

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С КРАСНЫМИ ВОДОРОСЛЯМИ БЕЛОГО МОРЯ, КАК ИСТОЧНИК КСИЛАНОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2023 г. В. Д. Салова^а, *, А. М. Холдина^а, А. Д. Мельник^а, К. С. Заюлина^б, А. Г. Ельченинов^б,
А. А. Клюкина^б, И. В. Кубланов^{а, б}

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

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

*e-mail: salovavd@gmail.com

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 19.01.2023 г.

Принята к публикации 19.01.2023 г.

Микроорганизмы, ассоциированные с водорослями и обладающие способностью к использованию сложных субстратов (например, растительных гетерополисахаридов), могут являться важными продуцентами гидролитических ферментов. С помощью высокопроизводительного секвенирования варибельного участка V4 гена 16S рРНК был проведен анализ микробных сообществ красных водорослей *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp., отобранных в акватории Кандалакшского залива Белого моря. В микробиомах обоих образцов преобладали бактерии филумов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota* (классификация GTDB, <https://gtdb.ecogenomic.org/>). Для образца *Corallina* sp. было показано доминирование родов *Vibrio*, *Agarivorans* и *Photobacterium*, а для образца *Phyllophora* sp. — *Granulosicoccus* и *Aliivibrio*. Исследуемые красные макроводоросли с ассоциированной с ними микробиотой были использованы в качестве посевного материала для получения накопительных культур, растущих на β-1,4-ксиlane или β-1,3-глюкане (курдлан). Было показано, что во всех накопительных культурах также преобладали филумы *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*, однако, в отличие от природных образцов, доминирующими родами в накопительных культурах были *Marinomonas*, *Reinekea*, *Polaribacter* и *Pseudoalteromonas*. Представители последних, наряду с бактериями рода *Vibrio*, были выделены в чистые культуры, для которых была показана ксиланолитическая активность.

Ключевые слова: Белое море, красные водоросли, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, ксиланолитические микроорганизмы

DOI: 10.31857/S0026365622600882, **EDN:** FXDEOK

Микроорганизмы играют огромную роль в круговороте вещества и энергии как на нашей планете в целом (Заварзин, 1997), так и в Мировом океане в частности (Ducklow, 1983). Являясь единственным внутренним морем бассейна Северного Ледовитого океана, Белое море представляет собой уникальную экосистему с высокими скоростями продукции и деструкции органического вещества, интенсивным перемешиванием воды вследствие приливов и отливов, значительным пресноводным стоком (Саввичев и соавт., 2008), при этом микробные сообщества Белого моря (воды, осадков, обитающих в нем макроорганизмов) практически не исследованы. Ряд предыдущих работ был направлен на оценку численности микроорганизмов (Чикин и соавт., 2003; Кравчишина и соавт., 2008), изучение разнообразия и метаболизма отдельных метаболических групп (Горленко и соавт., 1985), определе-

ние скорости и локализации некоторых микробиологических процессов в Белом море (Саввичев и соавт., 2003, 2008). Относительно недавно появились первые результаты оценки разнообразия прокариот различных экотопов Белого моря, полученные путем анализа последовательностей гена 16S рРНК, например, данные о разнообразии бактерий в толще воды (Pesciaroli et al., 2015; Gorrasi et al., 2019a). При этом микробные сообщества, обитающие в донных осадках или на морских макроорганизмах, до сих пор практически не исследованы. К таким экотопам можно отнести талломы макроводорослей, с которыми должны быть ассоциированы богатые микробные сообщества, способные разлагать полисахариды водорослей.

Наиболее многочисленными макроводорослями Белого моря являются представители бурых

(семейства *Fucaceae* и *Laminariaceae*) и красных (семейства *Palmariaceae* и *Ahnfeltiaceae*) водорослей. Суммарная продукция макрофитов Белого моря составляет около 64 тыс. т $C_{орг.}$, при этом основной вклад в нее вносят роды *Laminaria* (39 тыс. т $C_{орг.}$) и *Fucus* (12 тыс. т $C_{орг.}$) (Романкевич, Ветров, 2001). На сегодняшний день микроорганизмы, ассоциированные с водорослями Белого моря, упоминаются лишь в одном исследовании, посвященном процессу использования углеводородов микроорганизмами, населяющими поверхность бурых водорослей рода *Fucus* (Семенова и соавт., 2009).

Ксиланы – одни из самых распространенных гемицеллюлоз наземных растений, и у высших растений они состоят из остатков ксилозы, соединенных β -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями, и разнообразных сахаров и/или кислот в боковых цепях (Hsieh, Harris, 2019). Ксиланы водорослей намного хуже исследованы и отличаются тем, что в их основной цепи встречаются β -(1 $\rightarrow$ 3)-связи, при этом они существуют и как гомополимеры, чьи остатки ксилозы связаны исключительно β -(1 $\rightarrow$ 3)-связями (Iriki et al., 1960), и как гетерополимеры, в которых чередуются β -(1 $\rightarrow$ 3)- и β -(1 $\rightarrow$ 4)-связи (Hsieh, Harris, 2019). Структура ксилана (как и его наличие) коррелирует с таксономическими группами водорослей. Известно, что среди водорослей отдела *Rhodophyta* β -1,3-D-ксилан характерен для клеточных стенок организмов класса *Bangiophyceae* (порядка *Bangiales*), а смесь β -1,3- и 1,4-D-ксиланов – для класса *Nemaliophycidae* (порядков *Nemaliales* и *Palmariales*) (Yoon et al., 2017a). В отделе *Chlorophyta* β -1,3-ксилан представлен в водорослях порядка *Bryopsidales* (Leliaert et al., 2012). Ксилан содержится также в клеточных стенках харовых водорослей (например, в порядках *Charales* и *Zygnematales*), которые относятся к отделу *Streptophyta* и являются пресноводными организмами (Hsieh, Harris, 2019). У разных водорослей доля ксилана в составе их клеточных стенок может варьировать. Например, содержание ксилозы (мономера ксилана) в клеточной стенке красной водоросли *Palmaria palmata* составляет 34.4% (Deniaud et al., 2003), в то время как для зеленых водорослей *Caulerpa* и *Dichotomosiphonales* β -1,3-ксилан может составлять до 50% веса клеточной стенки (Kloareg, Quatrano, 1988).

Гидролиз ксилана осуществляется с помощью ксиланаз, которые достаточно широко распространены среди микромицетов (Shuvaeva, Sysoeva, 2010) и различных прокариот, в подавляющем большинстве представителей бактерий (Mandal, 2015), а также нескольких архей (Gavrilov et al., 2016; Suleiman et al., 2020). Неисследованные микроорганизмы, ассоциированные с морскими водорослями, могут являться потенциальными продуцентами новых ксиланаз. Ожидается, что

ксиланазы микроорганизмов, обитающих в холодных морях, будут активны при температурах, близких к 0°C и могут быть эффективными в достаточно широком диапазоне температур и pH (Qeshmi et al., 2020).

Целью настоящей работы являлось исследование разнообразия микроорганизмов, ассоциированных с содержащими ксилан водорослями Белого моря и способности этих микроорганизмов разлагать ксилан. В ходе нашей работы были изучены микробные сообщества, ассоциированные с красными водорослями, а также были получены накопительные и чистые культуры ксиланолитических бактерий, предположительно, обитающих на этих водорослях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые образцы. Материал для исследования отбирали легководолазным способом в августе 2021 г. в акватории Кандалакшского залива Белого моря вблизи Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Было отобрано три образца красных водорослей, относящихся к родам *Corallina*, *Phyllophora* и *Porphyra*. Образцы использовали для исследования ассоциированных с ними микробных сообществ с помощью высокопроизводительного секвенирования, а также в качестве посевного материала для культивирования. В первом случае образцы фиксировали в стерильном буфере (100 мМ ЭДТА, 100 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl; pH 8.0), во втором оставляли интактными в стерильной морской воде до посева на питательную среду. В обоих случаях образцы хранили при 4°C.

Выделение и секвенирование ДНК. Для выделения тотальной ДНК использовали небольшую часть таллома водорослей (0.5–1.0 см), которая была зафиксирована в буфере и хранилась при 4°C. Из накопительных культур клетки микроорганизмов предварительно осаждали центрифугированием (центрифуга 5810 R, “Eppendorf”, Германия) при 7000 g при 4°C в течение 20 мин. Тотальную ДНК из природных образцов и накопительных культур выделяли с помощью набора FastDNA™ Spin Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью набора QuDye dsDNA HS Assay Kit (“Lumiprobe”, Россия) и флуориметра Qubit 2.0 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Препараты ДНК хранили при температуре –20°C. Приготовление библиотек для секвенирования гипервариабельного участка V4 гена 16S рРНК на платформе Illumina проводили, как описано у Vortsepneva et al. (2021). Высокопроизводительное секвенирование проводили на секвене-

торе MiSeq (“Illumina”, США) в соответствии с инструкциями производителя.

ДНК из чистых культур выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для амплификации последовательности гена 16S рРНК использовали праймеры 8F (5'-AGAGTTTGTACCTGGCT-CAG) и 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGTTG). ПЦР-амплификацию проводили по следующей схеме: первоначальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 30 циклов (95°C в течение 30 с, 60°C в течение 1 мин, и 72°C в течение 1 мин) и финальная элонгация при 72°C в течение 20 мин. Очистку ПЦР-продуктов проводили с помощью набора GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Определение последовательности гена 16S рРНК проводили по Сэнгеру на секвенаторе ABI 3730XL DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США).

Обработка последовательностей и анализ данных. Прочтения V4 региона гена 16S рРНК, полученные в двух повторностях для каждого образца, обрабатывали для дальнейшего анализа так, как это описано в работе Gavrilov et al. (2019). Полученные данные анализировали с использованием сервиса SILVAngs с параметрами по умолчанию (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>) и базы данных SILVA138.1 SSU. При необходимости, для более точного определения таксономии полученных последовательностей, проводили поиск ближайших родственных в базах данных NCBI с помощью BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Данные о распределении микроорганизмов представлены в виде среднего значения по двум повторностям.

Статистический анализ проводили с помощью ПО QIIME 2 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). Для описания степени разнообразия каждого образца (α -разнообразия) были использованы следующие индексы: Шеннона (Shannon, Weaver, 1949), Фишера (Fisher et al., 1943) и Пиелу (Pielou, 1966). Анализ разнообразия между исследуемыми образцами (β -разнообразия) проводили с использованием матрицы расхождения Брея–Кертиса (Sorensen, 1948) и метода ординации PCoA (Principle Coordinates Analysis).

Полученные в ходе секвенирования по Сэнгеру последовательности обрабатывали и собирали с помощью ПО BioEdit. Для определения таксономического положения использовали NCBI BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Постановка накопительных культур. В качестве питательной среды для получения и пересевов накопительных культур использовали профильтрованную через фильтр грубой очистки (100 мкм) морскую воду, к которой добавляли буковый ксилан (1 г л⁻¹; “Megazyme”, Ирландия) или курдлан (1 г л⁻¹; “Megazyme”, Ирландия). Курдлан (β -1,3-

глюкан) выступал в роли аналога β -1,3-ксилана, присутствующего в клеточных стенках водорослей порядка *Bangiales* (Hsieh, Harris, 2019), соответственно, среду с курдланом использовали для культивирования микроорганизмов с поверхности *Porphyra* sp. Культивирование проводили в аэробных условиях во флаконах объемом 100 мл, заполненных 20 мл среды. При дальнейших пересевах накопительные культуры культивировали во флаконах объемом 10 мл с 5 мл среды; в обоих случаях засеянные среды инкубировали при температуре 15°C в течение 10 сут.

Выделение чистых культур ксиланолитических бактерий. Микроорганизмы, доминирующие в накопительных культурах, в которых по результатам фазово-контрастной микроскопии (BX51; “Olympus”, Япония) был отмечен наиболее активный рост микробов, выделяли в чистые культуры с помощью метода предельных разведений с последующим высевом на плотную среду. В качестве среды использовали профильтрованную через фильтр грубой очистки (100 мкм) морскую воду с добавлением букового ксилана (1 г л⁻¹) и агарозы (15 г л⁻¹; “VWR Amresco”, США).

Для поддержания чистых культур использовали плотную среду на основе морской воды, профильтрованной через фильтр грубой очистки (100 мкм), с добавлением букового ксилана (1 г л⁻¹), дрожжевого экстракта (0.1 г л⁻¹) и агарозы (15 г л⁻¹).

Анализ ксиланолитической активности. Ксиланолитическую активность выделенных штаммов анализировали качественно с помощью красителя Конго красного. Для этого исследуемые штаммы культивировали на плотной среде с добавлением букового ксилана (1 г л⁻¹; “Megazyme”, Ирландия) при 15°C в течение 5 сут. Выросшие колонии смывали, а агаризованную среду окрашивали 0.1% раствором Конго красного в течение 15–30 мин, излишки красителя удаляли 1 М раствором NaCl. Активность ксиланаз оценивали по наличию зон просветления в местах образования и вокруг колоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование состава микробных сообществ, ассоциированных с красными водорослями. Микробные сообщества, ассоциированные с красными водорослями Кандалакшского залива Белого моря, были исследованы методом высокопроизводительного секвенирования переменных участков V4 генов 16S рРНК присутствующих в них микроорганизмов. Было изучено три образца талломов красных водорослей родов *Corallina*, *Phyllophora* и *Porphyra*, однако определить структуру микробных сообществ, ассоциированных с этими талломами, удалось только для первых двух. Состав микробного сообщества, ассоциированного с во-

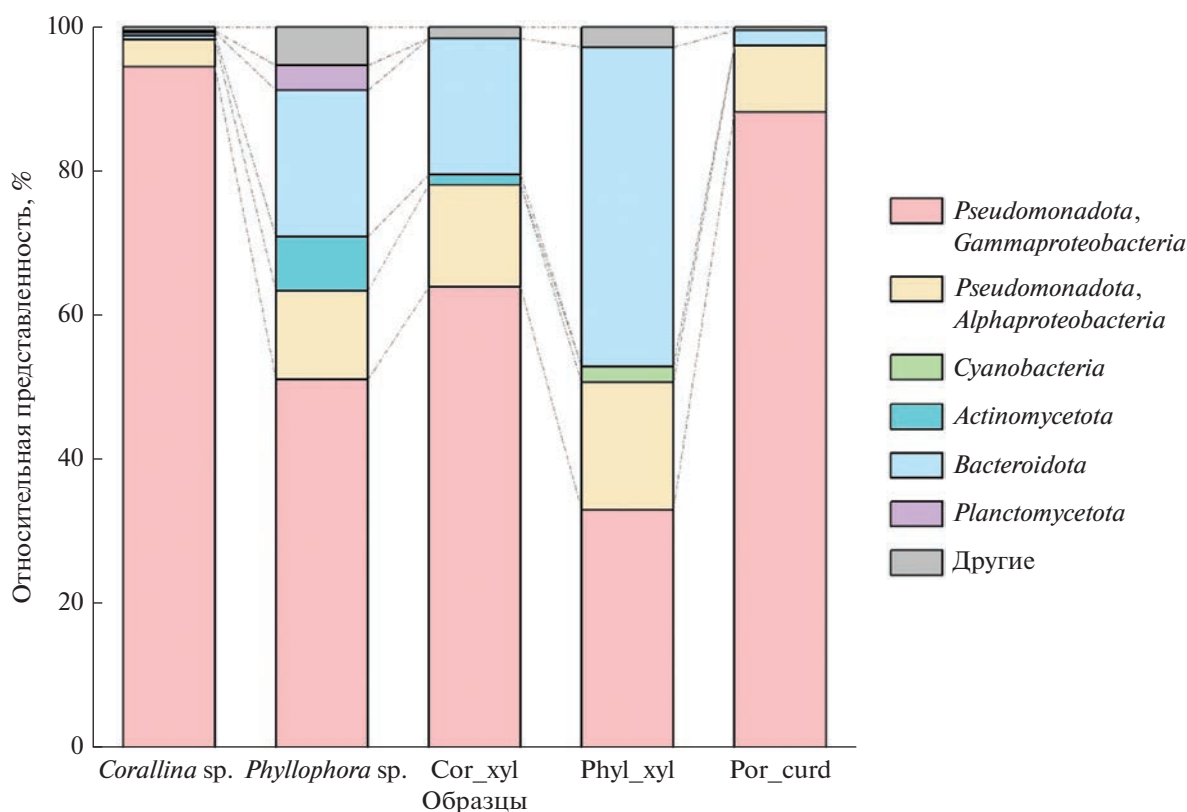


Рис. 1. Микробный состав образцов на уровне филумов. Филумы с относительной представленностью <3% были собраны в группу “Другие”. Cor_xyl — накопительная культура, засеянная талломом *Corallina* sp., с добавлением букового ксилана; Phyl_xyl — накопительная культура, засеянная талломом *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана; Por_curd — накопительная культура, засеянная талломом *Porphyra* sp., с добавлением курдлана.

дорослями рода *Porphyra* определить не удалось, предположительно, из-за низкого содержания прокариотической ДНК в образце.

Среди микробных ассоциантов таллома красной водоросли *Corallina* sp., были обнаружены представители 5 бактериальных филумов (рис. 1). Филум *Pseudomonadota* был самым многочисленным, его доля в микробиоме составила 97.7% (всех полученных последовательностей здесь и далее), из которой 94.4% относятся к *Gammaproteobacteria*, а 3% — к *Alphaproteobacteria*. Самыми многочисленными семействами являлись *Vibrionaceae* и *Psychromonadaceae*, которые относятся к порядку *Enterobacterales*, а на уровне рода — к представителям *Vibrio*, *Agarivorans*, *Photobacterium* и *Aliivibrio*.

В образце таллома красной водоросли *Phyllophora* sp. были обнаружены представители 11 филумов, среди которых самым многочисленным также являлся *Pseudomonadota* (63%), и, в частности, классы *Gammaproteobacteria* (51%) и *Alphaproteobacteria* (12%). Следующим по численности был филум *Bacteroidota* (20%), основу которого составил класс *Bacteroidia* (преобладали порядки *Flavobacteriales* (9%) и *Chitinophagales* (11%)). Так-

же стоит отметить присутствие представителей филумов *Actinomycetota* и *Planctomycetota*, доля которых составила 7.5 и 3% соответственно. Наиболее представленными в классе *Gammaproteobacteria* оказались следующие порядки: *Enterobacterales* (20%) и *Granulosicoccales*, который был представлен единственным родом *Granulosicoccus* (13%). Большинство представителей *Enterobacterales* относились к семейству *Vibrionaceae* (12%), а именно к роду *Aliivibrio* (10%). Подавляющую часть *Alphaproteobacteria* составили бактерии порядков *Rhodobacterales* (5.5%) и *Caulobacterales* (4%). Филум *Actinomycetota* был представлен одним порядком — *Microtrichales* (7.5%), большую часть составила некультивируемая клада Sva0996 marine group (6%).

Получение накопительных культур, гидролизующих ксилан. Образцы талломов красных водорослей Кандалакшского залива использовали для инокуляции жидких аэробных сред с ксиланом и курдланом с последующей инкубацией при 15°C. На основании оценки роста с помощью фазово-контрастной микроскопии для дальнейших пересевов были отобраны три накопительные культуры: две культуры, использующие ксилан, где инокуля-

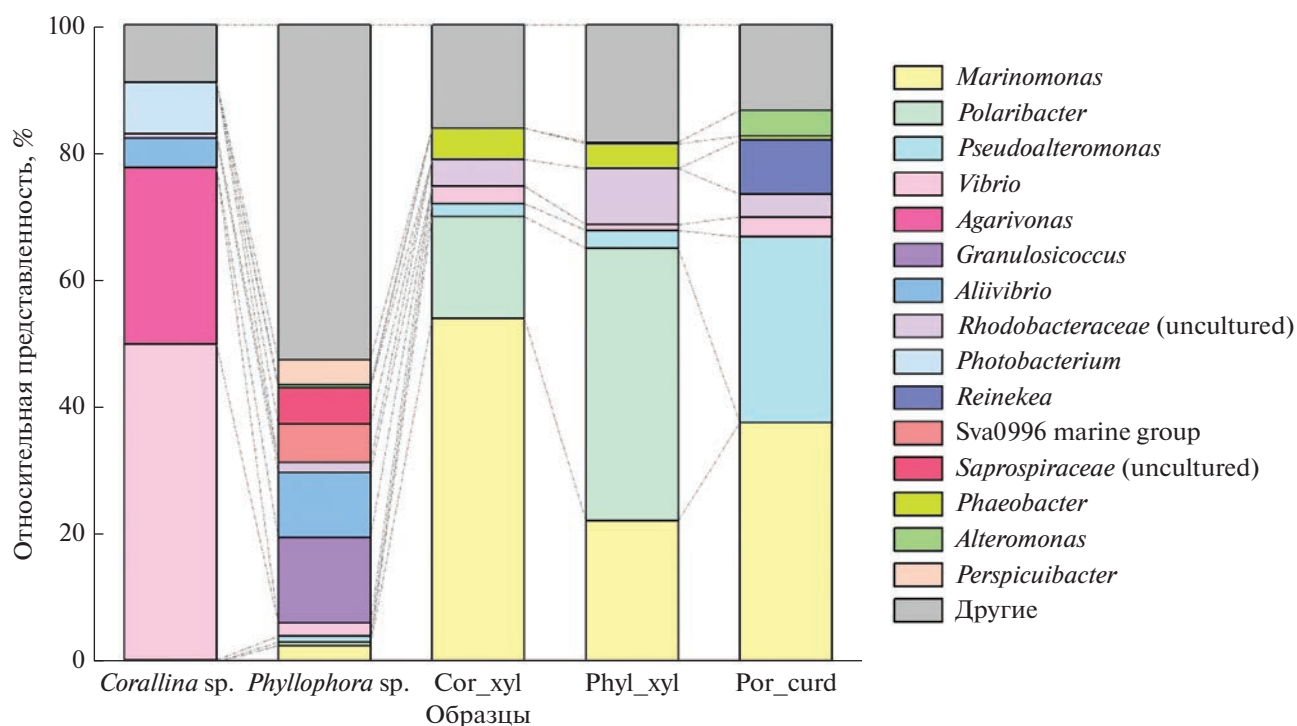


Рис. 2. Микробный состав образцов на уровне рода. Рода с относительной представленностью <3% были собраны в группу “Другие”. Cor_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Corallina* sp., с добавлением букового ксилана, Phyl_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана, Por_curd – накопительная культура, засеянная талломом *Porphyra* sp., с добавлением курдлана.

том служили талломы *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp. (Cor_xyl и Phyl_xyl соответственно), и одна культура, растущая на курдлане, где инокулятом являлся таллом *Porphyra* sp. (Por_curd).

Анализ состава накопительных культур, использующих ксилан в качестве субстрата. Для высокопроизводительного секвенирования переменного участка V4 гена 16S рРНК были выбраны накопительные культуры после одного (Cor_xyl и Phyl_xyl) или двух (Por_curd) последовательных пересевов и инкубации в течение 10 сут при 15°C.

В накопительной культуре Cor_xyl доминировали представители филума *Pseudomonadota* (78% всех полученных последовательностей) – роды *Marinomonas* (54%), *Vibrio* (3%), *Pseudoalteromonas* (2%) и *Pseudomonas* (1%) (рис. 2). Также в значительном количестве присутствовали бактерии филума *Bacteroidota* (19%), в основном род *Polaribacter* (16%).

Для накопительной культуры Phyl_xyl также были характерны филумы *Pseudomonadota* (51%) и *Bacteroidota* (44%), в значительно меньшем количестве присутствовали филумы *Cyanobacteria* (2%) и *Bdellovibrionota* (1%). Как и в накопительной культуре Cor_xyl, преобладали роды *Marinomonas* (22%) и *Polaribacter* (41%).

Наконец, в накопительной культуре Por_curd было обнаружено абсолютное доминирование филума *Pseudomonadota*, представители которого

составили около 97% микробного сообщества. Большую долю составили роды *Marinomonas* (38%), *Pseudoalteromonas* (29%) и *Reinekea* (8%). Также во всех накопительных культурах значительную долю составили представители семейства *Rhodobacteraceae* (9–20%) класса *Alphaproteobacteria*.

Анализ α-разнообразия и β-разнообразия. Анализ α-разнообразия показал, что в природном образце *Corallina* sp. биоразнообразие было ниже, чем в образце *Phyllophora* sp. Разнообразие в накопительных культурах сравнимо с природным образцом *Corallina* sp. (табл. 1). Анализ β-разнообразия показал, что микробиомы природных образцов составляют свои отдельные кластеры, тогда как сообщества всех накопительных культур кластеризуются в одну группу (рис. 3).

Выделение чистых культур. Всего из накопительных культур, растущих на среде с ксиланом и курдланом, было выделено 14 изолятов: 6 – из накопительной культуры Cor_xyl, 4 – из Phyl_xyl и 4 – из Por_curd. Определение ксиланолитической активности с помощью Конго красного показало, что к гидролизу ксилана способны три штамма, обозначенные как Cor_xyl_2, Phyl_xyl_7 и Por_curd_11. На основе филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штаммы Cor_xyl_2, Phyl_xyl_7 и Por_curd_11

Таблица 1. Индексы α -разнообразия для исследуемых образцов

Образец	Наблюдаемое разнообразие	Индекс Шеннона*	Индекс Фишера**	Индекс выравненности Пielou***
<i>Corallina</i> sp.	32	2.52	4.15	0.52
<i>Phyllophora</i> sp.	132	6.05	24.19	0.86
Cor_xyl	39	3.49	4.94	0.69
Phyl_xyl	31	3.48	4.87	0.70
Por_curd	19	3.13	2.84	0.72

* Shannon, Weaver, 1949.

** Fisher et al., 1943.

*** Pielou, 1966.

Примечание. Cor_xyl — накопительная культура, засеянная талломом *Corallina* sp., с добавлением букового ксилана; Phyl_xyl — накопительная культура, засеянная талломом *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана; Por_curd — накопительная культура, засеянная талломом *Porphyra* sp., с добавлением курдлана.

были идентифицированы как представители родов *Pseudoalteromonas* и *Vibrio* (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основу микробных сообществ на поверхности морских макроводорослей обычно составляют представители *Pseudomonadota*, *Bacteroidota*, *Bacillota* и *Actinomycetota*, при этом более половины сообщества представлено первым филумом (Hollants et al., 2013; Gaitan-Espitia, Schmid, 2020). Представители филумов *Pseudomonadota* (классы

Gammaproteobacteria и *Alphaproteobacteria*) и *Bacteroidota* (порядок *Flavobacteriales*) также преобладают в бактериальном сообществе прибрежной воды Белого моря по данным Gorrasi et al. (2019a, 2019b). В исследованных нами образцах талломов водорослей Белого моря наблюдалась схожая картина: преобладали филумы *Pseudomonadota*, *Bacteroidota* и *Actinomycetota*, при этом в образце *Corallina* sp. разнообразие на уровне филумов было представлено одной кладой (*Pseudomonadota*, 98%). В обзорной работе Hollants et al. (2013) для красных и бурых водорослей было показано большее разнообразие видов, относящихся к *Bacillota*, *Actinomycetota* и *Planctomycetota*. В нашем исследовании эти группы присутствовали в значительном количестве только в микробиоме *Phyllophora* sp. В работе Brodie et al. (2016) было описано более разнообразное микробное сообщество, ассоциированное с *Corallina officinalis*, отобранной в Бристольском заливе: было обнаружено 35 бактериальных филумов, среди которых многочисленными являлись *Pseudomonadota*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota*. В меньшей степени были представлены *Planctomycetota*, *Acidobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, *Bacillota*, *Chloroflexota* и *Nitrospirata*. Внутри филума *Pseudomonadota* классы *Gammaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria* составляли примерно равные доли. Такое различие микробного разнообразия можно объяснить методическими особенностями. Так, Brodie et al. (2016) для описания разнообразия использовали область V6 гена 16S рРНК. При анализе микробиома *C. officinalis* в другой работе преобладали *Bacteroidota* и *Gammaproteobacteria* (Huggett et al., 2006). Однако в нашем образце было выявлено явное доминирование класса *Gammaproteobacteria* (рис. 1). На данный момент нет работ, посвященных описанию микробиома красной водоросли рода *Phyllophora*. Тем не менее, для *Phyllophora crispa* было показано наличие аммоний-окисляющих бактерий, а именно *Nitrosospora* spp. и *Nitrosomonas euro-*

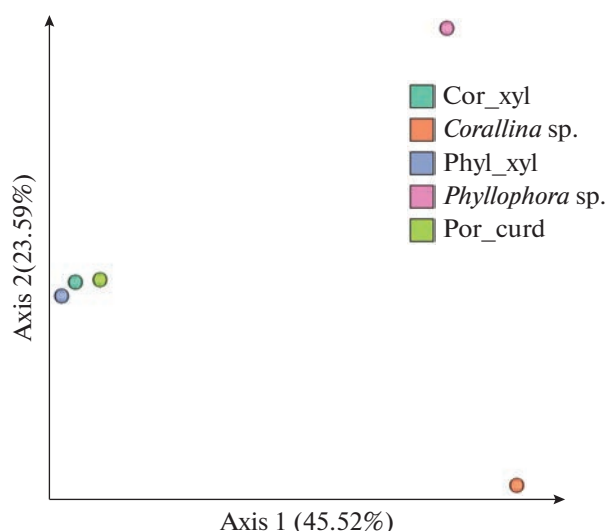


Рис. 3. Анализ β -разнообразия микробных сообществ исследуемых образцов, проведенный с использованием матрицы расхождения Брея–Кертиса и метода ординации PCoA (Principle Coordinates Analysis). Cor_xyl — накопительная культура, засеянная талломом *Corallina* sp., с добавлением букового ксилана; Phyl_xyl — накопительная культура, засеянная талломом *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана; Por_curd — накопительная культура, засеянная талломом *Porphyra* sp., с добавлением курдлана.

Таблица 2. Результаты анализа последовательностей гена 16S рНК

Штамм	Исходный природный образец	Субстрат	Ближайшие родственные виды	Сходство с типовым штаммом, %
Cor_xyl_2	<i>Corallina</i> sp.	Ксилан	<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> / <i>P. marina</i> / <i>P. paragorgicola</i> / <i>P. elyakovii</i> / <i>P. arctica</i>	99.48
Phyl_xyl_7	<i>Phyllophora</i> sp.	Ксилан	<i>Vibrio lentus</i> / <i>V. atlanticus</i> / <i>V. cyclitrophicus</i> / <i>V. gigantis</i> / <i>V. kanaloae</i> / <i>V. tasmaniensis</i> / <i>V. splendidus</i> / <i>V. gallaecicus</i> / <i>V. pomeroyi</i> / <i>V. chagasii</i> / <i>V. crassostreae</i>	99.65
Por_curd_11	<i>Porphyra</i> sp.	Курдлан	<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i> / <i>P. atlantica</i>	100.00

paea (Trias et al., 2012). Однако для нашего образца присутствие этих организмов показано не было.

На более низких таксономических уровнях среди микробных сообществ красных водорослей чаще, чем среди зеленых и бурых, встречаются роды *Vibrio*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Roseobacter* и *Photobacterium* (Hollants et al., 2013). В работе Huggett et al. (2006) с поверхности *C. officinalis* были выделены штаммы родов *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Photobacterium* и *Pseudomonas*, при этом в нашем образце *Vibrio* и *Photobacterium* были одними из самых многочисленных (рис. 2).

В нашей работе микробное разнообразие в образце *Phyllophora* sp. было больше, чем в образце *Corallina* sp., что подтверждается индексами α -разнообразия ($p < 0.05$, тест Стьюдента) (табл. 1). Кроме того, стоит отметить, что в образце *Phyllophora* sp. не наблюдалось доминирование определенных групп, когда для *Corallina* sp. основную долю составили представители родов *Vibrio*, *Agarivorans*, *Photobacterium* и *Aliivibrio*. Поскольку многочисленными родами бактерий среди различных прибрежных образцов Белого моря являются *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Vibrio* и *Halomonas* (Gorrasi et al., 2019a, 2019b). В работе Singh, Reddy (2014) сделано заключение, что на представителях разных видов красных макроводорослей, произрастающих в одной и той же экологической нише, образуются специфические для каждого вида бактериальные сообщества.

Для микробных сообществ накопительных культур единственным источником углерода и энергии были ксилан (Cor_xyl и Phyl_xyl) и курдлан (Por_curd). В двух накопительных культурах Cor_xyl и Phyl_xyl преобладали и достоверно увеличили свою долю в сообществе представители *Polaribacter* ($p < 0.05$, тест Стьюдента) и *Marinomonas* ($p < 0.01$, тест Стьюдента). Эти доминирующие роды входили в минорную группу соответствующих природных образцов. Известно, что род *Polaribacter* способен к гидролизу различных морских полисахаридов, входящих в состав клеточной стенки водорослей (Xing et al., 2015; Avci

et al., 2020). Анализ полных геномов показал наличие у этих микроорганизмов генов, кодирующих около 85 ферментов, участвующих в деградации полисахаридов (Yoon et al., 2017b). В ряде исследований у бактерий рода *Polaribacter* были обнаружены гены, кодирующие ферменты, предположительно способные расщеплять ксилан, например, эндо- β -1,4-ксилаза (Kim et al., 2019), и было показано наличие специальных симпортеров для ксилозы (Xing et al., 2015). Стоит отметить, что по сравнению с другими обнаруженными родами род *Polaribacter* входил в состав минорной группы морской воды Белого моря (Gorrasi et al., 2019a, 2019b). Для рода *Marinomonas* в единичных работах были показаны альгиная (Martin et al., 2015), агаразная (Yu et al., 2020) и слабая ксиланная активности (Johnson et al., 2017).

В накопительной культуре Por_curd, в которой курдлан (β -1,3-глюкан) был единственным источником энергии и углерода, доминирующими микроорганизмами оказались представители *Marinomonas*, *Pseudoalteromonas* и *Reinekea* (рис. 2). Эти таксоны, по всей видимости, не случайны, так как известно, что род *Pseudoalteromonas* способен к гидролизу ламинарина, в состав которого входит β -1,3-глюкан (Gobet et al., 2018). Для представителей этого рода была показана ферментативная активность по отношению к разнообразным гемицеллюлозам, включая ксиланы (Ray et al., 2019). Некоторые представители рода *Reinekea* обладают ферментами для разложения маннана и α -глюканов (Avci et al., 2017), но данных о способности к гидролизу ксилана на данный момент нет.

Несмотря на все различия, микробные сообщества накопительных культур кластеризуются в одну группу, что показали результаты анализа β -разнообразия (рис. 3). В связи с этим мы можем предположить, что, несмотря на то, что они являются представителями широко распространенных в воде Белого моря родов, на исследованных нами субстратах накапливаются именно ксиланолитические микроорганизмы. Кроме того, исходя из литературных данных, можно предположить, что во всех накопительных культурах род

Marinomonas, а в *Por_curd* род *Reinekea* являются диссипотрофами, использующими продукты гидролиза исследуемых полисахаридов, получаемых в результате действия гидролитических ферментов *Polaribacter* и *Pseudoalteromonas*.

Выделенные из накопительных культур *Cor_xyl* и *Phyl_xyl* штаммы, способные гидролизовать ксилан, относились к родам *Pseudoalteromonas* и *Vibrio* соответственно. Эти рода не являлись доминирующими в составе всех исследованных микробных сообществ, их доли не превышали 2%. На курдлане в чистую культуру был выделен представитель рода *Pseudoalteromonas*, который доминировал в накопительной культуре *Por_curd*. Известно, что представители рода *Vibrio* обладают возможностью продуцировать различные гидролитические ферменты, в том числе и β -1,3-ксилазы (Araki et al., 1999). Кроме того, было показано наличие D-ксилозоизомераз (Umemoto et al., 2012), что также свидетельствует о способности к гидролизу ксиланов.

Выделять ксиланолитические микроорганизмы можно не только с поверхности высших растений, но также и с макроводорослей, в клеточных стенках которых содержится ксилан. Красные макроводоросли из арктических морей могут являться объектом для поиска психоактивных микроорганизмов, обладающих ксиланолитической активностью при пониженных температурах. В нашей работе были исследованы микробиомы беломорских макроводорослей *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp., для которой это было сделано впервые. Были оценены изменения относительной представленности таксонов микроорганизмов с поверхности красных водорослей при культивировании на ксилане и курдлане и выделены накопительные и чистые культуры на этих субстратах, обладающие ксиланазной активностью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к. б. н., с. н. с. Е.Н. Виноградовой (МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в определении водорослей и пробоподготовке для секвенирования чистых культур, к. б. н., с. н. с. А.Ю. Меркелю (ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь в статистической обработке данных, директору ББС им. Н.А. Перцова д. б. н., проф. А.Б. Цетлину и всему коллективу биостанции за предоставление возможности выполнения работы на ее базе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горленко В.М., Пучкова Н.Н., Демчев В.В. Фотосинтезирующие микроорганизмы супралиторали Белого моря // Биологические науки. 1985. Т. 5. С. 66–72.
- Заварзин Г.А. Становление биосферы // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 725–734.
- Zavarzin G.A. The rise of the biosphere // Microbiology (Moscow). 1997. V. 66. P. 603–611.
- Кравчишина М.Д., Мицкевич И.Н., Веслоpolова Е.Ф., Шевченко В.П., Лисицын А.П. Взаимосвязь взвеси и микроорганизмов в водах Белого моря // Океанология. 2008. Т. 48. С. 900–917.
- Kravchishina M.D., Mitzkevich I.N., Veslopolova E.F., Shevchenko V.P., Lisitsin A.P. Relationship between the suspended particulate matter and microorganisms in the White Sea waters // Oceanology. 2008. V. 48. P. 837–854.
- Романкевич Е.А., Ветров А.А. Цикл углерода в арктических морях России. М.: Наука, 2001. 300 с.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Захарова Е.Е., Веслоpolова Е.Ф., Мицкевич И.Н., Кравчишина М.Д., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробные процессы циклов углерода и серы в Белом море // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 823–838.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Mitzkevich I.N., Kravchishina M.D., Lein A. Yu., Ivanov M.V. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in the White Sea // Microbiology (Moscow) 2008. V. 77. P. 734–750.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Юсупов С.К., Байрамов И.Т., Пименов Н.В., Леин А.Ю., Иванов М.В. Процесс микробной сульфатредукции в осадках прибрежной зоны и литорали Канда拉克шского залива Белого моря // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 535–546.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Yusupov S.K., Bairamov I.T., Pimenov N.V., Lein A. Y., Ivanov M.V. The process of microbial sulfate reduction in sediments of the coastal zone and littoral of the Kandalaksha Bay of the White Sea // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 478–489.
- Семенова Е.В., Шлыкова Д.С., Семенов А.М., Иванов М.Н., Шеляков О.В., Нетрусов А.И. Бактерии-эпифиты бурых водорослей в утилизации нефти в экосистемах северных морей // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2009. № 3. С. 18–22.
- Чикин С.М., Тарасова Н.А., Саралов А.И., Банникова О.М. Особенности распространения бактерио- и мезозоопланктона в прибрежных водах Белого и Баренцева морей // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 250–258.
- Chikin S.M., Tarasova N.A., Saralov A.I., Bannikova O.M. The distribution of bacterio- and mesozooplankton in the coastal waters of the White and Barents seas // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 213–220.

- Araki T., Tani S., Maeda K., Hashikawa S., Nakagawa H., Morishita T. Purification and characterization of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. XY-214 // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1999. V. 63. P. 2017–2019.
- Avcı B., Hahnke R.L., Chafee M., Fischer T., Gruber-Vodicka H., Tegetmeyer H.E., Harder J., Fuchs B.M., Amann R.I., Teeling H. Genomic and physiological analyses of 'Reinekeia forsetii' reveal a versatile opportunistic lifestyle during spring algae blooms // Environ. Microbiol. 2017. V. 19. P. 1209–1221.
- Avcı B., Krüger K., Fuchs B.M., Teeling H., Amann R.I. Polysaccharide niche partitioning of distinct *Polaribacter* clades during North Sea spring algal blooms // ISME J. 2020. V. 14. № 6. P. 1369–1383.
- 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. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.
- Brodie J., Williamson C., Barker G.L., Walker R.H., Briscoe A., Yallop M. Characterising the microbiome of *Corallina officinalis*, a dominant calcified intertidal red alga // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. P. fiw110.
- Deniaud E., Quemener B., Fleurence J., Lahaye M. Structural studies of the mix-linked β -(1 $\rightarrow$ 3)/ β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-xylans from the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta) // Int. J. Biol. Macromol. 2003. V. 33. P. 9–18.
- Ducklow H.W. Production and fate of bacteria in the oceans // Bioscience. 1983. V. 33. P. 494–501.
- Fisher R.A., Corbet A.S., Williams C.B. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population // J. Anim. Ecol. 1943. V. 12. P. 42–58.
- Gaitan-Espitia J.D., Schmid M. Diversity and functioning of Antarctic seaweed microbiomes // Antarctic Seaweeds: Diversity, Adaptation and Ecosystem Services / Eds. Gómez I., Huovinen P. Cham: Springer, 2020. P. 279–291.
- Gavrilov S.N., Korzhenkov A.A., Kublanov I.V., Bargiela R., Zamana L.V., Popova A.A., Peter S.V., Golyshin N., Golyshina O.V. Microbial communities of polymetallic deposits' acidic ecosystems of continental climatic zone with high temperature contrasts // Front. Microbiol. 2019. Art. 1573.
- Gavrilov S.N., Stracke C., Jensen K., Menzel P., Kallnik V., Slesarev A., Sokolova T., Zayulina K., Brasen K., Bonch-Osmolovskaya E.A., Peng X., Kublanov I., Siebers B. Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319X1 and its unusual multidomain glycosidase // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 552.
- Gobet A., Barbeyron T., Matard-Mann M., Magdelenat G., Vallenet D., Duchaud E., Michel G. Evolutionary evidence of algal polysaccharide degradation acquisition by *Pseudoalteromonas carrageenovora* 9T to adapt to macroalgal niches // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2740.
- Gorrasi S., Pesciaroli C., Barghini P., Pasqualetti M., Fenice M. Structure and diversity of the bacterial community of an Arctic estuarine system (Kandalaksha Bay) subject to intense tidal currents // J. Mar. Syst. 2019a. V. 196. P. 77–85.
- Gorrasi S., Pesciaroli C., Barghini P., Pasqualetti M., Giovannini V., Massimiliano F. Metagenetic profiling of the bacterial communities of an intertidal pool in Kandalaksha Bay (White Sea, Russia) // J. Environ. Prot. Ecol. 2019b. V. 20. P. 1317–1324.
- Hollants J., Leliaert F., De Clerck O., Willems A. What we can learn from sushi: a review on seaweed–bacterial associations // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. V. 83. P. 1–16.
- Hsieh Y.S.Y., Harris P.J. Xylans of red and green algae: what is known about their structures and how they are synthesised? // Polymers. 2019. V. 11. Art. 354.
- Huggett M.J., Williamson J.E., De Nys R., Kjelleberg S., Steinberg P.D. Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae // Oecologia. 2006. V. 149. P. 604–619.
- Iriki Y., Suzuki T., Nisizawa K., Miwa T. Xylan of siphonaceous green algae // Nature. 1960. V. 87. P. 82–83.
- Johnson J., Sudheer P.D., Yang Y.H., Kim Y.G., Choi K.Y. Hydrolytic activities of hydrolase enzymes from halophilic microorganisms // Biotechnol. Bioproc. Eng. 2017. V. 22. P. 450–461.
- Kim S.J., Kim J.G., Lee S.H., Park S.J., Gwak J.H., Jung M.Y., Chung W.H., Yang E.J., Park J., Jung J., Hahn Y., Cho J.C., Madsen E.L., Rodriguez-Valera F., Hyun J.H., Rhee S.K. Genomic and metatranscriptomic analyses of carbon remineralization in an Antarctic polynya // Microbiome. 2019. V. 7. P. 1–15.
- Kloareg B., Quatrano R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides // Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. 1988. V. 26. P. 259–315.
- Leliaert F., Smith D.R., Moreau H., Herron M.D., Verbruggen H., Delwiche C.F., Clerck O.D. Phylogeny and molecular evolution of the green algae // Crit. Rev. Plant Sci. 2012. V. 31. P. 1–46.
- Mandal A. Review on microbial xylanases and their applications // Int. J. Life Sci. 2015. V. 4. P. 178–187.
- Martin M., Barbeyron T., Martin R., Portetelle D., Michel G., Vandenbol M. The cultivable surface microbiota of the brown alga *Ascophyllum nodosum* is enriched in macroalgal-polysaccharide-degrading bacteria // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1487.
- Pesciaroli C., Rodelas B., Juárez-Jiménez B., Barghini P., Fenice M. Bacterial community structure of a coastal area in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia: possible relation to tidal hydrodynamics // Ann. Microbiol. 2015. V. 65. P. 443–453.
- Pielou E.C. The measurement of diversity in different types of biological collections // J. Theor. Biol. 1966. V. 13. P. 131–144.
- Qeshmi F.I., Homaei A., Fernandes P., Hemmati R., Dijkstra B.W., Khajeh K. Xylanases from marine microorganisms: a brief overview on scope, sources, features and potential applications // Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteom. 2020. V. 1868. P. 140312.
- Ray S., Vigouroux J., Boudier A., Allami M.F., Geairon A., Fanuel M., Ropartz D., Helbert W., Lahaye M., Bonnin E. Functional exploration of *Pseudoalteromonas atlantica* as a source of hemicellulose-active enzymes: evidence for a GH8 xylanase with unusual mode of action // Enzyme Microb. Technol. 2019. V. 127. P. 6–16.
- Shannon C.E., Weaver W. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois. Urbana, 1949. V. 117.

- Shuvaeva G.P., Sysoeva M.G. Xylanase of the micromycete *Rhizopus* var. *microsporus* 595: preparation, structural and functional characteristics, and application // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 641–647.
- Singh R.P., Reddy C.R.K. Seaweed–microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 88. P. 213–230.
- Sorensen T.A. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons // Biol. Skar. 1948. V. 5. P. 1–34.
- Suleiman M., Krüger A., Antranikian G. Biomass-degrading glycoside hydrolases of archaeal origin // Biotechnol. Biofuels. 2020. V. 13. P. 1–14.
- Trias R., García-Lledó A., Sánchez N., López-Jurado J.L., Hallin S., Bañeras L. Abundance and composition of epiphytic bacterial and archaeal ammonia oxidizers of marine red and brown macroalgae // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 318–325.
- Umemoto Y., Shibata T., Araki T. D-xylose isomerase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain XY-214, and D-xylulose production from β -1,3-xylan // Mar. Biotechnol. 2012. V. 14. P. 10–20.
- Vortsepneva E., Chevaldonné P., Klyukina A., Naduvaeva E., Todt C., Zhadan A., Tzetlin A., Kublanov I. Microbial associations of shallow-water Mediterranean marine cave Sole-nogastres (Mollusca) // PeerJ. 2021. V. 9. P. e12655.
- Xing P., Hahnke R.L., Unfried F., Markert S., Huang S., Barbeyron T., Harder J., Becher D., Schweder T., Glöckner F.O., Amann R.I., Teeling H. Niches of two polysaccharide-degrading *Polaribacter* isolates from the North Sea during a spring diatom bloom // ISME J. 2015. V. 9. P. 1410–1422.
- Yoon H.S., Nelson W., Lindstrom S.C., Boo S.M., Poeschel C., Qiu H., Bhattacharya D. Rhodophyta // Handbook of the Protists / Eds. Archibald J.M., Simpson A.G.B., Slamovits C.H. Cham: Springer, 2017a. P. 89–133.
- Yoon K., Song J.Y., Kwak M.J., Kwon S.K., Kim J.F. Genome characteristics of the proteorhodopsin-containing marine flavobacterium *Polaribacter dokdonensis* DSW-5 // J. Microbiol. 2017b. V. 55. P. 561–567.
- Yu W.N., Du Z.Z., Chang Y.Q., Mu D.S., Du Z.J. *Marinomonas agarivorans* sp. nov., an agar-degrading marine bacterium isolated from red algae // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 100–104.

Microbial Communities Associated with the White Sea Red Algae as a Source of Xylanolytic Microorganisms

V. D. Salova¹*, A. M. Kholdina¹, A. D. Mel'nik¹, K. S. Zayulina², A. G. El'cheninov²,
A. A. Klyukina², and I. V. Kublanov^{1, 2}

¹Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

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

*e-mail: salovavd@gmail.com

Received December 27, 2022; revised January 19, 2023; accepted January 19, 2023

Abstract—Microorganisms associated with algae and able to utilize complex substrates (e.g., plant heteropolysaccharides) may be important producers of hydrolytic enzymes. The microbial communities of the red algae *Corallina* sp. and *Phyllophora* sp. sampled in the Kandalaksha Gulf basin of the White Sea were analyzed using high-throughput sequencing of the V4-variable region of the 16S rRNA gene. The dominant phyla in microbiomes of both samples were *Pseudomonadota* and *Bacteroidota* (GTDB classification, <https://gtdb.ecogenomic.org/>). For the *Corallina* sp. sample, dominance of the *Vibrio*, *Agarivorans*, and *Photobacterium* genera was shown, while *Granulosicoccus* and *Aliivibrio* dominated in the *Phyllophora* sp. sample. The analyzed red macroalgae with associated microbiota were used as an inocula to obtain microbial enrichment cultures growing on β -1,4-xylan or β -1,3-glucan (curdlan). It was shown that, similar to environmental samples *Pseudomonadota* and *Bacteroidota* phyla representatives were prevalent in all enrichment cultures. However, unlike the environmental samples, in the enrichment cultures the dominant genera were *Marinomonas*, *Reinekea*, *Polaribacter*, and *Pseudoalteromonas*. The latter, as well as the representatives of *Vibrio* sp., were isolated in pure cultures for which the xylanolytic activity was shown.

Keywords: White Sea, red algae, microbial diversity, high-throughput sequencing, 16S rRNA gene, xylanolytic microorganisms