в ГербаСторе 0.58×10^8 КОЕ/г. В ГербаСторе с расширенным спектром лекарственных растений снижение титра бацилл связано с обезвоживанием при сушке и с антибактериальными свойствами фитокомпонента.

Ключевые слова: пробиотик, *Bacillus subtilis*, твердофазная ферментация, биопленка, метаболиты твердофазной ферментации

DOI: 10.31857/S0026365624050168

В системе кормопроизводства широко применяются пробиотики — класс микробиологических препаратов для регуляции и улучшения состава кишечной биоты животных. Современные эффективные кормовые пробиотические препараты представляют собой композиции пре-, пробиотиков и их метаболитов (Sánchez et al., 2016; Шендеров и соавт., 2017; Ushakova et al., 2021). Разные препараты по-разному и с разной эффективностью корректируют работу желудочно-кишечного тракта организма хозяина. Это определяется как особенностью штамма-пробиотика, так и формой, в которой бактерии вводятся в организм животного. Биологическая эффективность повышается при получении пробиотиков в виде биопленки на твердом носителе. Препараты, основанные на получении биопленки пробиотиков, отличаются сохранением жизнеспособных клеток, их метаболитов, наличием сигнальных веществ бактериального происхождения, влияющих

на гомеостаз многоклеточных организмов-хозяев (Горшков и соавт., 2010). Биологическая активность кормовых добавок повышается при комбинировании пробиотиков с лекарственными растениями (Правдин и соавт., 2011; Pavlov et al., 2014). Разносторонняя направленность действия пробиотической составляющей и фитокомпонентов обеспечивает продуктивность животных, увеличение перевариваемости кормов, нормализацию работы желудочно-кишечного тракта, укрепление иммунитета, возможность сохранения поголовья при отказе от использования кормовых антибиотиков.

Цель работы — изучение процесса твердофазного культивирования смешанной культуры бактерий р. *Bacillus* на природном сорбенте (микроизмельченном свекловичном жоме) и влияния факторов стадии ферментации, высушивания и комбинации с лекарственными растениями на жизнеспособность бацилл.

В работе использовали штаммы бактерий из коллекции ВКПМ, перспективные для получения пробиотических препаратов для замены кормовых антибиотиков согласно свойствам, описанным в их паспортах: *B. subtilis* ВКПМ В-8130 (кишечный симбионт с эндогликаназной активностью); *B. subtilis* ВКПМ В-2984 (антагонист *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*); *B. subtilis* ВКПМ В-4099 (применяется для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных и птицы).

Применяли двустадийную технологию получения биологически активной кормовой добавки, включающую раздельное глубинное аэробное культивирование на глюкозо-пептонной среде Эйкмана (“Биотехновация”, Россия) пробиотических штаммов с получением жидкой культуры (первая стадия), и последующее твердофазное культивирование смешанной культуры (1 : 1 : 1) *B. subtilis* ВКПМ В-8130, титр клеток $(3.5 \pm 0.5) \times 10^9$ КОЕ/мл, *B. subtilis* ВКПМ В-2984, титр клеток $(5.0 \pm 1.2) \times 10^9$ КОЕ/мл, *B. subtilis* ВКПМ В-4099, титр клеток $(6.5 \pm 0.9) \times 10^9$ КОЕ/мл на свекловичном жоме при ограниченном доступе кислорода в закрытом полиэтиленовом пакете с замком Zip-Lock, полностью заполненном ферментационной массой (вторая стадия).

Смешанную культуру бацилл вносили в количестве 20% от конечной массы смеси с жомом. Использовали стерилизованный автоклавированием микроизмельченный свекловичный жом, размер частиц не более 1 мм. Твердофазную ферментацию проводили при температуре $40 \pm 5^\circ\text{C}$, pH 7.5–8.0 и влажности смеси $45 \pm 3\%$ в течение 48 ч. После высушивания (45°C , влажность 8%) к полученной смеси добавляли 10% порошка лекарственных растений (смесь в равных количествах: эхинацея, расторопша в варианте ПроСтор, и эхинацея, душица, зверобой, лист подорожника, расторопша, цветы ромашки в варианте ГербаСтор). Смесь перемешивали в течение 0.5 ч и подвергали дроблению до получения порошка однородной массы, в которой определяли содержание клеток бактерий р. *Bacillus*.

Количество жизнеспособных клеток в жидкой культуре (КОЕ/мл) определяли стандартным методом серийных разведений; в сыром или сухом препарате КОЕ/г определяли методом серийных разведений 10% водной взвеси порошка после встряхивания 30 мин на лабораторном шейкере ПЭ-6500, “ЭКРОСХИМ”, Россия (в соответствии с ГОСТ Р 54065-2010). Число повторностей при определении КОЕ – трехкратное. Количество повторностей ферментации для ПроСтора – 7, для ГербаСтора – 4. Контроль pH осуществляли с использованием pH-метра Экотест 2000 (НПП “Эко-никс”, Россия).

Анализ летучих органических соединений проводили методом твердофазной микроэкстракции

(SPME) (Mottaleb, 2014). 10 г сухого продукта твердофазной ферментации до смешения с травами помещали в стеклянную емкость объемом 0.5 л, добавляли 2 мкл раствора внутреннего стандарта D_8 -толуола (5 мкг) в метаноле, вводили сорбционный стержень и выдерживали 1 ч при температуре 40°C . Сорбционный стержень затем вводили в хромато-масс-спектрометрическую систему, включающую газовый хроматограф Trace и масс-спектрометрический детектор ThermoFinnigan Polaris Q (“ThermoElectron”, США). Условия анализа: кварцевая капиллярная колонка $30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм}$ с неподвижной фазой SGE BPX-5 (слой 0.25 мкм), программирование температуры от 40 до 280°C со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$, температура инжектора 240°C , интерфейса – 240°C ; ионизация электронным ударом при энергии электронов 70 эВ. Скорость газа-носителя (He) – 0.5 мл/мин. Оценку концентрации летучих соединений проводили по методу внутреннего стандарта. Анализ делали в трех повторностях.

Сканирующую электронную микроскопию осуществляли на микроскопе Tescan Mira 3 LMH (“Tescan”, Чехия). Препараты в виде порошка наносили на поверхность двустороннего проводящего скотча для микроскопии Supplies (США), наклеенного на предметный столик. Напыление осуществляли золотом на установке Q150R ES Plus (“Quorum Technologies Ltd”, Великобритания).

Сравнение количества клеток в препаратах проводили с помощью Robust ANOVA (Wilcox, 2017), с использованием метода бутстрэп (700 случайно сгенерированных из исходной выборки), так как распределение выборок полученных данных отличалось от нормального (результаты теста Шапиро–Уилкинсона по одной из выборок: $p = 0.007$, $W = 0.802$). При сравнении выборок использовали непараметрические методы и медиану по данным титра клеток и кислотности, применяли тест Браннера–Манзела (Karch, 2023). Для статистического анализа данных использовали программу Jamovi 2.4.8.0.

Электронно-микроскопические исследования свекловичного жома показали, что его частицы представляют собой трубчато-складчатую структуру с большим количеством микропор (рисунок, а), что указывает на потенциально высокие сорбционные свойства фитоносителя.

При твердофазном культивировании смешанной культуры бактерий на поверхности частиц носителя развивались клетки бактерий, и ко вторым суткам наблюдалось образование биопленки (рисунок, б, в). При этом отмечено закисление реакционной массы с начального значения pH 7.6 до pH 6.6 на первые сутки и до pH 5.8 на 48 ч культивирования, а также повышение общего титра клеток (таблица).

Анализ данных с использованием Robust ANOVA показал, что титр клеток зависел от фактора “стадия ферментации”, но не зависел от фактора тип препарата – ПроСтор или ГербаСтор ($p < 0.001$

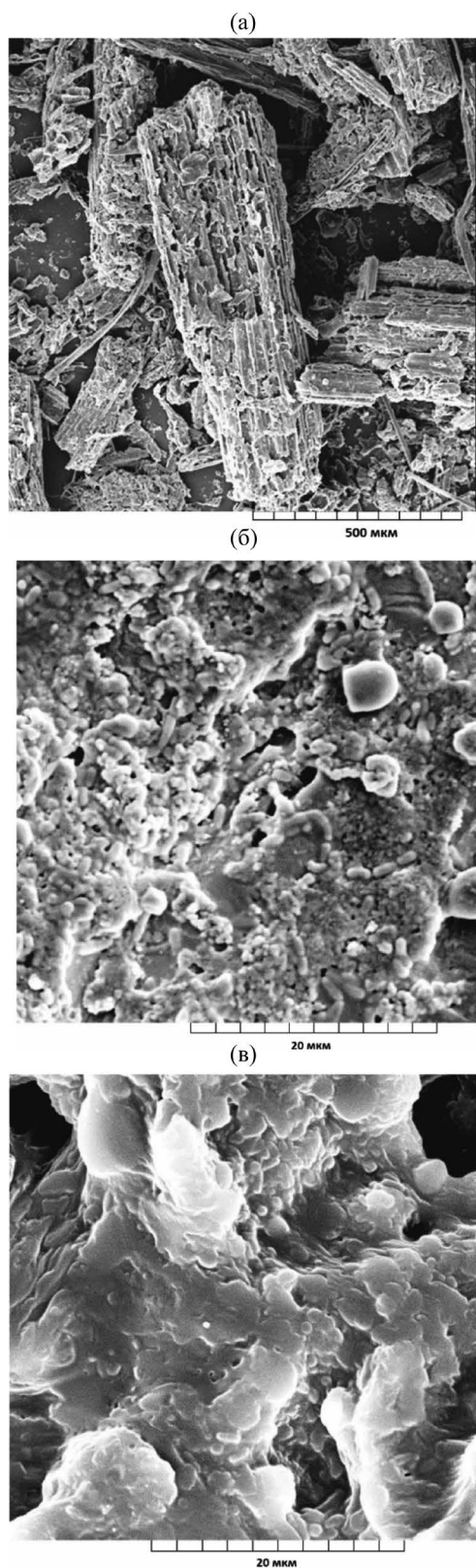


Рисунок. Биопленка в препаратах: а — вид частиц свежескловичного жома; б — развитие бацилл на поверхности носителя в препарате ПроСтор, 24 ч; в — биопленка на поверхности носителя в препарате ГербаСтор, 48 ч.

и $p = 0.086$ соответственно). Пост-хок сравнение уровней фактора “стадия ферментации” выявило, что титр клеток через 48 ч после начала ферментации был достоверно выше, чем до начала твердофазной стадии культивирования ($\psi\text{-hat} = -0.661$, $p < 0.001$). Численность клеток в сырых препаратах 45% влажности по завершении ферментации составила для ПроСтор 1.45×10^8 КОЭ/г и ГербаСтор 6.65×10^8 КОЭ/г. Содержание клеток после высушивания до 8% влажности в конечном препарате с фитокомпонентами по значениям медианы: 1.2×10^8 КОЕ/г для ПроСтор (pH 6.2) и 0.58×10^8 КОЕ/г для ГербаСтор (pH 5.9). При расчете на абсолютно сухой вес (АСВ) титров клеток препаратов по завершении ферментации этот показатель в сыром ГербаСтор был достоверно выше, чем в препарате ПроСтор — тест Манна—Уитни: статистика теста (U) = 4.5, $p = 0.014$. Достоверных различий в количестве клеток в конечных препаратах 8% влажности между ПроСтор и ГербаСтор не было (тест Манна—Уитни: статистика теста (U) = 12, $p = 0.345$). Титр клеток по АСВ в этих конечных препаратах также достоверно не различался (тест Манна—Уитни: статистика теста (U) = 12, $p = 0.345$). При сравнении расчетных показателей по АСВ титра клеток сырых продуктов ферментации 45% влажности с учетом 10% добавления фитокомпонентов и титра клеток в конечном препарате выявлено, что для ГербаСтор получение конечного продукта сопровождалось падением показателя с 11.9×10^8 КОЕ/г до 0.6×10^8 КОЕ/г, т.е. в 18 раз. Это может объясняться не только высушиванием, но также ингибирующим действием лекарственных растений с антимикробными свойствами — душицы, зверобоя, лопуха, ромашки (Корсун, Корсун, 2010). В варианте ПроСтор с расторопшей для поддержания печени и иммуностимулирующей эхинацеей сохранение высокого титра клеток в сухом препарате свидетельствовало о защитном эффекте биопленки при обезвоживании и отсутствии значимого отрицательного действия этих фитокомпонентов на жизнеспособность микробных клеток: снижение числа клеток (с 2.4×10^8 КОЕ/г до 1.6×10^8 КОЕ/г) составило 1.5 раза.

В ходе твердофазного культивирования на свежескловичном жоме смешанной культуры бактерий *B. subtilis* ВКПМ В-8130, *B. subtilis* ВКПМ В-2984, *B. subtilis* ВКПМ В-4099 на примере ПроСтора показано, что к 48 ч увеличивается содержание идентифицированных летучих соединений: уксусной кислоты с 0.010 ± 0.002 до 0.025 ± 0.0004 мкг/г, 3-метилбутановой кислоты с 0.002 ± 0.0003 до 0.0034 ± 0.0004 мкг/г, а также *n*-гваякола с 0.005 ± 0.0005 до 0.015 ± 0.002 мкг/г и 2-н-пентилфурана 0.006 ± 0.0009 до 0.0015 ± 0.0002 мкг/г. Эти данные соответствуют снижению pH реакционной смеси. В то же время наблюдалось снижение количества выявленных ароматических

Таблица. Показатели титра клеток в препаратах при твердофазной ферментации на свекловичном жоме

Препарат	Титр клеток, КОЕ/г*			
	Продукт твердофазной ферментации, сут			Высушенный препарат
	0	1	2	
ПроСтор	1.50×10^8	1.60×10^8	1.45×10^8 (на сухую массу – 2.4×10^8)	1.20×10^8 (на сухую массу – 1.98×10^8)
ГербаСтор	1.05×10^8	1.75×10^8	6.65×10^8 (на сухую массу – 1.1×10^9)	0.58×10^8 (на сухую массу – 9.59×10^7)

*КОЕ/г сырой массы для твердофазной стадии и КОЕ/г сухого конечного препарата. Приведены значения медианы.

веществ фенольного ряда (фенол, ацетилфенол, крезол, ацетофенон), а также диметилпиразина, 2-н-пентилфурана, 3-изопропоксibenзальдегида и салицилового альдегида, что нивелирует антипитательные свойства свекловичного жома и подтверждает способность смешанной культуры бактерий р. *Bacillus* повышать качество пищи, расщепляя в организме токсические вещества. Выделение уксусной кислоты подтверждает наличие бактериальной ферментации. Увеличение содержания 3-метилбутановой кислоты свидетельствует о протекании элементов брожения в заданных условиях твердофазного культивирования. Гваякол – простой фенол с биологической активностью, антиоксидант, используется при диареях, действуя дезинфицирующе и противогнилостно (DrugBank, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11359>). 2-пентилфуран – ароматическое вещество, которое могут синтезировать бациллы, например, *B. megaterium* XTBG34 (Zou et al., 2010), – является безопасной пищевой добавкой, усилителем вкуса (Cha et al., 2021).

Твердофазная стадия культивирования использованных в работе бактерий р. *Bacillus* на органическом носителе позволила получить защищающую клетки биопленку и сохранить высокий титр жизнеспособных клеток после сушки, а также получить дополнительные метаболиты, усиливающие антибактериальные свойства и вкусовые качества пробиотического препарата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП “Инструментальные методы в экологии” при ИПЭЭ РАН. Работа выполнена за счет бюджетного финансирования, тема № 51 (0109-2019-0008).

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

- Горшков В.Ю., Петрова О.Е., Даминова А.Г., Гоголев Ю.В. Система межклеточной коммуникации энтеробактерии *Erwinia carotovora* при формировании адаптивного ответа к условиям неблагоприятным для роста // Доклады АН. 2010. Т. 430. С. 268–272.
- Корсун Е.В., Корсун В.Ф. Фитотерапия. Традиции российского травничества. М.: Центрполиграф, 2010. 882 с.
- Правдин В.Г., Кравцова Л.З., Ушакова Н.А. Способ получения комплексной биологически активной кормовой добавки для животных, птицы и рыбы с пробиотиками и лекарственными травами / Патент РФ № 2477614 от 11.06.2011. Оpubл. 20.01.2013. Бюл. № 2.
- Шендеров Б.А., Синица А.В., Захарченко М.М. Метабиотики: вчера, сегодня, завтра. СПб.: Крафт, 2017. 80 с.
- Cha D. H., Roh G. H., Hesler S. P., Wallingford A., Stockton D. G., Park S. K., Loeb G. M. 2-Pentylfuran: a novel repellent of *Drosophila suzukii* // Pest. Manag. Sci. 2021. V. 77. P. 1757–1764.
- Karch J. D. Bmtest: A jamovi module for Brunner–Munzel’s test—a robust alternative to Wilcoxon–Mann–Whitney’s test // Psych. 2023. V. 5. P. 386–395.
- Mottaleb M. A. Solid-phase microextraction (SPME) and its application to natural products // Handbook of chemicals and biological plant analytical methods. Ch. 5. / Ed. K. Hostettmann. Wiley, 2014. P. 105–127.
- Pavlov D. S., Ushakova N. A., Pravdin V. G., Kravtsova L. Z., Liman C. A., Ponomarev S. V. The ProStor and Ferm KM complex probiotic additives: biotechnological innovation for enhancing the quality of domestic fish mixed feed // News in chemistry, biochemistry and biotechnology: state of the art and prospects of development. Nova Science Publishers. New York. 2014. V. 20. P. 239–244.

Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease // Mol. Nutrit. Food Res. 2016. V. 61. Art. 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>

Ushakova N.A., Pravdin V.G., Kravtsova L.Z., Ponomarev S.V., Gridina T.S., Ponomareva E.N., Rudoy D.V.,

Chikindas M.L. Complex bioactive supplements for aquaculture – evolutionary development of probiotic concepts // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2021. V. 13. P. 1696–1708.

<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09835-y>

Wilcox R.R. Introduction to robust estimation and hypothesis testing. 4th edn. Academic Press, 2017. 810 p.

SHORT COMMUNICATIONS

Solid-State Method of Production of Probiotic Feed Additives for Farm Animals

N. A. Ushakova^{1, *}, V. G. Pravdin², I. V. Pravdin², L. Z. Kravtsova²,
E. S. Brodsky¹, and A. V. Ambaryan¹

¹ A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, 119071, Russia

² Scientific and Technical Center BIO LLC, Belgorod region, Shebekino, 309292, Russia

*e-mail: naushakova@gmail.com

Abstract. A technology has been developed for producing a probiotic preparation by solid-state cultivation of a mixed culture of *Bacillus subtilis* B-8130, *B. subtilis* B-2984, *B. subtilis* B-4099 on beet pulp, which is shown in two preparations (ProStor and GerbaStor). Solid-state fermentation was carried out under conditions of limited access to oxygen at a temperature of $40 \pm 5^\circ\text{C}$, pH 7.5–8.0 and mixture humidity $45 \pm 3\%$ for 48–50 hours. During the process, acidification of the reaction mass was observed, a significant increase in cell titer and the formation of a biofilm on phytosorbent. The cell titer depended on the factor “stage of fermentation”, but did not depend on the factor type of preparation – ProStor or GerbaStor. Among the identified volatile products, by 48 hours of fermentation the content of acetic acid, 3-methylbutanoic acid, *p*-guaiacol and 2-n-pentylfuran increased, and aromatic substances of the phenolic series decreased. Additional metabolites were obtained that enhance the antibacterial properties and taste of the probiotic preparation. The formation of a biofilm made it possible to preserve viable cells during drying (45°C): in ProStor 1.2×10^8 CFU/g, and in GerbaStor 0.58×10^8 CFU/g. In HerbaStore with an expanded range of medicinal plants, a decrease in the titer of bacilli is associated with dehydration during drying and with the antibacterial properties of phytocomponents.

Keywords: probiotic, *Bacillus subtilis*, solid-state fermentation, biofilm, metabolites of solid-state fermentation

УДК 579.24+579.222

ПРОДУКЦИЯ АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КЛЕТКАХ *LACTOBACILLUS BREVIS*

© 2024 г. Н. А. Сидорова^а, *, А. И. Савушкин^а

^аПетрозаводский государственный университет, Петрозаводск, 185035, Россия

*e-mail: vanlis@petrsu.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После обработки 29.05.2024 г.

Принята к публикации 30.05.2024 г.

В результате выполненного исследования получены первичные данные по кинетике роста и продукции антимикробных соединений бактериями *Lactobacillus brevis* 2kGv22-17. В условиях эксперимента изучен антибактериальный эффект суспензии лактобактерий, протопластов и внутриклеточная антибактериальная активность в лизатах клеток. Кинетика роста оценена в статических условиях с помощью персонального биореактора RTS-1C. Антагонистическая активность лактобактерий исследована в серии экспериментов с использованием в качестве индикаторных тест-культур *Cytophaga psychrophila* IM-87, *Flexibacter columnaris* IM-216 и *Pseudomonas fluorescens* IM-43. Опытным путем подтверждена способность исследуемых лактобактерий к продукции антимикробных соединений в экспоненциальной фазе роста. Наиболее выраженный эффект подавления роста обнаружен в присутствии протопластов лактобактерий.

Ключевые слова: антимикробные соединения, микробный антагонизм, кинетика роста, лизаты клеток, протопласты, фазы роста, *Lactobacillus brevis*

DOI: 10.31857/S0026365624050174

Одной из распространенных форм взаимоотношений микроорганизмов в природе является антагонизм, при котором бактерии одного вида угнетают жизнедеятельность представителей других видов. При изучении антагонистической активности пробиотиков (Бухарин и соавт., 2010, 2014) и описании механизмов влияния ассоциативных микроорганизмов на антагонистическую активность бактерий (Семенов и соавт., 2011) установлено, что ассоцианты способны стимулировать антагонизм, влиять на него индифферентно, вызывать ингибирующий или инвертирующий эффекты. Микроорганизмы в составе филлосферы и эндосферы растений отвечают за антагонизм к большому спектру фитопатогенов *Erysiphe graminis*, *Cladosporium fulvum*, *Phytophthora* sp. и др. (Каблова и соавт., 2015), повышают продуктивность растения, контролируют реакции адаптации к стрессам и прямой стимуляции роста растений (Lamont et al., 2017). Лактобактерии, выделенные из микрофлоры растений, способны вырабатывать органические кислоты и ряд антимикробных соединений, что сделало их незаменимыми при консервировании продуктов растительного и животного происхождения (de Vuyst, Vandamme, 1994) и использования в качестве пробиотиков (Naidu et al., 1999).

Для реализации цели исследования, направленной на изучение особенностей продукции антимикробных соединений лактобактериями, использован штамм *Lactobacillus brevis* 2kGv 22-17, выделенный из эпифитной микрофлоры ежи сборной (*Dactylis glomerata*). Штамм *Lactobacillus brevis* 2kGv 22-17 предоставлен сотрудниками ООО “Микробиом” инновационного сектора Петрозаводского госуниверситета из фонда Коллекции молочнокислых бактерий лаборатории микробиологии. Кинетику роста лактобактерий и время достижения максимальной оптической плотности оценивали на жидкой среде MRS (Man et al., 1960) в статических температурных условиях персонального биореактора RTS-1C (“Biosan”, Латвия) с программным обеспечением и функцией контроля роста микроорганизмов в режиме реального времени.

Определение способности лактобактерий продуцировать антимикробные соединения выполняли на основе метода диффузии антибактериальных субстанций в агар [ОФС.1.2.4.0010.15.]. Для проведения эксперимента использовали ночную культуру молочнокислых бактерий, которую выращивали в среде MRS в течение 12 ч (Kurokawa, Ying, 2017). Для исследования продукции антимикробных соединений клетками *L. brevis* использовали

плотную питательную среду, состоящую из ГМФ бульона (ООО “НИЦФ”, Россия) – 30 г/л, агар-агара бактериологического Васто (“BD”, США) – 17 г/л и глюкозы – 10 г/л. Среду разливали в стерильные чашки Петри в два слоя. После застывания нижнего слоя, в чашку Петри вносили верхний слой питательной среды, которую предварительно смешивали с суспензией, находящейся в стационарной фазе роста индикаторной культуры, в объеме 10 мл. В качестве индикаторных или тест-культур использовали *Cytophaga psychrophila* IM-87, *Flexibacter columnaris* IM-216 и *Pseudomonas fluorescens* IM-43, предоставленные сотрудниками лаборатории микробиологии НИЦ по аквакультуре Петрозаводского госуниверситета из фонда Коллекции ассоциативной микрофлоры рыб. В готовой среде на равном расстоянии друг от друга делали лунки диаметром около 5 мм. В лунки вносили по 0.1 мл микробной суспензии лактобактерий *L. brevis* 2kGv 22-17 (опыт 1), протопласты (опыт 2) и лизат клеток (опыт 3). Посевы выдерживали при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1–2 ч, чтобы обеспечить равномерное распределение и рост микроорганизмов. Затем посевы культивировали при температуре $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ в течение 16–18 ч, после чего регистрировали зоны задержки роста бактериального газона вокруг лунок. Диаметры зон угнетения роста индикаторных микроорганизмов оценивали с точностью до 0.1 мм. Протопласты лактобактерий готовили из культуры, выращенной в MRS бульоне в течение 12 ч. Клетки осаждали на центрифуге SIGMA 1-15P при 3000 об./мин в течение 10 мин. Супернатанты обрабатывали лизоцимом (“AppliChem”, Германия) в концентрации 1.5 мг/л в присутствии стабилизатора

осмотического давления 0.5% NaCl и фильтровали через мембранные фильтры “MF-Millipore” (диаметр пор 0.22 мкм) (Алешина и соавт., 2017). Для получения лизатов клеток использовали 70% изопропанол и 0.1% трифторуксусную кислоту, согласно методу определения антимикробной активности лизата клеток (Field et al., 2008; Миралимова и соавт., 2016).

Все эксперименты ставили в трехкратной повторности, статистическую обработку данных выполняли на основе программы Statistica 6.0.

В результате культивирования в статических условиях за 58 ч эксперимента получена характеристика роста культуры *L. brevis* 2kGv 22-17. На основе данных по культивированию лактобактерий с использованием биореактора RTS-1C построен типовой график роста лактобактерий. Данные обработаны с помощью программного обеспечения Grant Instruments “Labvise”, которое позволяет контролировать рост микроорганизмов в режиме реального времени. В процессе культивирования использовалось вихревое перемешивание ингредиентов (Vortextypemixing) с интервалом в 10 мин. Адаптация микроорганизма к условиям культивирования длилась в течение 11 ч. С 12 по 21 ч отмечалась стадия экспоненциального роста, с последующим переходом в стадию стационарного роста, что соответствовало 2.14 OD и значениям μ (h^{-1}) – 0.02 в 130 точке измерения. Установлено, что антагонистическая активность выявляется в культуре в период экспоненциальной фазы, которая длилась в течение 9 ч. Также антибактериальная активность сохраняется в среде и при переходе развития культуры в стационарную стадию роста и продолжается в течение 37 ч (рисунок).

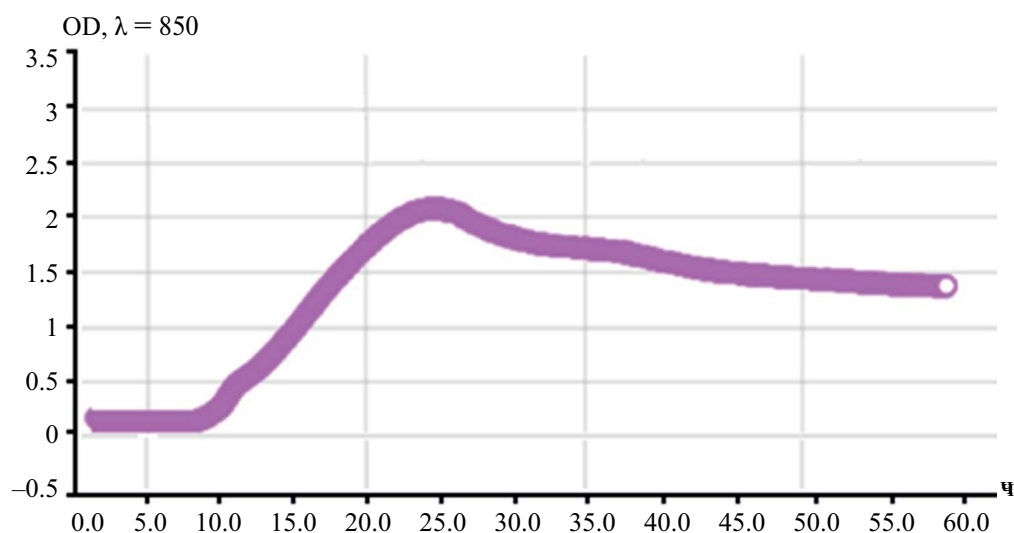


Рисунок. Кривая непрерывного роста бактерий *L. brevis* 2kGv 22-17 в жидкой среде MRS при 37°C с периодическим вихревым перемешиванием в течение 58 ч с интервалом каждые 10 мин.

Таблица. Диаметр зоны задержки роста индикаторных тест-культур

Тест-культуры	Микробная суспензия, опыт 1	Протопласты, опыт 2	Лизат клеток, опыт 3
	Зона торможения роста тест-культур, мм		
<i>C. psychrophila</i> IM-87	9.8 ± 0.2	18.6 ± 0.8	0
<i>F. columnaris</i> IM-216	9.3 ± 0.2	18.2 ± 0.4	0
<i>P. fluorescens</i> IM-43	11.4 ± 0.2	21.3 ± 0.6	0

В присутствии суспензии лактобактерий *L. brevis* 2kGv 22-17 антимикробная активность проявлялась в виде незначительного подавления роста индикаторных микроорганизмов. Средние значения диаметра зоны задержки роста тест-культур *C. psychrophila*, *F. columnaris* и *P. fluorescens* находились в пределах от 9.30 ± 0.2 мм (для *F. columnaris*) до 11.4 ± 0.2 мм (для *P. fluorescens*). Присутствие лизатов исследуемых бактерий не привело к антибактериальному эффекту в отношении индикаторных видов бактерий, во всех вариантах опыта наблюдалось проявление роста культур. Наиболее выраженной антимикробной активностью обладали только протопласты штамма *L. brevis* 2kGv, о чем свидетельствовали большие зоны торможения роста для *P. fluorescens* (21.3 ± 0.6 мм), *C. psychrophila* (18.6 ± 0.8 мм) и *F. columnaris* (18.2 ± 0.4 мм). Наибольший бактерицидный эффект обнаружен в отношении псевдомонад. Зоны торможения роста тест-культур в присутствии микробной суспензии, протопластов и лизата клеток *L. brevis* 2kGv 22-17 представлены в таблице.

В результате изучения продукции антимикробных соединений в клетках *L. brevis* 2kGv 22-17 установлено, что наиболее выраженной антимикробной активностью обладают протопласты исследуемых лактобактерий. Наибольший эффект подавления роста тест-культуры обнаружен в отношении *P. fluorescens*. В присутствии протопластов лактобактерий зона торможения роста индикаторного микроорганизма достигала 21 мм. Благодаря выполненному исследованию кинетики роста *L. brevis* 2kGv 22-17 установлено, что адаптация исследуемых бактерий к условиям культивирования длится 11 ч, экспоненциальная фаза — 9 ч и стабильная стационарная фаза роста — 37 ч. Учитывая особенность молочнокислых бактерий продуцировать антимикробные соединения в разные периоды роста микропопуляции, применение данного подхода позволяет с высокой точностью по большому количеству заданных параметров, таких как температура культивирования, оптическая плотность, удельная скорость роста, продолжительность лаг-фазы, фазы экспоненциального роста и стационарной фазы, проанализировать и предсказать физиологическое состояние микроорганизма для объективного мониторинга за его антагонистической активностью. Бактерии *L. brevis* 2kGv 22-17

способны продуцировать антимикробные соединения в процессе роста на питательной среде MRS при исходном pH 6.2 и постоянном контроле температуры биопроцесса 37°C. Продукция антибактериальных соединений начинается через 12 ч после начала культивирования в экспоненциальной фазе роста, что подтверждается данными других исследователей (Todorov, 2005). Наиболее выраженный антагонизм исследуемого штамма *L. brevis* 2kGv 22-17 выявлен в случае использования протопластов продуцента, в присутствии которых величина задержки роста индикаторных тест-культур изменялась от 1.2 до 21.3 см. Полученный эффект можно связать с тем, что антимикробным соединениям *L. brevis* 2kGv 22-17 не надо преодолевать барьер в виде клеточной стенки, за счет чего и возрастает обнаруженное бактерицидное действие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 322-23 (Соглашение № 23-16-20026), проводимого совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

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

Алешина. Е.С., Дроздова Е.А., Романенко Н.А. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса: учебное пособие. Оренбург: ООО ИПК “Университет”, 2017. С. 49–52.

- Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010. Т. 12. С. 347-352.
- Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург: ИКВС, 2014. 210 с.
- Каблова М.А., Шурхно Р.А., Сироткии А.С. Молочно-кислые бактерии в сельскохозяйственном производстве // Вестник технологического университета. 2015. Т. 18. № 23. С. 145-149.
- Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Кукишена Г.Д., Ибрагимова А., Сохибназарова Х. Синтез бактериоциноподобного вещества штаммом, выделенным из квашеной капусты // Научный результат. Медицина и фармация. 2016. Т. 2. № 3. С. 1-8.
- Семенов Л.В., Черкасов С.В. Влияние ассоциативных микроорганизмов на антагонистическую активность бактерий // Вестник Новосибирского гос. унта. Сер. Биол. клин. мед. 2011. Т. 9. № 3. С. 20-26.
- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Microbiol. 1960. V. 23. P. 130-135.
- De Vuyst L., Vandamme E.J. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance // Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications / Eds. De L. Vuyst, E.J. Vandamme. Boston, MA: Springer US, 1994. P. 1-11.
- Field D., Connor P.M.O., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. The generation of nisin variants with enhanced activity against specific Gram-positive pathogens // Mol. Microbiol. 2008. V. 69. P. 218-230.
- Kurokawa M., Ying B.W. Precise, high-throughput analysis of bacterial growth // J. Visual. Exper. 2017. V. 127. C. 156-197.
- Lamont J.R., Wilkins O., Bywater-Ekegard M., Smith D.L. From yogurt to yield: potential applications of lactic acid bacteria in plant production // Soil Biol. Biochem. 2017. V. 111. P. 1-9.
- Naidu A.S., Bidlack W.R., Clemens R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB) // Crit. Rev. Food Sci. Nutrit. 1999. V. 39. P. 13-126.
- Todorov S.D., Dicks L.M. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza // Food Technol. Biotechnol. 2005. V. 43. P. 165-173.

SHORT COMMUNICATIONS

Production of Antimicrobial Compounds in *Lactobacillus brevis* Cells

N. A. Sidorova¹, *, and A. I. Savushkin¹

¹Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, 185035, Russia

*e-mail: vanlis@petrsu.ru

Abstract. As a result of the study, primary data were obtained on the kinetics of growth and production of antimicrobial compounds by the bacteria *Lactobacillus brevis* 2kGv22-17. Under experimental conditions, the antibacterial effect of a suspension of lactobacilli, protoplasts and intracellular antibacterial activity in cell lysates were studied. Growth kinetics were assessed under static conditions using a personal bioreactor RTS-1C. The antagonistic activity of lactobacilli was studied in a series of experiments using *Cytophaga psychrophila* IM-87, *Flexibacter columnaris* IM-216 and *Pseudomonas fluorescens* IM-43 as indicator test cultures. The ability of the studied lactobacilli to produce antimicrobial compounds in the exponential growth phase was experimentally confirmed. The most pronounced effect of growth suppression was found in the presence of lactobacilli protoplasts.

Keywords: antimicrobial compounds, microbial antagonism, growth kinetics, cell lysates, protoplasts, growth phases, *Lactobacillus brevis*