

## БИОРАЗНООБРАЗИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *CRENOMYTILUS GRAYANUS*

© 2023 г. Т. И. Дункай<sup>a, b</sup>, Е. А. Богатыренко<sup>a, \*</sup>, А. В. Ким<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690992 Россия

<sup>b</sup>Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, 690041 Россия

<sup>c</sup>ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

\*e-mail: bogatyrenko.ea@dyfu.ru

Поступила в редакцию 10.03.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 30.03.2023 г.

Впервые проведен анализ по изучению биоразнообразия бактериальных сообществ пищеварительной системы мидии Грея из прибрежных вод Японского моря с хроническим антропогенным загрязнением на основе метабаркодинга. В микробиоте гидробионтов, помимо типичных морских бактерий, были обнаружены представители таксонов, характерных для местообитаний, загрязненных нефтью (*Rhodobacteraceae*, *Corynebacteriaceae*), тяжелыми металлами (*Asinibacterium*) и неочищенными коммунально-бытовыми стоками (*Cloacibacterium*, *Globicatella*). В ходе исследований получена и таксономически охарактеризована коллекция из 411 штаммов культивируемых гетеротрофных бактерий. Показано, что кишечный микробиом моллюсков характеризуется уникальным таксономическим составом в зависимости от района обитания животных. Изучена способность штаммов бактерий, выделенных из пищеварительной системы мидии Грея, разлагать различные питательные субстраты (сахара, аминокислоты, полисахариды) и ксенобиотики (нефтяные углеводороды, бисфенол А, атразин). Большинство полученных изолятов были способны к расщеплению широкого спектра органических субстратов, 13% (54 штамма) окисляли углеводороды нефти, 1% (4 штамма) – бисфенол А и 0.5% (2 штамма) – атразин. Высказано предположение об участии микробиома мидии Грея в симбионтном пищеварении и детоксикации моллюска.

**Ключевые слова:** *Crenomytilus grayanus*, микробиом, NGS, антропогенное загрязнение, атразин, бисфенол, углеводороды

**DOI:** 10.31857/S0026365623600086, **EDN:** RKHMYP

Микробиоценозы, занимающие ту или иную экологическую нишу в организме хозяина, характеризуются сложной иерархической структурой, различными межвидовыми отношениями, многоступенчатыми метаболическими процессами. Кроме того, они выполняют множество полезных функций для организма хозяина: повышают его колонизационную резистентность к патогенным микроорганизмам, участвуют в переваривании пищи, детоксикации, поддержании водного, солевого и рН-гомеостаза, синтезируют аминокислоты, органические кислоты, витамины и другие метаболиты, а также могут выступать источником питательных веществ при стрессе (Harris, 1993).

Мидии являются ключевым звеном морских экосистем и одним из перспективных объектов коммерческого воспроизводства среди двустворчатых моллюсков. Учитывая важную роль индигенной микрофлоры в поддержании здоровья

гидробионтов, в современной литературе представлено большое количество научных работ, посвященных изучению микробиоты, ассоциированной с мидиями. Микробное разнообразие описано у таких традиционных объектов аквакультуры, как *Mytilus galloprovincialis* (Cavallo et al., 2009; Santisi et al., 2015), *M. coruscus* (Li et al., 2018), *M. trossulus* (Беленева и соавт., 2003) и *M. edulis* (Bezgachina, Kozitskiy, 2010; Motiei, 2014). Установлено, что состав микробиоты двустворчатых моллюсков существенно зависит от целого ряда факторов: вида гидробионта и его генетических особенностей, стадии его развития, типа органа или ткани, физико-географических особенностей района обитания, времени года, температуры, концентрации растворенного кислорода в воде, питания, наличия в среде поллютантов и т.п. (Pailard et al., 2022). Несмотря на это, чаще всего в структуре бактериальных сообществ разных видов мидий обнаруживают представителей следующих

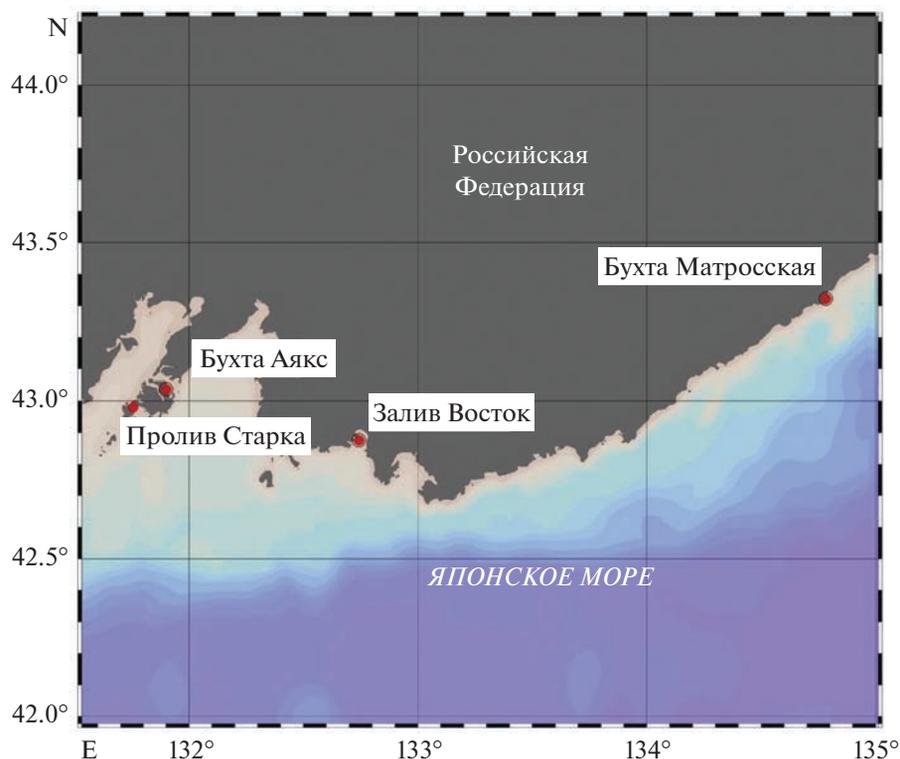


Рис. 1. Районы отбора проб.

таксонов: *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Spongiobacter*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Chromobacterium*, *Photobacterium*, *Desulfovibrio*, *Rhodococcus*, *Microbacterium* и *Micrococcus* (Беленева и соавт., 2003; Cavallo et al., 2009; Bezgachina, Kozitskiy, 2010; Motiei, 2014; Santisi et al., 2015; Li et al., 2018).

Что касается мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853), то микробиота пищеварительной системы этого гидробионта изучена слабо, несмотря на то, что это один из наиболее массовых видов двусторчатых моллюсков в прибрежной зоне северной части Японского моря и традиционный объект промысла. В предыдущих исследованиях с помощью культуральных методов изучали влияние микрофлоры воды и донных отложений на микрофлору *Crenomytilus grayanus* (Vogatyenko et al., 2018), ферментативную активность микроорганизмов-ассоциантов моллюска (Иванова и соавт., 1992), а также сезонную динамику численности гетеротрофных бактерий в тканях мидии Грея (Beleneva, Zhukova, 2009).

Целью работы было изучение биоразнообразия и метаболических особенностей бактериальных сообществ пищеварительной системы мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*) из прибрежных акваторий северной части Японского моря.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Район исследований и отбор проб.** В качестве районов исследований были выбраны 4 прибрежные акватории северной части Японского моря (рис. 1, табл. 1).

Бухта Аякс расположена на северо-востоке острова Русский, в южной части пролива Босфор Восточный. Акватория расположена у берегов крупного города Владивостока и характеризуется хроническим загрязнением углеводородами, ДДТ (4,4'-дихлордифенил-трихлорэтан), фенолом, тяжелыми металлами, а также бытовым мусором (Мощенко, Шайхлисламова, 2010).

Пролив Старка разделяет острова Русский и Попова, административно относящиеся к г. Владивостоку. В летний период район испытывает существенную рекреационную нагрузку. Наблюдается загрязнение акватории неочищенными сточными водами от туристических баз, нефтяными углеводородами и тяжелыми металлами (Коженкова, Христофорова, 2009).

Залив Восток расположен на северо-востоке залива Петра Великого, вблизи крупных портов Приморского края, включая нефтеналивной порт Козьмино. Для акватории характерно загрязнение фенолами и нефтяными углеводородами, концентрации которых в зависимости от сезона

**Таблица 1.** Характеристики районов отбора проб (Журавель и соавт., 2012)

Акватория	Соленость, ‰	Температура поверхностных вод, °С	
		зимой	летом
Бухта Аякс	26.3–35.9	1.2–1.4	15–21
Пролив Старка	10.6–33.5	–1.8–0.25	21–26
Залив Восток	29.0–34.1	–1.6–1.9	19–23
Бухта Матросская	30–33.6	–2–1.4	7.7–15.5

превышают ПДК в 10–30 и в 2–12 раз соответственно (Журавель и соавт., 2012).

Бухта Матросская расположена на севере Приморского края. Акватория выбрана в качестве фонового района с минимальной антропогенной нагрузкой. Вблизи отсутствуют крупные населенные пункты и объекты промышленности.

В августе 2019 г. с глубины 6–10 м было отобрано по 10 образцов взрослых особей мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*) из каждой исследуемой акватории. В лаборатории животные были очищены от внешних загрязнений и вскрыты. С соблюдением условий стерильности образцы желудочно-кишечного тракта были извлечены, гомогенизированы и заморожены для дальнейших исследований.

**Метабаркодинг.** Из гомогената тканей выделяли суммарную ДНК в трех повторностях с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (“Thermo Scientific”, США) согласно протоколу производителя. Концентрацию и чистоту ДНК анализировали с использованием NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США).

Аmplификацию региона V3–V4 гена 16S рРНК проводили на приборе CFX-96 (“Bio-Rad”, США) с помощью набора Phusion Hot Start II DNA Polymerase (“Thermo Fisher Scientific”, США), 0.2 мМ dNTP (“Life Technologies”, США) и праймеров 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), содержащих адаптерные последовательности (Illumina), линкер и баркод.

Продукты амплификации нужной длины вырезали из геля и экстрагировали ДНК с помощью набора реагентов для очистки ДНК из агарозного геля MinElute Gel Extraction Kit (“Qiagen”, Германия). Секвенирование проводили в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США), используя набор Reagent Kit v3 (2 × 300) (“Illumina”, США).

Прочтения были обработаны с помощью среды программирования R с использованием пакета DADA2 (<https://github.com/benjjneb/dada2>). После создания таблицы последовательностей, удаления химер и кластеризации, таксономическая классификация проводилась с использованием базы данных SILVA v. 138 с бутстреп-поддерж-

кой 80%. Последовательности были нормализованы, выровнены и сгруппированы в операционно-таксономические единицы (ОТЕ) с 97% идентичности (Mikhailov et al., 2019).

Данные, полученные в ходе исследования, зарегистрированы в NCBI в проекте PRJNA892878.

**Анализ культивируемых форм бактерий.** Образцы кишечника мидий Грея высевали на универсальную питательную среду для морских микроорганизмов (СММ) следующего состава (г/л): CaCO<sub>3</sub> – 1; MgSO<sub>4</sub> – 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.2; глюкоза – 0.2; пептон ферментативный, сухой для бактериологических целей – 5; агар бактериологический – 15; дрожжевой экстракт – 5; искусственная морская вода ((г/л): NaCl – 27.5; MgCl<sub>2</sub> – 5; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 2; CaCl<sub>2</sub> – 0.5; KCl – 1; FeSO<sub>4</sub> – 0.001–500 мл; дистиллированная вода – 500 мл; pH 7.8–8.1) (Youchimizu, 1976). Посевы инкубировали при 22°C в течение 5 сут, после чего получали чистые культуры бактерий.

Идентификацию полученных штаммов бактерий проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК, используя пару праймеров 27F (5'-AGAGTTT-GATCATGGCTCAG-3') и 1350R (5'-GACGGGC-GGTGTGTACAAG-3') (Lane et al., 1985). Секвенирование по Сэнгеру осуществлялось на капиллярном приборе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США).

**Рост бактерий на природных органических субстратах.** Способность бактерий к деструкции сахаров проводилась с использованием сред Гисса с индикатором ВР (аурин, анилиновый голубой, 1 : 1), для определения сахаролитических свойств (лактоза, глюкоза, сахароза, арабиноза, манноза, ксилоза, дульцит, сорбит, маннит; “Биотехновация”, Россия). Для определения деструкции аминокислот (аргинин, триптофан, фенилаланин, орнитин, аланин, глицин) и мочевины использовали коммерческие наборы производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Россия).

Способность разлагать крахмал, хитин, хитозан, фукоидан, альгинат натрия, коллаген и хондроитинсульфат определяли путем посева суточных культур бактерий на модифицированную минераль-

ную среду Ворошиловой–Диановой (ВД) (г/л дистиллированной воды): NaCl – 10;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{MgSO}_4$  – 0.2;  $\text{CaCl}_2$  – 0.02;  $\text{FeCl}_2$  – 2 капли насыщенного раствора; агар – 15.0 (Ким, 2022). В качестве единственного источника углерода использовали соответствующий субстрат в концентрации 1%. Для контроля параллельно высевали штаммы бактерий на чашках Петри с минеральной средой без добавления органического субстрата. Инкубировали до 10 сут при температуре 22°C. Отмечали рост бактерий на среде с субстратом и отсутствие роста на голодной минеральной среде. Для выявления амилолитической активности в чашки с крахмальной средой добавляли раствор Люголя и отмечали появление светлых колец вокруг колоний, свидетельствующее о наличии амилаз. Все эксперименты повторяли трижды.

**Рост бактерий в присутствии ксенобиотиков.** Для определения способности к утилизации нефтяных углеводов все штаммы бактерий высевали на модифицированную минеральную среду ВД с добавлением 1% сырой нефти, инкубировали 14 сут при 22°C, после чего отмечали рост бактерий.

Для определения способности бактерий к утилизации нафталина, бензола, толуола, ксилола готовили суспензии из суточных культур бактерий, выросших на среде с нефтью (плотность  $\text{OD} = 1$  при 600 нм). В стерильные микропланшеты вносили по 1.5 мл среды Бушнелла–Хааса (состав (г/л):  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{CaC}_{12} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.002;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1.0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1.0;  $\text{FeCl}_3$  – 0.05; pH 7.0) и 25 мкл бактериальной суспензии. В качестве единственного источника углерода в лунки добавляли по 5 мкл одного из субстратов (гексадекан, нафталин, бензол, толуол, ксилол) и по 1.5 мкг 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ). При микробном окислении углеводов электроны переносятся на акцепторы электронов. ДХФИФ является акцептором и, таким образом, можно учитывать способность микроорганизма использовать углеводородный субстрат, наблюдая изменение цвета ДХФИФ с синего (окисленного) на бесцветный (восстановленный). Планшеты инкубировали при 22°C и наблюдали обесцвечивание или снижение окраски среды Бушнелла–Хааса в течение суток (Napson et al., 1993).

Для определения способности к деструкции бисфенола А все исследуемые штаммы бактерий всевали на модифицированную минеральную среду ВД с добавлением 0.1% бисфенола А, далее инкубировали 14 сут при 22°C. Для штаммов бактерий, выросших на этой плотной среде, готовили бактериальную суспензию (плотность  $\text{OD} = 1$  при 600 нм) и добавляли в объеме 1 мл в колбы с 50 мл жидкой минеральной среды ВД, содержа-

щей 0.1% бисфенола А. В качестве контроля использовали стерильную среду ВД с 0.1% бисфенола А. Инкубировали при 22°C в течение 5 сут. Пробы центрифугировали при 1500 об./мин в течение 3 мин. Отбирали надосадочную жидкость, переносили ее в чистые пробирки и добавляли 0.5 мл реагент Фолина–Чокальтеу, инкубировали 5 мин. Процент деструкции бисфенола А учитывали на спектрофотометре Genesys 10S UV-VIS (“Thermo Scientific”, США) при длине волны 765 нм по изменению окраски среды. Суть метода заключается в том, что содержащиеся в реагенте Фолина–Чокальтеу фосфовольфрамовые и фосфомолибденовые кислоты при восстановлении фенольными соединениями образуют комплекс синего цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству фенольных соединений (Ingale et al., 2021).

Все исследуемые штаммы бактерий были протестированы на способность к деструкции атразина за счет оценки дегидрогеназной активности. Суть метода заключается в восстановлении раствора бесцветной соли 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ) в трифенилформазан красного цвета при окислительно-восстановительных реакциях микробного разложения ксенобиотика при действии дегидрогеназ. В стерильные чашки Петри вносили 20 мл среды Е-8 (г/л:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.7;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 1.5;  $\text{MgSO}_4$  – 0.8; NaCl – 0.5; агар – 20.0; pH 6.6 – 6.7), содержащей 0.6 мг/л гербицида атразин и 1% ТТХ. Для контроля разливали в чашки Петри по 20 мл среды Е-8 с ТТХ, но без атразина. Далее на поверхность готовой среды опытного и контрольного вариантов производили посев суточной культуры бактерий. Инкубировали при 22°C в течение 12 сут, после чего измеряли диаметр образовавшейся вокруг посева зоны красного цвета (Патент РФ 2051961).

**Статистическая обработка данных** проводилась в среде R. По результатам метабаркодинга были рассчитаны индексы разнообразия Шеннона и Симпсона. На основе данных по изучению разнообразия культивируемых бактерий построена диаграмма Венна и рассчитаны коэффициенты сходства Жаккара. Способность расщеплять органические субстраты, включая ксенобиотики, в зависимости от района обитания мидии Грея, была оценена с помощью критерия Шапиро–Уилка, проверяющего гипотезу о нормальности распределения, однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Шеффе.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Метабаркодинг.** В результате проведенного анализа из образцов пищеварительной системы мидии Грея было получено 271 453 нуклеотидных последовательностей и 58 ОТЕ бактерий (табл. 2).

**Таблица 2.** Характеристики биоразнообразия микробиомов мидии Грея

Район	Нуклеотидные последовательности	ОТЕ	Индекс Шеннона	Индекс Симпсона
Бухта Аякс	105042	13	2.417	0.897
Пролив Старка	84461	10	1.446	0.626
Залив Восток	35742	29	2.943	0.914
Бухта Матросская	46208	22	2.661	0.898

**Таблица 3.** Филумы бактерий, полученные при анализе микробиома пищеварительной системы *Crenomytilus grayanus*

Филум	Бухта Аякс	Пролив Старка	Залив Восток	Бухта Матросская
<i>Proteobacteria</i>	67.97%	5.92%	64.58%	75.97%
<i>Firmicutes</i>	0.00%	76.39%	15.68%	0.00%
<i>Actinobacteriota</i>	21.70%	0.00%	6.46%	8.44%
<i>Bacteroidota</i>	0.00%	12.35%	10.47%	14.40%
<i>Gemmatimonadota</i>	4.45%	5.33%	1.08%	0.00%
<i>Verrucomicrobiota</i>	5.88%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Мухоскочота</i>	0.00%	0.00%	1.72%	1.19%

Значения индексов разнообразия Шеннона и Симпсона оказались довольно высокими для микробиомов мидий из всех исследуемых районов, за исключением п. Старка (табл. 2). При проведении дисперсионного анализа (ANOVA) между образцами кишечного микробиома не наблюдалось существенных различий ( $p > 0.05$ ).

В желудочно-кишечном тракте исследуемых животных были обнаружены представители 7 филумов, из них только *Proteobacteria* оказался в моллюсках из всех районов. При этом представленность данного филума сильно варьировала в образцах (табл. 3).

Структура бактериального сообщества мидий из б. Аякс на уровне семейств была представлена следующими таксонами: неклассифицированными *Pseudomonadales uncultured* (18%), *Rhodobacteraceae* (14.8%), *Sphingomonadaceae* (10.9%), *Pseudomonadaceae* (9%), *Comamonadaceae* (7.7%), *Propionibacteriaceae* (6.9%), *Corynebacteriaceae* (6.3%) и неклассифицированными *Chlamydiales uncultured* (5.8%).

В микробиоме мидий из п. Старка доминирующими семействами были *Bacillaceae* – 57.3% и *Paenibacillaceae* – 19%. Остальные таксоны были не так многочисленны: *Chitinophagaceae* – 9.4%, *Comamonadaceae* – 2.2%, *Sphingomonadaceae* – 1.8%. Особенностью микробиома моллюсков этого района стало присутствие *Weeksellaceae* – 2.9% и *Pseudoalteromonadaceae* – 1.7%.

В пищеварительной системе моллюсков из з. Восток основное разнообразие составили бактерии семейств *Comamonadaceae* – 33.8%, *Chitino-*

*phagaceae* – 10.4%, *Sphingomonadaceae* – 10.3%, *Aerococcaceae* – 8.2%, *Bacillaceae* – 6.2%, *Pseudomonadaceae* – 6.2%, *Actinomycetaceae* – 4.2%. Оставшиеся 20.7% таксономического разнообразия составили представители 13 семейств.

В микробиоме мидий из б. Матросской доминирующими семействами стали *Pseudomonadaceae* – 23.7%, *Rhizobiales Incertae Sedis* – 22.2%, *Chitinophagaceae* – 12.6% и *Sphingomonadaceae* – 7.2%. Минорная часть сообщества была представлена *Moraxellaceae*, *Actinomycetaceae*, *Micrococcaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Polyangia*, *Comamonadaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Alcaligenaceae*, *Sphingobacteriales env.OPS 17*, *Nocardiaceae*.

На уровне семейств общими для всех образцов оказались представители *Comamonadaceae* и *Sphingomonadaceae*.

На уровне родов все исследуемые образцы отличались уникальным таксономическим составом: доминирующими в структуре микробиома моллюсков из б. Аякс были некультивируемые рода порядка *Pseudomonadales* – 18.4%, *Haemobacter* – 14.8%, *Sphingomonas* – 10.9%, из п. Старка – *Bacillus* (57.3%) и *Paenibacillus* (19%), из б. Восток – *Alicyclophilus* (27.4%), *Sediminibacterium* (10.4%) и *Sphingomonas* (10.3%), а из б. Матросская – *Pseudomonas* – 23.7%, *Phreatobacter* – 22.2% и *Sediminibacterium* – 12.6% (рис. 2).

Согласно многочисленным научным исследованиям, состав микробиоты двустворчатых моллюсков существенно зависит от целого ряда факторов: вида гидробионта и его генетических особенностей, стадии его развития, типа органа или

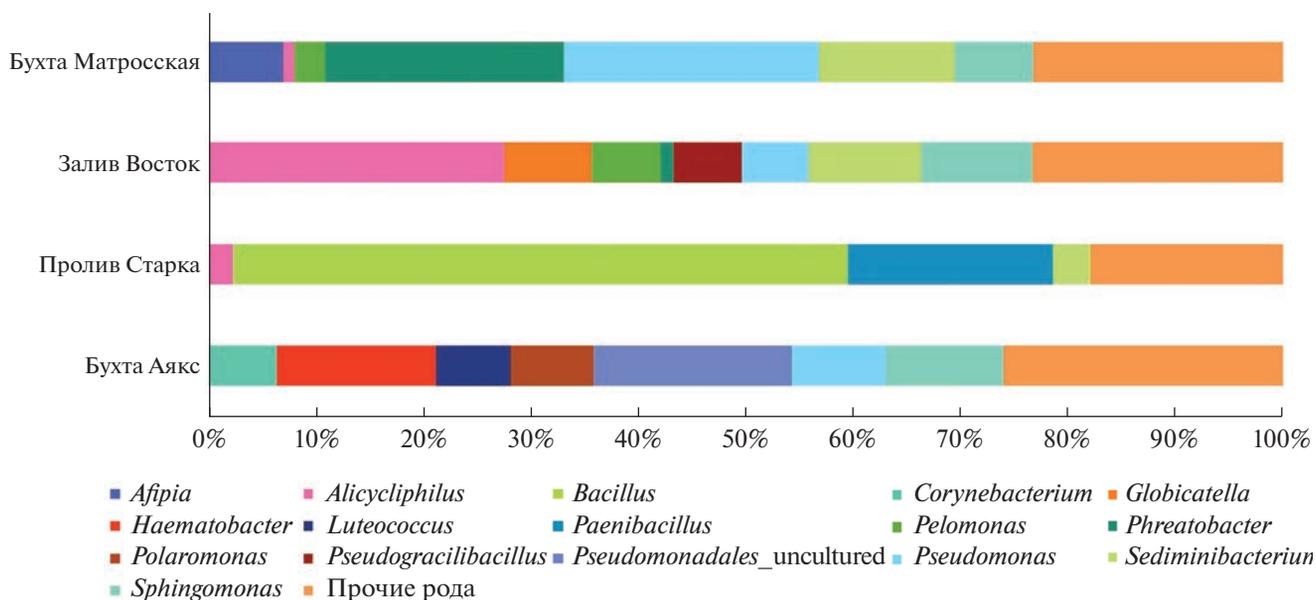


Рис. 2. Рода бактерий, выявленные в микробиоме пищеварительной системы *Crenomytilus grayanus* на основе метабар-кодинга. На рисунке показаны рода, представленность которых составила более 6%.

ткани, физико-географических особенностей района обитания, времени года, температуры, концентрации растворенного кислорода в воде, питания, наличия в среде поллютантов и т.п. (Paillard et al., 2022). Тем не менее, есть ряд работ, где авторам удалось выявить ядро микробиома, состав которого остается стабильным на протяжении длительного времени или под действием изменяющихся условий среды. Так, например, *Spirochaetaceae*, *Vulcaniibacterium* и *Delftia* названы в качестве ядра микробиома пищеварительной системы тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (King et al., 2020), *Mycoplasmataceae* и *Spirochaetaceae* — основа микробиома для венеруписа филиппинского *Ruditapes philippinarum* (Offret et al., 2021), а *Peptostreptococcaceae*, *Pirellulaceae* и *Mollisutes* — ядро микробиома для черногубой жемчужной устрицы *Pinctada margaritifera* (Dube et al., 2019).

Наши исследования показали, что особенностью микробиома мидий из п. Старка стало его низкое биоразнообразие на фоне доминирования бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*. Эти группы микроорганизмов характеризуются широкими метаболическими возможностями, а на основе *Bacillus* созданы многие пробиотические препараты для аквакультуры, благодаря их способности к синтезу антимикробных веществ в отношении большинства известных возбудителей инфекционных заболеваний (Lee et al., 2021).

*Bacillus* и *Paenibacillus* были обнаружены только у мидий из п. Старка, в том время, как в составе микробиомов гидробионтов из других исследуемых акваторий доминировали, в основном,

представители семейства *Pseudomonadaceae*. В научной литературе есть сведения об антагонистических отношениях представителей *Bacillus* и *Pseudomonas*, занимающих одинаковые экологические ниши (Simoes et al., 2008). При изучении дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* было показано, что среди культивируемых бактерий микробиоты гидробионтов из разных акваторий Японского моря доминировали либо *Bacillus*, либо *Pseudomonas*. При этом ферментативная активность обеих групп бактерий имела схожие значения, что, вероятно, предполагает одинаковый вклад этих микроорганизмов в пищеварительный процесс хозяина (Богатыренко, Бузалева, 2016).

Использование молекулярной идентификации позволило обнаружить в микробиоте *Crenomytilus grayanus* из прибрежных вод Японского моря представителей таксонов, характерных для антропогенного загрязнения. Так, существенную долю в структуре бактериальных сообществ мидий из б. Аякс заняли представители *Rhodobacteraceae* и *Corynebacteriaceae*, среди которых, помимо типичных водных обитателей, часто встречаются активные деструкторы углеводов нефти. Также в пищеварительном тракте мидий из этого района были выявлены бактерии-внутриклеточные паразиты, относящиеся к порядку *Chlamydiales*. Известно, что эти микроорганизмы поражают цитоплазму клеток эпителия пищевого дивертикула двусторчатых моллюсков, что приводит к нарушению метаболизма и к гибели животных (Getchell et al., 2016). В микробиоме мидий из п. Старка были обнаружены бактерии рода *Asini-*

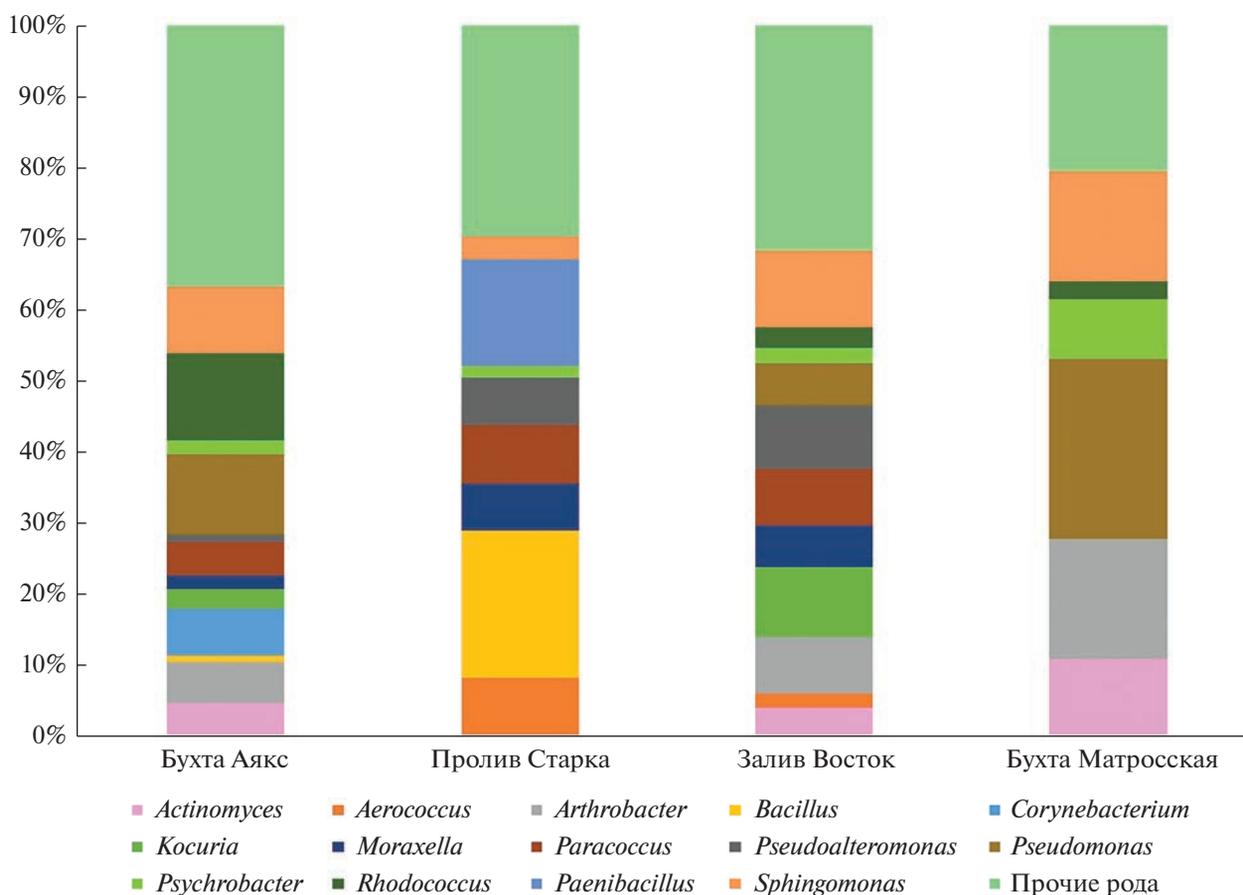


Рис. 3. Рода культивируемых бактерий, выделенных из пищеварительной системы *Crenomytilus grayanus*. На рисунке показаны рода, представленность которых составила более 6%.

*bacterium*, которые характерны для грунтов, загрязненных тяжелыми металлами в высоких концентрациях (Brzoska et al., 2022).

В образцах мидий из п. Старка и з. Восток были обнаружены таксоны бактерий, характерные для неочищенных коммунально-бытовых стоков. Так, в микробиоме животных из п. Старка встречались бактерии рода *Cloacibacterium*, а из з. Восток – условно-патогенные бактерии рода *Globicatella*, вызывающие у человека менингит и бактериемию. Вместе с тем, в образцах животных из фонового района не были обнаружены таксоны, указывающие на антропогенную нагрузку.

Прибрежные акватории северной части Японского моря испытывают хроническое загрязнение тяжелыми металлами, нефтепродуктами, фенолами, пестицидами, коммунально-бытовыми стоками (Барышева и соавт., 2019; Мощенко и соавт., 2020), что, судя по полученным нами результатам, оказывает влияние на состав бактериальных сообществ пищеварительной системы мидий Грея в исследуемом районе.

**Исследование биоразнообразия культивируемых гетеротрофных бактерий.** В ходе исследования из

образцов пищеварительной системы мидии Грея на среде СММ была получено 411 штаммов культивируемых гетеротрофных бактерий (34 рода бактерий), из них из б. Аякс – 106, п. Старка – 121, з. Восток – 101 и б. Матросская – 83 (рис. 3).

Из мидий з. Восток по количеству выделенных изолятов доминировали представители родов *Sphingomonas* – 11 штаммов, *Kocuria* – 10 штаммов, *Pseudoalteromonas* – 9 штаммов, *Paracoccus* и *Arthrobacter* – по 8 штаммов.

Из образцов б. Матросской чаще всего выделялись бактерии родов *Pseudomonas* – 21 штамм, *Arthrobacter* – 14 штаммов, *Sphingomonas* – 13 штаммов, *Actinomyces* – 9 штаммов, *Psychrobacter* – 7 штаммов. Стоит отметить, что для микробиома восточной устрицы *Crassostrea virginica* также было характерно доминирование *Pseudomonas* и *Psychrobacter* наравне с *Synechococcus* (Pathak et al., 2021).

Кишечная микрофлора животных из п. Старка характеризовалась большим количеством представителей рода *Bacillus* – 25 штаммов, *Paenibacillus* – 18 штаммов, а также *Aerococcus* и *Paracoccus* – по 10 штаммов.

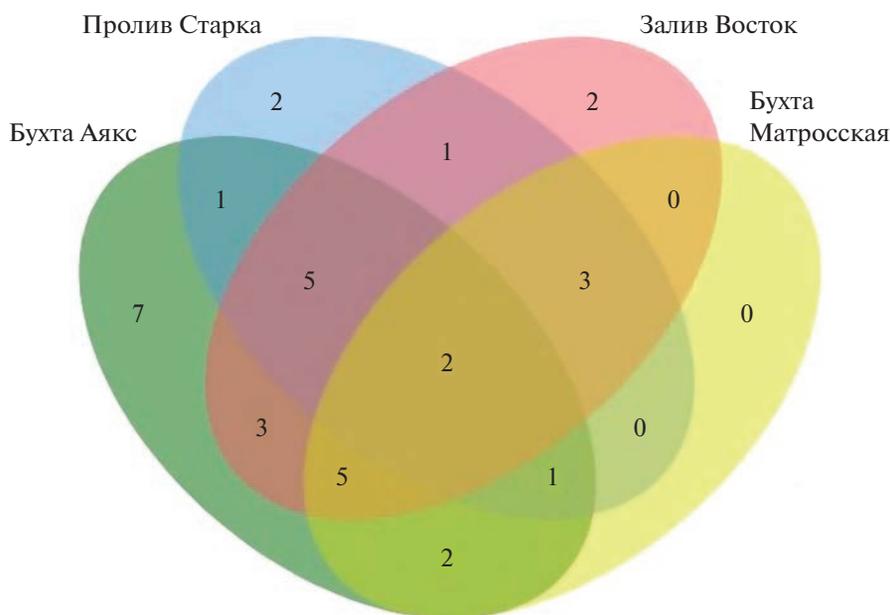


Рис. 4. Диаграмма Венна, отражающая разнообразие культивируемых бактерий на уровне родов, выделенных из пищеварительной системы *Crenomytilus grayanus*.

В работе, посвященной изучению ассоциантов мидии *Crenomytilus grayanus* из б. Троица (залив Петра Великого, Японское море), были получены схожие результаты: 30.6% от общего бактериального разнообразия желудка моллюска было представлено родом *Bacillus* (Иванова и соавт., 1992). Высокая доля этих бактерий может быть обусловлена их способностью к споруляции, которая обеспечивает им выживаемость в кишечнике мидий за счет устойчивости к пищеварительным ферментам и условиям с низкими значениями pH (Pandiyana et al., 2013). Уникальным для микробиоты мидий Грея этого п. Старка стали штаммы бактерий рода *Paenibacillus*, некоторые представители которых, согласно литературным данным, улучшают рост гидробионтов, иммунную и антиоксидантную активность, а также обеспечивают устойчивость к патогенным вибрионам (Amoah et al., 2020).

В пищеварительной системе мидии Грея из б. Аякс по количеству полученных изолятов доминировали бактерии рода *Rhodococcus* – 13 штаммов, *Pseudomonas* – 12 штаммов, *Sphingomonas* – 10 штаммов, *Corynebacterium* – 7 штаммов. В образцах только из этого района были выявлены условно-патогенные бактерии родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* и *Yersinia*. Выявление подобных потенциально опасных бактерий свидетельствует о неблагоприятном санитарно-эпидемиологическом состоянии исследуемой акватории, что вызвано хроническим загрязнением бухты городскими коммунально-бытовыми стоками и значительной рекреационной нагрузкой в летний период. Не-

смотря на то, что условно-патогенная микрофлора не доминировала в биоценозе, она все же смещала равновесие в сторону увеличения несвойственной гидробионту микробиоты. Ранее при исследовании других видов мидий из районов с высокой антропогенной нагрузкой в тканях животных также были обнаружены такие патогенные микроорганизмы, как *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* (Cavallo et al., 2009; Rubiolo et al., 2019), вирус гепатита А и норовирусы (Schradler et al., 2003). Интересно отметить, что только из мидии б. Аякс был получен 1 штамм рода *Vibrio*, хотя вибрионы широко распространены в морской среде и часто выявляются в микрофлоре разных видов двустворчатых моллюсков (Moriarty, 1998; Motiei, 2014; Rubiolo et al., 2019).

При сравнении биоразнообразия культивируемых гетеротрофных бактерий из мидий Грея исследуемых районов с помощью диаграммы Венна (рис. 4) и коэффициента Жаккара ( $K_j$ ) было установлено, что микробиом животных каждой акватории характеризуется своим набором бактериальных таксонов. Наибольшие значения коэффициента сходства были получены для гидробионтов из б. Аякс и з. Восток ( $K_j = 0.46$ ) и для гидробионтов из з. Восток и п. Старка ( $K_j = 0.44$ ), наименьшие значения оказались для пар выборок из б. Матросская и п. Старка ( $K_j = 0.27$ ) и для п. Старка и б. Аякс ( $K_j = 0.28$ ).

Настоящее исследование показало, что кишечный микробиом мидий Грея характеризуется уникальным таксономическим составом в зависимости от района обитания животных. Получен-

ные результаты указывают на существенное влияние окружающей среды на формирование симбионтной микрофлоры двустворчатого моллюска.

Вместе с тем, проведенный анализ показал, что для животных из всех районов было характерно присутствие представителей родов *Psychrobacter* и *Sphingomonas*. Вероятно, эти группы микроорганизмов относятся к автохтонной микробиоте моллюсков, и могут выполнять для них ряд полезных функций.

Так, например, есть сведения, что бактерии рода *Sphingomonas* ингибируют патогенных *Vibrio anguillarum* и способны положительно влиять на рост, выживаемость и биохимические показатели мальков рыб (Chaudhary et al., 2021). Также немало работ о пробиотическом потенциале некоторых штаммов *Psychrobacter* spp. для искусственного воспроизводства креветки *Exopalaemon carinicauda* (Lai et al., 2022), атлантической трески *Gadus morhua* (Lazado et al., 2010), групера *Epinephelus coioides* (Liu et al., 2021) и сериолы *Seriola lalandi* (Ramírez et al., 2020).

Также в пищеварительной системе мидий Грея были многочисленны *Actinomyces*, которые известны как продуценты огромного спектра вторичных метаболитов, в том числе, с выраженным антимикробным эффектом (Cera et al., 2022).

В животных из всех районов, кроме п. Старка, часто встречались представители рода *Arthrobacter*, которые могут относиться к индигенной микрофлоре гидробионтов. У некоторых видов *Arthrobacter*, выделенных из морской среды описаны пробиотические свойства, например, способность к синтезу антибиотиков. Показано, что штамм *Arthrobacter* ХЕ-7 положительно влияет на микробиоту кишечника и иммунитет у тихоокеанских белых креветок, а также обладает антагонистической активностью по отношению к *Vibrio parahaemolyticus* (Li et al., 2006). Штамм *Arthrobacter davidanieli* показал свою эффективность при лечении заболеваний у лососевых рыб, вызванных *Renibacterium salmoninarum* и *Piscirickettsia salmonis* (Salonius et al., 2004).

Из мидий всех районов, кроме б. Матросская, было получено большое количество штаммов *Paracoccus*, которые, по данным литературы, являются симбионтами насекомых, кораллов и мшанок, а также обладают антибактериальными, альгицидными и фунгицидными свойствами по отношению к таким микроорганизмам как *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Prorocentrum donghaiense*, *Candida albicans* (Leinberger et al., 2021).

Из мидий з. Восток было выделено 10 штаммов рода *Kocuria*, среди представителей которого, согласно научной литературе, немало патогенных видов. Однако есть сведения о высокой активности этих микроорганизмов в разложении широ-

кого спектра ксенобиотиков, а также о возможности их использования для профилактики и лечения вибриозов у радужной форели, вызванных *Vibrio anguillarum* и *V. ordalii* (Sharifuzzaman, Austin, 2010).

Уникальными для микробиома моллюсков из п. Старка стали штаммы *Alteromonas* spp. В исследовании личиночных стадий *Mytilus galloprovincialis* обнаружено, что биопленки альтеромонад ответственны за индукцию метаморфоза личиночных стадий этого вида моллюска (Bao et al., 2007).

Вероятно, уникальный для мидий каждого района состав микробиома обеспечивает адаптацию животных к индивидуальным условиям окружающей среды.

**Исследование метаболических особенностей полученных штаммов бактерий.** По результатам исследований установлено, что большинство полученных штаммов бактерий были способны к расщеплению широкого спектра органических субстратов (рис. 5). При анализе не выявлено статистически значимых различий в способности разлагать простые сахара и аминокислоты у бактерий, выделенных от моллюсков из разных районов (критерий Шапиро–Уилка –  $p > 0.05$ , ANOVA –  $F < F_{\text{крит}}$ ). Таким образом, несмотря на различия в таксономическом составе микробиомы мидий из разных акваторий обладают схожими ферментативными свойствами и, вероятно, выполняют одинаковые функции для организма хозяина.

К утилизации сложных органических субстратов, которые в огромном количестве встречаются в морской среде (хитин, хитозан, альгинат, фукоидан, коллаген, хондроитин сульфат), было способно меньшее количество исследуемых штаммов (рис. 5). Одновременно с этим замечено, что доля микроорганизмов, использующих данные соединения в качестве единственного источника углерода, достоверно выше в мидиях из фонового района: б. Матросская (критерий Шапиро–Уилка –  $p > 0.05$ , ANOVA –  $F > F_{\text{крит}}$ , критическое значение теста Шеффе –  $p < 0.05$ ). Стоит предположить, что антропогенное загрязнение влияет не только на биоразнообразие, но и на функциональные особенности симбионтной микрофлоры двустворчатых моллюсков. Антропогенный пресс может как сокращать количество автохтонной микробиоты, способной к разложению подобных субстратов, так и влиять на ее активность. В работе А.В. Ким (Ким, 2022) показано, что антропогенное загрязнение приводит к уменьшению в микробных ценозах поверхностных морских вод доли бактерий-деструкторов хитина и его производных, клетчатки, альгината натрия и фукоидана, а также к снижению скорости утилизации бактериями этих соединений. Полученные результаты автор связал с адаптацией микробных сообществ загрязненных территорий к потребле-

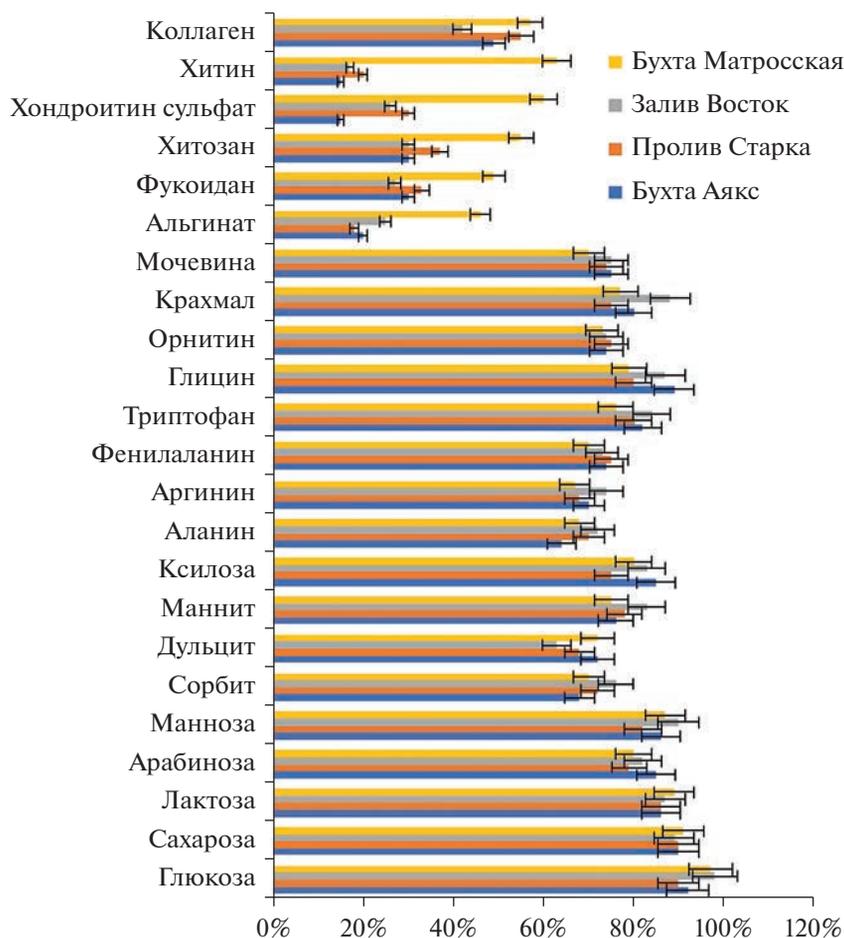


Рис. 5. Доля штаммов бактерий, проявивших способность к разложению органических субстратов.

нию легкоразлагаемой органики, постоянно поступающей в среду вместе с хозяйственно-бытовыми, промышленными и речными стоками, балластными водами. Длительное существование в подобных условиях могло привести к утрате или снижению гидролитической активности в отношении полисахаридов у автохтонной микробиоты (Ким, 2022).

Из литературных источников известно, что ряд прибрежных акваторий Приморского края испытывают хроническое антропогенное загрязнение различными поллютантами (Барышева и соавт., 2019; Мощенко и соавт., 2020). В связи с этим, нами была проанализирована способность полученных штаммов бактерий расти на средах с нефтью и нефтяными углеводородами (гексадекан, бензол, ксилол, толуол, нафталин), пестицидом (атразин) и пластификатором (бисфенол А) в качестве единственного источника углерода.

По результатам исследований рост на минеральной среде с нефтью продемонстрировали 54 штамма бактерий (13%) из моллюсков б. Аякс, з. Восток и п. Старка. Большинство активных штам-

мов было представлено родами *Kocuria*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, которые, согласно литературным данным, относятся к наиболее распространенным таксонам деструкторов углеводов нефти, в том числе, характерным для вод Японского моря (Vogatyrenko et al., 2021).

Способность к окислению гексадекана проявили все 54 штамма бактерий, выросших на среде с нефтью (13% штаммов коллекции) (рис. 6). Разложение соединений ароматического ряда было доступно меньшему количеству микроорганизмов. Так, ксилол расщепляли 46 штаммов бактерий (11.2%), бензол – 45 (11%), толуол – 42 (10.2%) и нафталин – 35 штаммов (8.5%) (рис. 6).

Можно предположить, что в природных условиях указанные микроорганизмы могут участвовать в детоксикации моллюсков от губительного действия углеводов нефти. К подобным выводам пришли авторы исследования, в котором было показано, что добавление в течение 14 дней в среду с молодой дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* бензпирена сокращает в

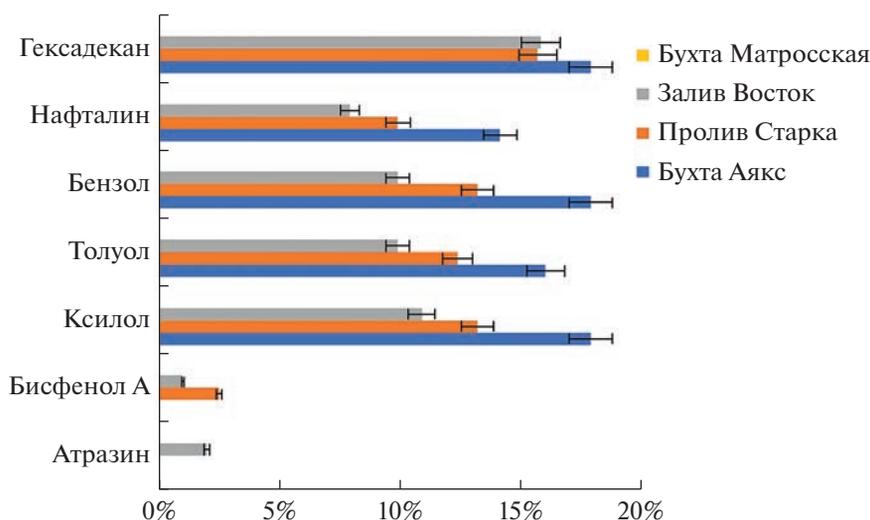


Рис. 6. Доля штаммов бактерий, способных к деструкции ксенобиотиков.

микробиоме голотурии численность автохтонных бактерий (*Lactococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* и *Weissella*) и резко увеличивает количество углеводородокисляющих микроорганизмов (*Lutibacter*, *Pseudoalteromonas*, *Polaribacter*, *Rhodopirellula* и *Blastopirellula*) (Zhao et al., 2019).

Бисфенол А относится к наиболее распространенным микрополлютантам, который способен вызывать метаболические и репродуктивные нарушения у человека. В последние годы доказано, что он представляет опасность не только для людей, но и для морских обитателей. В одной из научных работ показано, что бисфенол А и его аналоги способны изменять микробиом личинок мидий *Mytilus galloprovincialis* (Balbi et al., 2020). Применение поллютантов привело к увеличению в структуре микробиома моллюска доли потенциальных патогенов (*Vibrio*, *Arcobacter* и *Tenacibaculum*) и бактерий, участвующих в биотрансформации ксенобиотиков (*Oleispira* и *Shewanella*).

В наших исследованиях утилизацию бисфенола А показали 4 штамма — *Bacillus* sp. СтМ5, *Bacillus* sp. СтМ11, *Bacillus* sp. СтМ24 из п. Старка и *Sphingomonas* sp. ВтМ13 из з. Восток. Степень деструкции бисфенола через 5 сут составила  $52 \pm 2.1$ ,  $37 \pm 1.5$ ,  $41 \pm 1.9$  и  $45 \pm 2.3\%$  соответственно. Разлагающие бисфенол А штаммы *Bacillus* и *Sphingomonas* ранее неоднократно выделялись из различных сред многими авторами (López-Moreno et al., 2021; de Moraes Farias, Krepsky, 2022). Установлено, что ключевую роль в разложении бисфенола играет система монооксигеназы цитохрома P450, ферредоксин, ферредоксинредуктаза и лакказы, которые встречаются у бактерий этих родов.

Показано, что воздействие на устриц *Crassostrea virginica* атразина, распространенного в сель-

скохозяйственной практике гербицида, приводит к значительной потере ключевых видов мутуалистических бактерий и последующей колонизации патогенными *Nocardia* (Britt et al., 2020).

В наших исследованиях способность к деструкции атразина была обнаружена у двух штаммов бактерий, выделенных из зал. Восток. На 12 сут эксперимента зона окисления поллютанта на чашках с *Arthrobacter agilis* ВтМ7 составила  $30 \pm 2.4$  мм, а с *Rhodococcus* sp. ВтМ19 —  $26 \pm 3.1$  мм, что указывало на довольно высокую дегидрогеназную активность микроорганизмов. И, хотя родококки известны своей способностью к утилизации многих ксенобиотиков, в литературе наиболее широко описан механизм полного разложения атразина на углекислый газ и аммиак у представителей рода *Arthrobacter* (Abd Rani et al., 2022). Известно, что у *Arthrobacter agilis* гены *atzA/trzN* кодируют атразинхлоргидролазу, катализирующую дехлорирование атразина (Mili et al., 2022). Полученный нами вид широко распространен в почвах, крайне устойчив к изменениям окружающей среды, а также разлагает многие виды загрязнителей.

Таким образом, полученные нами результаты могут быть использованы для дальнейшей детальной оценки вклада микробиома мидии Грея в симбионтное пищеварение и детоксикацию моллюска.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке ДВФУ (Программа стратегического академического лидерства “Приоритет-2030”: Мировой океан, проект № 22-05-1.06-0012).

## 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

- Барышева В.С., Чернова Е.Н., Патрушева О.В. Загрязнение морской среды залива Восток Японского моря органическими веществами (2016–2018 гг.) // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2019. № 2 (204). С. 87–94.
- Беленёва И.А., Жукова Н.В., Масленникова Э.Ф. Сравнительное изучение структуры микробных сообществ мидии *Mytilus trossulus* из культивируемой и природной популяций залива Петра Великого // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 528.
- Beleneva I.A., Zhukova N.V., Maslennikova E.F. Comparative study of microbial communities from cultured and natural populations of the mussel *Mytilus trossulus* in Peter the Great Bay // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 472–477.
- Богатыренко Е.А., Бузолёва Л.С. Характеристика бактериального сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 92–99.
- Bogatyrenko E.A., Buzoleva L.S. Characterization of the gut bacterial community of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 116–123.
- Журавель Е.В., Христофорова Н.К., Дроздовская О.А., Токарчук Т.Н. Оценка состояния вод залива Восток (залив Петра Великого, Японское море) по гидрохимическим и микробиологическим показателям // Изв. Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14. № 1–9. С. 2325–2329.
- Иванова Е., Киприанова Е., Аминин Д., Михайлов В., Агафонова И. Биологическая активность микроорганизмов – ассоциантов мидии *Crenomytilus grayanus* // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 1992. Т. 6. С. 25–30.
- Ким А.В. Влияние антропогенного загрязнения на таксономическое разнообразие и биологические свойства культивируемых бактерий акваторий Приморского края. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 15.06.2022. Владивосток: ФНИЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, 22 с.
- Коженкова С.И., Христофорова Н.К. Распределение зеленых водорослей-макрофитов в Амурском заливе (Японское море) // Известия ТИНРО. 2009. Т. 159. С. 156–167.
- Моценко А.В., Белан Т.А., Лишавская Т.С., Севастьянов А.В., Борисов Б.М. Многолетняя динамика концентраций приоритетных поллютантов и общего уровня химического загрязнения прибрежных акваторий Владивостока (залив Петра Великого Японского моря) // Известия ТИНРО. 2020. Т. 200. С. 377–400.
- Моценко А.В., Шайхлисламова Л.Е. Экологическое состояние восточной части пролива Босфор Восточный (залив Петра Великого Японского моря) // Известия ТИНРО. 2010. Т. 161. С. 199–211.
- Amoah K., Huang Q.C., Dong X.H., Tan B.P., Zhang S., Chi S.Y., Yang Q., Liu H., Yang Y.Z. *Paenibacillus polymyxa* improves the growth, immune and antioxidant activity, intestinal health, and disease resistance in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* // Aquaculture. 2020. V. 518. Art. 734563.
- Balbi T., Vezzulli L., Lasa A., Pallavicini A., Canesi L. Insight into the microbial communities associated with first larval stages of *Mytilus galloprovincialis*: possible interference by estrogenic compounds // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2020. V. 237. Art. 108833.
- Bao W.Y., Yang J.L., Satuito C.G., Kitamura H. Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to *Asteromonas* sp. 1: evidence for two chemical cues? // Marine Biol. 2007. V. 152. P. 657–666.
- Beleneva I.A., Zhukova N.V. Seasonal dynamics of cell numbers and biodiversity of marine heterotrophic bacteria inhabiting invertebrates and water ecosystems of the Peter the Great Bay, Sea of Japan // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 369–375.
- Bezgachina T.V., Kozitskiy A.N. Concerning the sanitary and microbiological tests of mussels from the White Sea // Current Problems of Physiology and Biochemistry Of Aquatic Organisms. Collected Scientific Papers of the First International Seminar and PhD Workshop (6–9 September 2010, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia). 2010. P. 12.
- Bogatyrenko E.A., Dunkai T.I., Buzoleva L.S., Kim A.V. Influence of Vladivostok coastal waters pollution on a microflora of mussel *Crenomytilus grayanus* // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2018. V. 107. Art. e012052.
- Bogatyrenko E.A., Kim A.V., Dunkai T.I., Ponomareva A.L., Es'kova A.I., Sidorenko M.L., Okulov A.K. Taxonomic diversity of culturable hydrocarbon-oxidizing bacteria in the Sea of Japan // Russ. J. Marine Biol. 2021. V. 47. P. 232–239.
- Britt A., Bernini M., McSweeney B., Dalapati S., Duchin S., Cavanna K., Santos N., Donovan G., O'Byrne K., Noyes S., Romero M., Poonacha K.N.T., Scully T. The effects of atrazine on the microbiome of the eastern oyster: *Crassostrea virginica* // Sci. Rep. 2020. V. 10. Art. 11088.
- Brzoska R.M., Edelmann R.E., Bollmann A. Physiological and genomic characterization of two novel *Bacteroidota* strains *Asinibacterium* spp. OR43 and OR53 // Bacteria. 2022. V. 1. P. 33–47.
- Cavallo R.A., Acquaviva M.I., Stabili L. Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea–Italy) // Environ. Monitor. Assess. 2009. V. 149. P. 465–475.
- Chaudhary A., Ahmad Q.U.A., Akram A.M., Iqtedar M., Qazi J.I. Effect of *Sphingomonas* sp., as a probiotic on survival, growth and biochemical constituents of *Vibrio anguillarum* challenged *Labeo rohita* fingerlings // Pakistan J. Zool. 2021. V. 53. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20181009061048>
- de Moraes Farias J., Krepsky N. Bacterial degradation of bisphenol analogues: an overview // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2022. V. 29. P. 76543–76564.

- Dubé C.E., Ky C.L., Planes S. Microbiome of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*, a multi-tissue description with functional profiling // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 1548.
- Getchell R.G., Smolowitz R.M., McGladdery S.E., Bower S.M. Diseases and parasites of scallops // *Develop. Aquacult. Fisher. Sci.* 2016. V. 40. P. 425–467.
- Hanson K.G., Desai J.D., Desai A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms // *Biotechnol. Techniq.* 1993. V. 7. P. 745–748.
- Harris J.M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis // *Microb. Ecol.* 1993. V. 25. P. 195–231.
- Ingale S., Patel K., Sarma H., Joshi S.J. Bacterial biodegradation of bisphenol A (BPA) // *Biotechnology for Sustainable Environment* / Eds. Joshi S.J., Deshmukh A., Sarma H. Singapore: Springer, 2021. P. 95–110. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-1955-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-16-1955-7_4)
- King W.L., Siboni N., Kahlke T., Dove M., O'Connor W., Mahbub K.R., Jenkins C., Seymour J.R., Labbate M. Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial community // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020. V. 96. P. fiae054.
- Lai X., Chen J., Liang S., Chen H., Liu S., Gao H. Effects of the probiotic *Psychrobacter* sp. B6 on the growth, digestive enzymes, antioxidant capacity, immunity, and resistance of *Exopalaemon carinicauda* to *Aeromonas hydrophila* // *Probiot. Antimicr. Prot.* 2022. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09919-3>
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 6955–6959.
- Lazado C.C., Caipang C.M.A., Rajan B., Brinchmann M.F., Kiron V. Characterization of GP21 and GP12: two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of Atlantic cod // *Probiot. Antimicr. Prot.* 2010. V. 2. P. 126–134.
- Lee C., Kim S., Shin J., Kim M.-G., Gunathilaka B.E., Kim S.H., Kim J.E., Ji S.-C., Han J.E., Lee K.-J. Dietary supplementations of *Bacillus* probiotic improve digestibility, growth performance, innate immunity, and water ammonia level for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* // *Aquacult. Int.* 2021. V. 29. P. 2463–2475.
- Leinberger J., Holste J., Bunk B., Freese H.M., Spröer C., Dlugosch L., Kück C., Schulz S., Brinkhoff T. High potential for secondary metabolite production of *Paracoccus marcusii* CP157, isolated from the crustacean cancer pagurus // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 688754.
- Li J., Tan B., Mai K., Ai Q., Zhang W., Xu W., Ma H. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios // *Aquaculture.* 2006. V. 253. P. 140–147.
- Li Y.F., Yang N., Liang X., Yoshida A., Osatomi K., Power D., Batista F.M., Yang J.L. Elevated seawater temperatures decrease microbial diversity in the gut of *Mytilus coruscus* // *Front. Physiol.* 2018. V. 9. Art. 839.
- Liu Z.Y., Yang H.L., Hu L.H., Yang W., Ai C.X., Sun Y.Z. Autochthonous probiotics alleviate the adverse effects of dietary histamine in juvenile grouper (*Epinephelus coioides*) // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 792718.
- López-Moreno A., Torres-Sánchez A., Acuña I., Suárez A., Aguilera M. Representative *Bacillus* sp. AM1 from gut microbiota harbor versatile molecular pathways for Bisphenol A biodegradation // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Art. 4952.
- Mikhailov I.S., Zakharova Y.R., Bukin Y.S., Galachyants Y.P., Petrova D.P., Sakirko M.V., Likhoshway Y.V. Co-occurrence networks among bacteria and microbial eukaryotes of Lake Baikal during a spring phytoplankton bloom // *Microb. Ecol.* 2019. V. 77. P. 96–109.
- Moriarty D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds // *Aquaculture.* 1998. V. 164. P. 351–358.
- Motiei A. *Mytilus edulis* associated bacteria diversity and interactions based on bioactive molecules. Doctoral diss. Christian-Albrechts-Universität Kiel, 2014. 54 p.
- Offret C., Paulino S., Gauthier O., Château K., Bidault A., Corporeau C., Miner P., Petton B., Pernet F., Fabioux C., Paillard C., Le Blay G. The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020. V. 96. Art. fiae078.
- Paillard C., Gueguen Y., Wegner K.M., Bass D., Pallavicini A., Vezzulli L., Arzul I. Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2022. V. 73. P. 225–232.
- Pandiyani P., Balaraman D., Thirunavukkarasu R., George E.G.J., Subaramaniyan K., Manikkam S., Sadayappan B. Probiotics in aquaculture // *Drug Invention Today.* 2013. V. 5. P. 55–59.
- Pathak A., Stothard P., Chauhan A. Comparative genomic analysis of three *Pseudomonas* species isolated from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissues, mantle fluid, and the overlying estuarine water column // *Microorganisms.* 2021. V. 9. Art. 490.
- Ramírez C., Rojas R., Romero J. Partial evaluation of autochthonous probiotic potential of the gut microbiota of *Seriola lalandi* // *Probiot. Antimicr. Prot.* 2020. V. 12. P. 672–682.
- Rubiolo J.A., Botana L.M., Martinez P. Insights into mussel microbiome // *Microbial Communities in Aquaculture Ecosystems* / Ed. Derome N. 1st ed. Cham: Springer Int. Publ., 2019. P. 95–120.
- Salonius K., Siderakis C., MacKinnon A.M., Griffiths S.G. Use of *Arthrobacter davidanieli* as a live vaccine against *Renibacterium salmoninarum* and *Piscirickettsia salmonis* in salmonids // *Developments in Biologicals.* 2004. V. 121. P. 189–197.
- Santisi S., Genovese M., Bonsignore M., Fiumara E., Maricchiolo G., Mancuso M., Genovese L., Giuliano L., Cappello S. Study of bacterial communities in mussel *Mytilus galloprovincialis* by 16S rDNA // *Int. J. Microbiol. Applicat.* 2015. V. 2. P. 18–24.
- Schrader C., Reetz J., Süß J. Food-borne human pathogenic viruses and their molecular detection with special consideration of noroviruses and hepatitis A virus in mussels // *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.* 2003. V. 116. P. 496–505.
- Sharifuzzaman S.M., Austin B. *Kocuria* SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) // *J. Appl. Microbiol.* 2010. V. 108. P. 2162–2170.
- Simoes M., Simões L.C., Pereira M.O., Vieira M.J. Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*

in planktonic systems and in biofilms // Biofouling. 2008. V. 24. P. 339–349.

Youchimizu M., Kimura T. Study of intestinal microflora of salmonids // Fish Pathol. 1976. V. 10. P. 243–259.

Zhao Y., Liu H., Wang Q., Li B., Zhang H., Pi Y. The effects of benzo [a] pyrene on the composition of gut microbiota and the gut health of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka // Fish & Shellfish Immunol. 2019. V. 93. P. 369–379.

## Biodiversity and Metabolic Properties of Bacterial Communities from the Digestive System of the Bivalve *Crenomytilus grayanus*

T. I. Dunkai<sup>1, 2</sup>, E. A. Bogatyrenko<sup>1, \*</sup>, and A. V. Kim<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690922 Russia

<sup>2</sup>Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

<sup>3</sup>Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

\*e-mail: bogatyrenko.ea@dyfu.ru

Received March 10, 2023; revised March 30, 2023; accepted March 30, 2023

**Abstract**—Biodiversity of the bacterial communities in the digestive system of *Crenomytilus grayanus* inhabiting the coastal Sea of Japan waters with chronic anthropogenic pollution was investigated using metabarcoding. Apart from marine bacteria, the taxa typical under contamination with oil (*Rhodobacteraceae*, *Corynebacteriaceae*), heavy metals (*Asinibacterium*), and unprocessed municipal waste (*Cloacibacterium*, *Globicatella*) were revealed in the microbiota. A collection of 411 cultured heterotrophic bacterial strains isolated in the course of this study was characterized taxonomically. The intestinal microbiome of the studied mollusks was shown to have a unique composition, depending on their habitat. Ability of bacterial strains isolated from the *C. grayanus* digestive system to degrade various nutrient substrates (sugars, amino acids, and polysaccharides) and xenobiotics (oil hydrocarbons, bisphenol A, and atrazine) was studied. Most isolates degraded a broad range of organic substrates; 13% (54 strains) oxidized oil hydrocarbons; 1% (4 strains) oxidized bisphenol A; and 0.5% (2 strains) degraded atrazine. The possible role of the microbiome *C. grayanus* microbiome in symbiotic digestion and in detoxication of the mollusk is discussed.

**Keywords:** *Crenomytilus grayanus*, microbiome, NGS, anthropogenic pollution, atrazine, bisphenol, hydrocarbons