

РАЗЛОЖЕНИЕ ХИТИНА МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ

© 2024 г. А. М. Дукаг^а, А. М. Кузнецова^{а, *}, С. Д. Клягин^а, В. О. Трушин^а, А. А. Клюкина^б,
А. Г. Ельченинов^б, И. В. Данилова^а

^аКафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени
М. В. Ломоносова, 119234, Москва, Россия

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

*e-mail: nycterix@mail.ru

Поступила в редакцию 26.07.2023 г.

После исправления 19.08.2023 г.

Принята к опубликованию 20.09.2023 г.

Хитин является одним из самых распространенных биополимеров на Земле и в больших количествах встречается в составе экзоскелета морских беспозвоночных. В связи с этим хитинолитические бактерии являются типичными представителями морских экосистем и играют немаловажную роль в процессе деградации хитина. Перспективным местом для поиска и выделения таких бактерий может служить акватория Кандалакшского залива Белого моря в районе Беломорской биологической станции (ББС) МГУ — места обитания многих видов беспозвоночных животных. В результате работы удалось определить прокариотический состав природных сообществ и накопительных культур, использующих хитин, выделить чистые культуры активных хитинолитиков, идентифицированных как *Pseudoalteromonas undina* и *Vibrio alginolyticus*. Оценен хитинолитический потенциал представителей, доминирующих в накопительных культурах родов, показывающий возможность нахождения среди них ранее неизвестных хитинолитиков.

Ключевые слова: хитинолитические бактерии, бактерии-гидролитики, хитин, Белое море, микробные сообщества

DOI: 10.31857/S0026365624010064

Природный полимер хитин — одно из самых часто встречающихся органических веществ в природе; он является вторым по распространенности полимером после целлюлозы. Хитин представляет собой линейный полимер аминсахара N-ацетил-D-глюкозамина, связанный β -(1–4) гликозидными связями. Этот полисахарид обладает структурой, сходной с целлюлозой, но вместо гидроксильной группы в C-2 положении содержит N-ацетильную группу. Хитин нерастворим в воде и играет структурную роль в экзоскелете беспозвоночных, поскольку обладает высокой степенью кристалличности благодаря водородным связям, образующимся между N-ацетильными группами в C-2 положении и гидроксильной группой в C-3 положении, а также N-ацетильной группой в C-6 положении, что удерживает хитиновые цепи плотно связанными (Muñoz et al., 2017). Помимо экзоскелета беспозвоночных, в природе хитин наиболее часто встречается в клеточных стенках грибов, а также в кутикуле членистоногих, что делает его неотъемлемой

частью круговорота питательных веществ в природе (Foster et al., 1961).

Хитин непрерывно попадает на дно океана вместе с панцирями ракообразных, однако морские отложения содержат лишь его следовые количества. Это связано с повсеместным распространением хитинолитических бактерий, которые являются типичными представителями морских экосистем и играют немаловажную роль в процессе деградации хитина, продуцируя внеклеточные ферменты хитиназы, расщепляющие β -(1–4) гликозидную связь (Zobell et al., 1938). По некоторым оценкам, весь хитин, образующийся в океанах, может быть полностью минерализован в поверхностных водах в течение 50 и 140 дней при 25 и 15°C соответственно, в течение 370 дней в толще воды при 5°C и в течение 500 дней на глубине при температуре, близкой к нулю (Humitake et al., 1965).

Деструкция хитина осуществляется посредством хитиназ — ферментов, катализирующих расщепление хитина и хитодекстринов (КФ 3.2.1.14). Однако различия в строении хитина в зависимости

от его источника (водные и наземные среды) могут приводить к адаптации систем хитинолитических ферментов. Микроорганизмы, выделенные из различных экологических ниш (почва, пресные, ультрапресные и соленые, и щелочные водоемы), обладают разным хитинолитическим потенциалом (Варламов и соавт., 2020).

Это первая работа, в которой сделана попытка выделения хитинолитических бактерий из Кандакшского залива Белого моря. Белое море характеризуется низкой температурой воды (от -0.5°C зимой до 15°C летом, в поверхностных водных горизонтах заливов), а также большим разнообразием обитающих в нем беспозвоночных животных с хитиновым экзоскелетом, что создает потенциальные условия для выделения психроактивных хитинолитических бактерий.

Целью данной работы было определить прокариотический состав природных сообществ и накопительных культур из проб воды акватории Кандакшского залива Белого моря, выделить чистые культуры активных хитинолитиков и оценить хитинолитический потенциал представителей доминирующих в накопительных культурах родов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор и обработка образцов. Образцы беспозвоночных животных, таллом водоросли и пробы воды были отобраны в августе 2021 г. Сбор образцов производили различными способами: вручную, с помощью черпака, батометра, мультикорера.

Получение накопительных и чистых культур. Отобранные природные объекты для посева перетирали в ступке до гомогенного состояния. Для культивирования хитинолитических бактерий использовали среды следующего состава:

(1) морская вода, профильтрованная через фильтр грубой очистки с добавлением 1% (по весу) хитина из панциря краба в виде мелких хлопьев (Chitin Extra Pure производства “Loba Chemie”, код товара 02695, молекулярная масса 400 кДа);

(2) синтетическая морская вода (г/л): NaCl — 18.9; $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ — 3.7; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 4.8; CaCl_2 — 0.8; KCl — 0.5; NaHCO_3 — 0.1; микроэлементы — 5 мл. Раствор микроэлементов имеет следующий состав (г/5 мл): $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0.148; ZnSO_4 — 0.011; MnSO_4 — 0.0014; $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ — 0.0148; $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ — 0.0064; $\text{NiCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0.0015; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ — 0.0016; H_3BO_3 — 0.00128; EDTA — 0.2;

(3) для получения твердых сред в жидкие основы такого же состава было добавлено 2% агара (Bacteriological Grade, “VWR International LLC”, США).

Среды стерилизовали с заранее внесенным хитином и разливали в чашки Петри. В жидкие среды хитин также вносили перед стерилизацией.

Посевы на твердые среды осуществляли помещением капли полученного гомогената или морской воды из образца на твердую среду (Т), затем каплю распределяли по поверхности среды методом истошающего штриха. Засеянные чашки Петри инкубировали при температуре 15, 20 и 30°C в течение 10 сут. Затем полученные колонии пересеивали на жидкую среду (Ж) для элиминации агаролитических бактерий и обогащения культуры хитинолитическими бактериями. Культивирование в жидких средах проходило в условиях свободного доступа воздуха, в пластиковых пробирках типа Falcon объемом 15 мл с 2 мл жидкой среды, с неплотно закрученной крышкой, также при температуре 15, 20 и 30°C в течение 7 сут.

Чистые культуры хитинолитических бактерий получали путем многократного повторения вышеуказанной процедуры. Проверку наличия роста в жидких средах и оценку разнообразия морфологии клеток осуществляли путем микроскопирования в световом микроскопе Микмед-1 (“ЛОМО”, Россия). После этого культуру снова пересеивали на твердую среду истошающим штрихом и инкубировали при температуре 15, 20 и 30°C в течение 14 сут. Признаком хитинолитической активности считали появление явной зоны гидролиза хитина вокруг колонии или штриха.

Выделение ДНК из природных образцов, накопительных и чистых культур проводили с помощью DNA Soil Kit (“Qiagen”). Для определения видового состава природных образцов и накопительных культур проводили NGS профилирование общей бактериальной ДНК по V4 региону 16S рРНК, секвенирование на базе платформы Illumina (Институт микробиологии им. С. Н. Виноградовского). 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 -20°C . Приготовление библиотек для секвенирования гипервариабельного участка V4 гена 16S рРНК на платформе Illumina проводили так же, как это описано у Vortsepneva et al. (2021). Высокопроизводительное секвенирование проводили на секвенаторе 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'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 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 с помощью секвенирования 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, подготавливали для дальнейшего анализа также, 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 родственников в базах данных NCBI с помощью BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Статистический анализ проводили с помощью ПО QIIME2 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). Анализ разнообразия между исследуемыми образцами (β -разнообразие) 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>).

Характеристика полученных штаммов хитинолитиков. Способность штаммов использовать иные, чем хитин, полимерные субстраты, проверяли на жидких средах, содержащих растворы полисахаридов (0.2% агар, 0.2% κ -каррагинан, 0.2% ι -каррагинан, 2% альгинат натрия; “Qingdao Bright Moon Seaweed Group Co.”, Китай, 2%). В качестве контроля использовали ту же среду без полисахаридов. Культивирование проводили в 15 мл пробирках с 2 мл среды и неплотно закрытой крышкой при температуре 25 и 30°C. Перед проведением тестов культуры хитинолитических бактерий выращивали на среде следующего состава: морская вода (до 1 л), глюкоза — 10 г/л, пептон — 5 г/л, дрожжевой экстракт — 1 г/л, 1.8% агара, в течение 4 сут. О росте бактерий на хитине судили по помутнению среды по сравнению с контрольной средой, лишенной хитина.

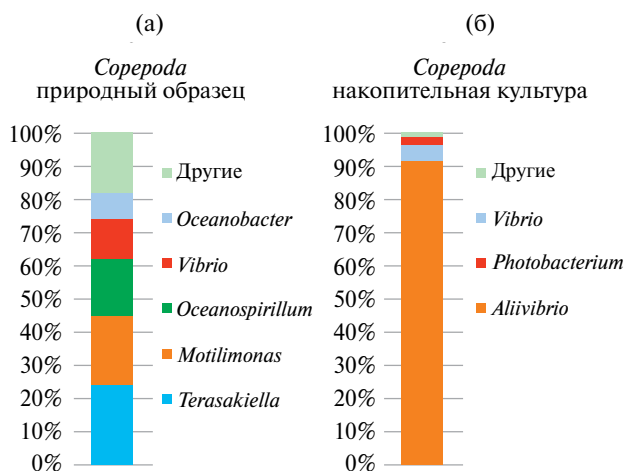


Рис. 1. Состав микробного сообщества, ассоциированного с *Copepoda* sp. CN (а) и полученной из него накопительной культуры СЕ, использующей хитин как единственный источник углерода и энергии (б).

Поиск генов хитиназ в геномах представителей родов, доминирующих в накопительных культурах.

Для осуществления поиска генов хитиназ были выбраны геномы всех описанных видов внутри родов *Cobetia* и *Endozoicomonas*, которые доступны в базе данных NCBI GenBank. Поиск ферментов, гидролизующих полисахариды, в *in silico* транслированных геномах проводился с помощью dbcan 3.0.6 (Zhang et al., 2023) с выбором метода hmmer, после чего были проанализированы белки из семейств, в которых присутствуют хитиназы и хитин-оксигеназы, согласно базе данных CAZy (<http://www.cazy.org>; Drula et al., 2022). Кроме того, в список целевых белков также входили ферменты, активные по отношению к пептидогликану (лизозимы и им подобные), поскольку для них была обнаружена хитинолитическая активность (Masselin et al., 2021). Оценка корректности предсказания целевых активностей для найденных белков был проведена с помощью поиска BLAST против базы данных SwissProt для определения ближайших охарактеризованных гомологов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение накопительных культур хитинолитических бактерий. Образцы беспозвоночных животных, водорослей и морской воды, отобранные на территории Беломорской биологической станции (ББС) МГУ в августе 2021 года (табл. 1), высевали на агаризованную среду с хитином и инкубировали при 15, 20 и 30°C.

После 10 сут инкубации на ряде засеянных чашек Петри появлялись колонии. О гидролизе хитина говорили прозрачные ореолы, окружающие колонии, в то время как основная масса среды оставалась мутной. В накопительных культурах

присутствовали бактерии разнообразной морфологии — кокки, палочки и вибрионы. Нами были получены три накопительные культуры (культура СЕ из образца *Copepoda*, культура ТЕ из образца *Terrebelides* и культура МЕ, полученная из образца морской воды), которые оказались способны к аэробному разложению хитина. Также были получены еще 9 накопительных культур из различных источников, которые росли на чашках Петри с той же средой, однако способности к гидролизу хитина не демонстрировали. Все накопительные культуры росли при 20 и 30°C в течение 7 сут. Дальнейшая работа с получением чистых культур проводилась при 30°C в связи с тем, что при этой температуре наблюдалась самая высокая скорость роста.

Анализ микробных сообществ природных образцов и полученных из них накопительных культур, растущих на хитине. Микробные сообщества, ассоциированные с природными образцами, и полученные из них накопительные культуры, использующие хитин, были исследованы с помощью NGS секвенирования ампликонов V4 переменных фрагментов генов 16S рРНК.

В природном образце CN представляющем собой гомогенат особи *Copepoda* sp. (рис. 1а)

доминировали бактерии рода *Terasakiella* (24%), *Motilimonas* (21%) и *Oceanospirillum* (17%). Также в сообществе присутствовали бактерии родов *Vibrio* (12%) и *Oceanobacter* (8%).

Накопительная культура СЕ, которую получили из этого образца путем культивирования на среде с использованием хитина в качестве единственного источника углерода и энергии, существенно отличалась от исходного образца по составу, так как 92% в ней составлял род *Alivibrio*, а 5% — *Photobacterium*. Представители рода *Vibrio*, достаточно многочисленные в образце, в накопительной культуре присутствовали лишь как минорный компонент (рис. 1б).

В природном образце TN, представляющем собой особь кольчатого червя *Terebellides* sp., было обнаружено широкое разнообразие родов различных микроорганизмов (рис. 2а). Больше всего было выявлено представителей рода *Pedococcus* (11%), *Pseudoxanthomonas* (6%), *Desulfovibrio* (6%). По 5% составляли бактерии, родственные некультивируемому представителю *Bacillota* BRH-c20a, а также бактерии родов *Tyzzerella* и *Robinsomiella*. Однако основная масса (54%) родов присутствовала

Таблица 1. Природные образцы, использованные для исследования присутствия и разнообразия хитинолитиков

Образец	Место сбора	Способ отбора	Используемые среды	Накопительная культура	Чистая культура	Анализ генов 16S рРНК
Кольчатый червь <i>Scoloplos</i> sp.	Литораль	Вручную	Т*, Ж**	+	–	Природный образец
Веслоногий рачок <i>Copepoda</i> sp.	Литораль	Вручную	Т, Ж	+	+	Природный образец, накопительная и чистая культуры
Панцирь ракообразного <i>Pandalidae</i> sp.	Литораль	Вручную	Т, Ж	+	–	–
Таллом водоросли <i>Laminaria</i> sp.	Литораль	Вручную	Т, Ж	+	–	Природный образец
Кольчатый червь <i>Phyllodoce maculata</i>	Дно моря	Черпак	Т	+	+	Чистая культура
Кольчатый червь <i>Polynidae</i> sp.	Дно моря	Черпак	Т	+	–	–
Кольчатый червь <i>Terebellides</i> sp.	Дно моря	Черпак	Т	+	–	Природный образец и накопительная культура
Брюхоногий моллюск <i>Bucinidae</i> sp.	Дно моря	Черпак	Т	+	–	Природный образец
<i>Arthropoda</i> sp.	Дно моря	Черпак	Т	+	–	–
Наил (270 м)	Море	Мульти-корер	Ж	+	–	–
Вода над наилом (270 м)	Море	Мульти-корер	Ж	+	–	–
Прибрежная морская вода	Море	Стеклопосуда	Т	+	+	Накопительная и чистая культуры

Примечание. *Т — агаризованная среда; **Ж — жидкая среда.

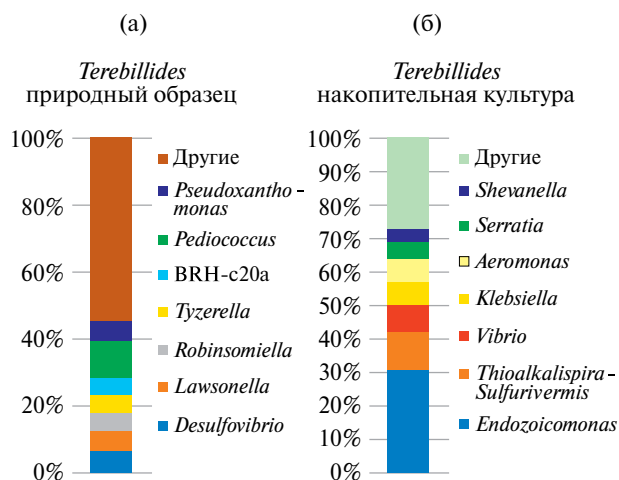


Рис. 2. Состав микробного сообщества, ассоциированного с *Terebellides* sp. TN (а), и полученной из него накопительной культуры ТЕ, использующей хитин как единственный источник углерода и энергии (б).

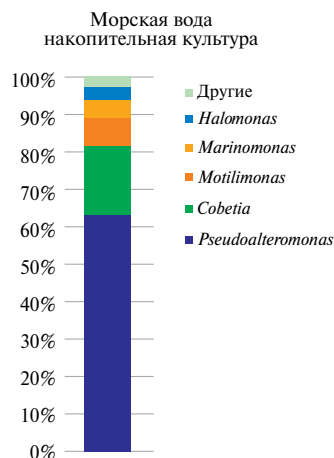


Рис. 3. Состав микробного сообщества накопительной культуры МЕ, полученной из образца воды Кандалакшского залива и использующей хитин как единственный источник углерода и энергии.

в относительно небольшом количестве, не превышающем 5%.

В накопительной культуре ТЕ, полученной из образца *Terebellides* и использующей хитин (рис. 2а), 31% составляли представители рода *Endozoicomonas* (Pike, 2013). Также в значительном количестве (11%) присутствовали представители рода *Thioalkalispira*. По 7% от общего количества прокариот составляли бактерии родов *Klebsiella* и *Aeromonas*, 5% — представители рода *Serratia* и 4% — *Shewanella*.

Накопительная культура МЕ, разлагающая хитин, была получена из морской воды (рис. 3). В ней доминировал род *Pseudoalteromonas* (63%); в значительном количестве были представлены бактерии рода *Cobetia* (18%). В меньших долях присутствовали бактерии родов *Marinomonas* (5%) и *Halomonas* (3%).

Выделение и характеристика чистых культур хитинолитических бактерий. Из полученных и охарактеризованных накопительных культур, разлагающих хитин, были получены три изолята, растущие аэробно на среде с хитином.

Клетки штамма М1, выделенные из накопительной культуры МЕ (инокулят — вода Кандалакшского залива), и Р1, выделенный из накопительной культуры РЕ (инокулят — гомогенат червя *Phyllodoce maculate*), представляли собой палочки. Путем секвенирования и анализа генов 16S рРНК изоляты М1 и Р1 были идентифицированы как штаммы *Pseudoalteromonas undina* с уровнем сходства с типовым штаммом 96.52 и 94.46% соответственно. При росте на твердой среде с хитином вокруг зоны роста образовывались свободные от хитина ореолы (рис. 4а). Штамм Р1 был проверен на способность к росту на других полисахаридах

и оказался способным расти за счет разложения ι- и κ-каррагинанов. Штамм Р1 может являться новым видом рода *Pseudoalteromonas*.

Штамм С1 был получен из накопительной культуры СЕ. Его клетки представляли собой подвижные вибрионы. Анализ гена 16S рРНК показал, что изолят С1 является штаммом *Vibrio alginolyticus* с 98.15% уровнем сходства с типовым штаммом этого вида. О способности к разложению хитина свидетельствовало появление зоны гидролиза вокруг колонии на агаризованной среде с хитином (рис. 4б). Также штамм С1 демонстрировал активный рост на всех исследованных полисахаридах (0.2% агар, 0.2% κ-каррагинан, 0.2% ι-каррагинан, 2% альгинат натрия).

Анализ опубликованных геномов обнаруженных морских организмов на присутствие хитиназ. Данные секвенирования трех полученных накопительных культур показали доминирование представителей родов *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Endozoicomonas* и *Cobetia*. Среди них для первых трех известны представители, способные к разложению хитина (Нуq,

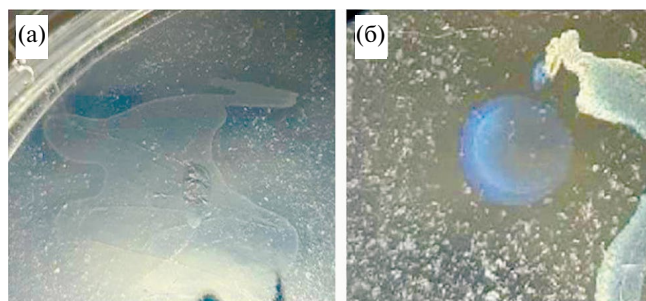


Рис. 4. Зоны гидролиза хитина на чашках Петри с чистыми культурами *Pseudoalteromonas undina* Р1 (а) и *Vibrio alginolyticus* С1 (б).

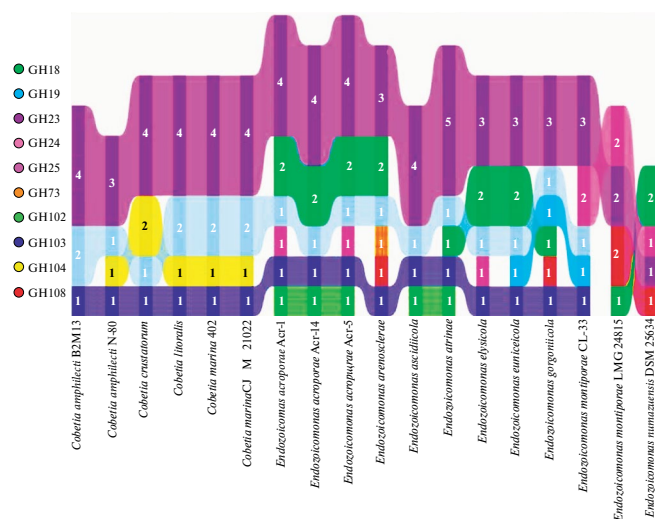


Рис. 5. Наборы предполагаемых хитиназ и пептидогликан-гидролизующих ферментов, закодированных в геномах представителей *Cobetia* и *Endozoicomonas*.

1984; Paulsen et al., 2016; Skåne et al., 2021; Wang, 2021), тогда как для двух последних такие данные отсутствовали. Анализ 18 геномов представителей этих родов (6 штаммов *Cobetia* и 12 штаммов *Endozoicomonas*), доступных в NCBI GenBank, показал наличие в каждом из них лизоцимов и/или хитиназ (рис. 5).

Гены, кодирующие ферменты семейств GH23 (в основном в него входят лизоцимы), GH73 (пептидогликан-гидролазы) и GH103 (пептидогликан-трансгликозилазы), были обнаружены почти во всех исследуемых геномах. В то же время ферменты из семейства GH104 (пептидогликан-гидролазы) были закодированы только в геномах представителей рода *Cobetia*, за исключением *C. amphilecti* B2M13. С другой стороны, гены белков семейств GH18 и GH19 (большинство охарактеризованных ферментов являются хитиназами), а также GH24, GH102 и GH108, были найдены только в геномах *Endozoicomonas*. Наборы данных генов различались как между разными видами, так и между разными штаммами одного вида. В геноме *E. arenosclerae* также был закодирован предполагаемый лизоцим из семейства GH25. Дополнительный поиск гомологов в SwissProt показал (см. Приложение), что для 16 отобранных генов ближайшим охарактеризованным гомологом являются хитиназы (у 12 генов семейства GH18) и хитодекстриназы (у 4 генов семейства GH18). Все эти гены были обнаружены в геномах представителей рода *Endozoicomonas*. Идентичность обнаруженных генов с их ближайшими охарактеризованными гомологами во всех случаях не превышала значения около 50%.

Таким образом, все проанализированные геномы содержали предположительные гены ферментов, активных по отношению к пептидогликану (лизоцимы и др.), а предположительные гены

хитиназ были выявлены исключительно в геномах представителей рода *Endozoicomonas*. Для 12 предполагаемых хитиназ, каждая из которых относится к семейству GH18, ближайшими охарактеризованными гомологами оказались ферменты с хитиноподобной активностью. Учитывая, что лизоцимы вполне могут содержаться у многих бактерий, и их наличие не свидетельствует о специализации к использованию хитина, можно предполагать, что среди представителей рода *Endozoicomonas* имеются использующие хитин представители, тогда как среди представителей рода *Cobetia* нахождение таковых менее вероятно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о микроорганизмах, ассоциированных с беспозвоночными животными, обитающими в Белом море, пока отсутствуют в открытой печати. Из исследованных беспозвоночных животных веслоногий рачок *Copepoda* sp. обитает в толще воды, в то время как кольчатый червь *Terebelides* sp. ведет донный образ жизни. Соответственно, ассоциированные с этими животными сообщества очень различались, в первую очередь разнообразием таксономических групп бактерий.

Микроорганизмы, доминирующие в микробном сообществе, ассоциированном с *Copepoda* sp., являются типичными органотрофными морскими бактериями, использующими различные субстраты. Так, бактерии рода *Terasakiella* обладают ферментами, деградирующими различные липиды и агар (Azizi et al., 2018). Единственный описанный представитель рода *Oceanobacter* — *Oceanobacter kriegii* способен к разложению н-алканов (Teramoto et al., 2009). Однако об их способности к разложению хитина не известно, так же как и для присутствовавших в сообществе бактерий родов *Motilimonas* и *Oceanospirillum* (Mouchka et al., 2010; Kelbrick, 2019). Единственным обнаруженным нами в сообществе *Copepoda* родом, для которого известна хитиноподобная активность, является род *Vibrio* (Нуг, 1984). Представители рода *Vibrio* — граммотрицательные бактерии, повсеместно встречающиеся в морской воде, как свободно плавающие в толще воды, так и связанные с различными субстратами. Колонизация вибрионами различных представителей подкласса *Copepoda* хорошо документирована во всем мире и представляет собой неотъемлемую часть водного образа жизни этих бактерий (Barbieri, 1999).

В накопительной культуре СЕ, инокулированной гомогенатом *Copepoda* sp., преобладали роды *Aliivibrio* и *Photobacterium*, для многих представителей которых известна способность к деградации хитина (Wang et al., 2019; Skåne et al., 2021). Можно предположить, что представители этих родов присутствовали в природном сообществе в качестве минорных компонентов, однако в присутствии

хитина, обладая более высокой скоростью роста на этом субстрате, вытеснили исходно более многочисленных хитинолитиков рода *Vibrio*.

В образце, ассоциированном с кольчатым червем *Terebellides* sp., присутствовали микроорганизмы, способные к анаэробному росту: представители родов *Pediococcus* (осуществляют гомоферментативное молочнокислое брожение; Ringø et al., 2018), *Pseudoxanthomonas* (денитрификация; Han et al., 2020), *Tyzzelerella* (пропионовокислое брожение; Isipato et al., 2020), *Desulfovibrio* (сульфатредукция; Lobo et al., 2012). Эти микроорганизмы могли быть симбионтами *Terebellides* sp. или попасть в его кишечник с частицами органического детрита, падающего из верхних слоев водной толщи, которыми эти кольчатые черви питаются (Nygren et al., 2018). Микроорганизмов, для которых известна способность к деградации хитина, среди компонентов микробиома *Terebellides* sp. не было выявлено.

В накопительной культуре ТЕ, инокулированной гомогенатом *Terebellides* sp., доминировали хемоорганотрофы рода *Endozoicomonas*, являющиеся типичными симбионтами беспозвоночных животных (Neave et al., 2016), и сероокисляющие хемолитотрофы рода *Thioalkalispira* (Sorokin et al., 2005). Оригинальные описания бактерий рода *Endozoicomonas* не содержат хитин в списке используемых субстратов, однако упоминается, например, что типовые штаммы всех пяти видов этого рода были способны использовать мономер хитина, N-ацетилглюкозамин (Pike et al., 2013). Анализ баз данных показал, что в геномах 5 видов *Endozoicomonas* содержатся хитиназы (табл. 2), что объясняет доминирующее положение этого организма в нашей накопительной культуре, разлагающей хитин. Также хитинолитическая активность известна у нескольких видов рода *Shewanella* (Zou et al., 2020) и рода *Serratia* (Zheng et al., 2021), которые присутствовали в накопительной культуре, но, по-видимому, не смогли составить конкуренцию *Endozoicomonas*.

Удивляет присутствие литоавтотрофных бактерий рода *Thioalkalispira* в органотрофном микробном сообществе, однако, учитывая присутствие в исходном образце сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio*, можно предположить, что в аэробной накопительной культуре шло окисление присутствовавшего в инокуляте сульфида.

Проведенный ранее анализ микробных сообществ воды Кандалакшского залива Белого моря показал, что в них доминируют представители родов *Pseudomonas* и *Serratia*, в меньшем количестве встречаются представители родов *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Rhodococcus*, *Shewanella* и др. (Pesciaroli et al., 2012). Все эти организмы являются аэробными органотрофами, способными

использовать широкий спектр субстратов, в том числе полимерных.

Состав накопительной культуры МЕ, полученной из воды Кандалакшского залива и разлагающей хитин, существенно отличался от опубликованного микробиома этой воды (Pesciaroli et al., 2012), хотя, конечно, сравнивать их следует с большой осторожностью из-за большой временной разницы и, возможно, различных точек отбора проб. В накопительной культуре доминировали бактерии рода *Pseudoalteromonas*, многие представители которого способны к разложению хитина (Paulsen et al., 2016; Wang, 2021).

Представители второго по представленности рода *Cobetia* способны разлагать альгинат, однако не способны к деградации хитина (Matsumoto et al., 2022). Анализ доступных в базах данных геномов бактерий рода *Cobetia* не выявил у этих микроорганизмов генов, кодирующих хитиназы. Известно, однако, что ряд видов рода *Cobetia* способен использовать мономер хитина N-ацетилглюкозамин, что объясняет их присутствие в сообществе, где идет активное разложение хитина.

Стоит заметить, что большинство полученных накопительных культур были способны расти на агаризованной среде, помещенной в чашки Петри, однако не образовывали зон гидролиза хитина. Предположительно эти культуры обладали способностью к гидролизу агара, входящего в состав твердой среды. Из этих накопительных культур штамм P1 (инокулят — гомогенат червя *Phyllodoce maculate*) при пересеве показал способность к гидролизу хитина и был определен как чистая культура *Pseudoalteromonas undina*.

Все три организма, выделенные в чистые культуры в рамках этой работы, оказались принадлежащими к видам, известным своей гидролитической активностью, — *Pseudoalteromonas undina* и *Vibrio alginolyticus*. Эти организмы способны расти с хитином как единственным источником углерода и энергии, вызывая его быстрый лизис.

Способность использования в качестве источника углерода и энергии двух и трех структурных полисахаридов одним и тем же штаммом встречается довольно редко (32.9 и 9.4% проанализированных штаммов, разлагающих полисахариды, соответственно) (Berlemont, Martiny, 2015). Однако среди хитинолитических бактерий такая способность встречается довольно часто — 74.8% из них способны разлагать растительные полисахариды (Berlemont, Martiny, 2015). У выделенных нами штаммов также была выявлена способность к разложению ряда полисахаридов, в том числе альгината и агара, что показывает их важную роль в деструкции биополимеров в воде и осадках Белого моря.

Таким образом, в результате проделанной работы удалось определить прокариотический состав природных сообществ акватории Кандалакшского

Таблица 2. Определение генов ферментов, относящихся к характерным семействам хитиназ и лизоцимов, в геномах представителей родов *Endozoicomonas* и *Cobetia*

Организм	Штамм	Ген	Семейство	Лучшее совпадение по SwissProt	Лучшее совпадение по организму	ID организма	Процент схожести	Значение e-value
<i>Cobetia amphilecti</i>	N-80	UBU48281.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	<i>Chromohalobacter salexigens</i> ATCC BAA-138	Q1QZB1	61.50	0
		UBU49624.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AGC3	33.40	1×10^{-91}
		UBU50213.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	35.60	1.5×10^{-68}
		UBU50211.1	GH23	Inner membrane ABC transporter permease protein YejB	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AFU0	61	3.4×10^{-159}
		UBU50212.1	GH23	Uncharacterized protein y4wM	<i>Sinorhizobium fredii</i> NBRC101917	P55691	42.30	1.3×10^{-153}
<i>Cobetia marina</i>	B2M13	MBU3007589.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	35.60	2.1×10^{-69}
		MBU3009409.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	37.60	1×10^{-8}
		MBU3009435.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	<i>Chromohalobacter salexigens</i> ATCC BAA-138	Q1QZB1	61.50	0
		MBU3009573.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AGC3	33.40	2.5×10^{-91}
		AOM00677.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	39.80	2.8×10^{-9}
	402	AOM02757.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	<i>Chromohalobacter salexigens</i> ATCC BAA-138	Q1QZB1	61.80	0
		AOM03018.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	34.50	3.6×10^{-67}
		AOM03116.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AGC3	34.40	8.1×10^{-91}
		NUJ54759.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AGC3	33.60	9.2×10^{-92}
		NUJ55292.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	33.60	1.1×10^{-8}
<i>Cobetia littoralis</i>		NUJ57207.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	35.40	8.4×10^{-68}
		NUJ55978.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	<i>Chromohalobacter salexigens</i> ATCC BAA-138	Q1QZB1	61.30	0
		UTV86359.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	37.60	1×10^{-8}
		UTV85999.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	<i>Chromohalobacter salexigens</i> ATCC BAA-138	Q1QZB1	61.50	0

Организм	Штамм	Ген	Семейство	Лучшее совпадение по SwissProt	Лучшее совпадение по организму	ID организма	Процент схожести	Значение e-value
		UTV88606.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AGC3	33.40	9.2×10^{-92}
		UTV88663.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	35.60	3×10^{-69}
<i>Cobetia crustatorum</i>		TVU68172.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	<i>Chromohalobacter salexigens</i> ATCC BAA-138	Q1QZB1	62.70	0
		TVU69129.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	38.70	4.5×10^{-9}
		TVU70045.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	35.4	3.1×10^{-66}
		TVU73674.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AGC3	33%	4.7×10^{-88}
<i>Endozoicomonas elysicola</i>	DSM 22380	KEI70287.1	GH18	Chitinase	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC700802	Q838S2	52.90	9.5×10^{-120}
		KEI71630.1	GH18	Chitodextrinase	<i>Vibrio furnissii</i>	P96156	50.70	0
		KEI71224.1	GH24	Pre-baseplate central spike protein Gp5	<i>Enterobacteria</i> phage T4 Bacteriophage T4	P16009	33.30	4.3×10^{-15}
		KEI71799.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	36.50	2×10^{-88}
		KEI72434.1	GH23	SPbeta prophage-derived uncharacterized transglycosylase YomI	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31976	41.90	6.8×10^{-10}
		KEI72476.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	A8GJ50	45.10	2.8×10^{-105}
<i>Endozoicomonas montiporae</i>	CL-33	AMO55644.1	GH24	Endolysin	<i>Enterobacteria</i> phage T4 Bacteriophage T4	P00720	31	7.2×10^{-14}
		AMO57116.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	36.60	8.8×10^{-10}
		AMO57141.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	A8GJ50	48.50	4.3×10^{-109}
		AMO58127.1	GH24	Endolysin	<i>Enterobacteria</i> phage T4 Bacteriophage T4	P00720	31	7.2×10^{-14}
	LMG 24815	KEQ11816.1	GH18	Chitinase 2	<i>Yersinia entomophaga</i>	B6A879	33.30	1.2×10^{-32}
		KEQ12840.1	GH24	Endolysin	<i>Enterobacteria</i> phage T4 Bacteriophage T4	P00720	31	7.2×10^{-14}
		KEQ13936.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	A8GJ50	48.50	4.3×10^{-109}
		KEQ14495.1	GH24	Endolysin	<i>Enterobacteria</i> phage T4 Bacteriophage T4	P00720	31	7.2×10^{-14}
		KEQ15222.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	36.60	6.2×10^{-10}

Организм	Штамм	Ген	Семейство	Лучшее совпадение по SwissProt	Лучшее совпадение по организму	ID организма	Процент схожести	Значение e-value
<i>Endozoicomonas nitazuiensis</i>		KEQ16499.1	GH18	Chitinase A	<i>Serratia marcescens</i>	P07254	46.90	2.8×10^{-161}
		KEQ16736.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Yersinia enterocolitica</i> serotype O:8 / biotype 1B NCTC13174	A1JPV7	47.00	6.3×10^{-108}
		KEQ17552.1	GH24	Endolysin	<i>Acyrthosiphon pisum</i> secondary endosymbiont phage 1 Bacteriophage APSE-1	Q9T1T5	39.60	5.4×10^{-23}
		KEQ18629.1	GH18	Chitodextrinase	<i>Vibrio furnissii</i>	P96156	50.70	0
<i>Endozoicomonas acroporae</i>	Acr-1	WP_163370893.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	37.60	5.3×10^{-93}
		WP_163372021.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	P39434	29.40	2.3×10^{-76}
		WP_163372437.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	39.20	2.5×10^{-36}
		WP_163372863.1	GH24	Endolysin	<i>Enterobacter</i> phage T4 Bacteriophage T4	P00720	32.30	7.4×10^{-20}
		WP_174783924.1	GH18	Chitinase	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC700802	Q838S2	54.00	2.9×10^{-118}
		WP_206679344.1	GH18	Chitinase A	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	P32823	43.00	0
		WP_241693397.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwlQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	40.40	1.3×10^{-10}
	Acr-5	WP_163370893.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	37.60	5.3×10^{-93}
		WP_163372021.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	P39434	29.40	2.3×10^{-76}
		WP_163372437.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	39.20	2.5×10^{-36}
		WP_206679344.1	GH18	Chitinase A	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	P32823	43.00	0
		WP_163372863.1	GH24	Endolysin	<i>Enterobacter</i> phage T4 Bacteriophage T4	P00720	32.30	7.4×10^{-20}
		WP_241693397.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwlQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	40.40	1.3×10^{-10}
	Acr-14	WP_101745797.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	37.60	5.3×10^{-93}
		WP_101748238.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	P39434	29.50	4.7×10^{-78}
		WP_180966374.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	39.20	2.5×10^{-36}
		WP_219622190.1	GH18	Chitinase A	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	P32823	43.20	0

Организм	Штамм	Ген	Семейство	Лучшее совпадение по SwissProt	Лучшее совпадение по организму	ID организма	Процент схожести	Значение e-value
<i>Endozoicomonas gorgonitcola</i>		WP_241693397.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	40.40	1.3×10^{-10}
	PS125	MCW7555334.1	GH18	Chitinase A	<i>Serratia marcescens</i>	P07254	25	1.8×10^{-17}
		MCW7552530.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	35.30	3×10^{-86}
		MCW7553530.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	38.70	5×10^{-11}
		MCW7553547.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	A8GJ50	48	8.1×10^{-109}
		MCW7553889.1	GH19+CBM73	Endochitinase 2	<i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	P52404	34.50	1.1×10^{-31}
<i>Endozoicomonas euniceicola</i>	EF212	UYM15095.1	GH18	Chitinase A1	<i>Niallia circulans</i> (<i>Bacillus circulans</i>)	P20533	27	4.6×10^{-16}
		UYM16391.1	GH18+CBM5	Chitinase A	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	P32823	29.40	6×10^{-67}
		UYM15277.1	GH19+CBM73	Chitinase 1	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> (Rice)	Q42993	34.60	1.4×10^{-29}
		UYM15813.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	37	4.8×10^{-85}
		UYM16823.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	38.70	5×10^{-10}
		UYM16841.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	A8GJ50	51	2.3×10^{-108}
<i>Endozoicomonas arenosclerae</i>	ab112	WP_172806666.1	AA1	Multicopper oxidase mco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Q69HT9	23.50	5.1×10^{-21}
		WP_079253672.1	AA10+CBM73	Chitin-binding protein CbpD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Q02I11	31	5.8×10^{-51}
		WP_172806729.1	AA10+CBM73	Chitin-binding protein CbpD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Q02I11	33.10	1.4×10^{-51}
		WP_062267898.1	GH18	Chitodextrinase	<i>Vibrio furnissii</i>	P96156	52	0
		WP_216638509.1	GH18	Chitinase A	<i>Serratia marcescens</i>	P07254	46.60	1.6×10^{-161}
		WP_062266646.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Photorhabdus laumondii</i> subsp. <i>laumondii</i> DSM 15139	Q7N712	46	2×10^{-104}
		WP_062269920.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	38.40	8.3×10^{-91}
		WP_245662904.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	41	2.2×10^{-10}

Организм	Штамм	Ген	Семейство	Лучшее совпадение по SwissProt	Лучшее совпадение по организму	ID организма	Процент схожести	Значение e-value
<i>Endozoicomonas ascidicola</i>	KASP37	WP_067514804.1	CBM2	Exoglucanase A	<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC484	P50401	25.90	2.3×10^{-20}
		WP_067514806.1	GH5_1	Endoglucanase D	<i>Cellulomonas fimi</i>	P50400	45	0
		WP_067584096.1	CBM2	Exoglucanase A	<i>Cellulomonas fimi</i> ATCC484	P50401	46.20	1.1×10^{-121}
		WP_067520255.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	40	3.5×10^{-33}
		WP_095210360.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	37.70	1.9×10^{-91}
		WP_172807593.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AGC3	30	1.9×10^{-74}
		WP_245673385.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	A8GJ50	50	7.7×10^{-106}
	WP70	WP_066016728.1	AA10	Spheroidin-like protein	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV)	P23058	32	6×10^{-33}
		WP_083232831.1	AA10+CBM73	Chitin-binding protein CbpD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	Q02111	31	6.8×10^{-47}
		WP_066016521.1	GH18	Chitodextrinase	<i>Vibrio furnissii</i>	P96156	50	0
<i>Endozoicomonas atrinae</i>		WP_274520497.1	GH18	Chitinase	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC700802	Q838S2	54	7.9×10^{-62}
		WP_066013931.1	GH23	Soluble lytic murein transglycosylase	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	P39434	29	1.2×10^{-76}
		WP_066015696.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	40	3.2×10^{-90}
		WP_083232699.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwlQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	40	2.5×10^{-10}
		WP_139117412.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase D	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AEZ7	36	1.3×10^{-31}
		WP_238593657.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C	<i>Photorhabdus laumondii</i> subsp. <i>laumondii</i> DSM 15139	Q7N712	46	5.9×10^{-106}

залива Белого моря, оценить родовой состав накопительных культур и сделать вывод об их хитиноподобной активности, а также выделить чистые культуры активных хитинолитиков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Варламов В. П., Ильина А. В., Шагдарова Б. Ц., Луньков А. П., Мысякина И. С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
- Varlamov V. P., Il'ina A. V., Shagdarova B. Ts., Lunkov A. P., Mysyakina I. S. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. Suppl. 1. P. S154–S176. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140084>
- Azizi A., Mohd Hanafi N., Basiran M. N., Teo C. H. Evaluation of disease resistance and tolerance to elevated temperature stress of the selected tissue-cultured *Kappaphycus alvarezii* Doty 1985 under optimized laboratory conditions // 3 Biotech. 2018. V. 8. P. 321. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1354-4>
- Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Matarrese P., Casiere A., Katouli M., Kühn I., Möllby R., Bruscolini F., Donelli G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 2748–2753.
- Berlemont R., Martiny A. C. Genomic potential for polysaccharide deconstruction in bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 1516–1517.
- Boliang G., Min J., Li L., Wu Q., Runying Z. Genome sequencing reveals the complex polysaccharide-degrading ability of novel deep-sea bacterium *Flammeovirga pacifica* WPAG1 // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 6–9.
- 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 QIIME2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.
- Chan K., Baumann L., Garza M., Baumann P. Two new species of *Alteromonas*: *Alteromonas espejiana* and *Alteromonas undina* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1978. V. 28. P. 217–222.
- Cho H. A. Isolation and characterization of alginate-degrading *Pseudoalteromonas* sp. Y-4: diss. — 부경대학교, 2011. P. 34–48.
- Drula E., Garron M. L., Dogan S., Lombard V., Henrissat B., Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature // Nucl. Acids Res. 2022. V. 50 (D1). P. D571–D577.
- Foster A. B., Webber J. M. Chitin // Adv. Carbohydr. Chem. 1961. V. 15. P. 371–393.
- 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. V. 10. Art. 1573. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01573>
- González J. M., Mayer F., Moran M. A., Hodson R. E., Whitman W. B. *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., two marine bacteria from a lignin-rich pulp mill waste enrichment community // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 369–376.
- Hackbusch S., Wichels A., Gimenez L., Döpke H., Gerdt G. Potentially human pathogenic *Vibrio* spp. in a coastal transect: occurrence and multiple virulence factors // Sci. Total Environ. 2020. V. 707. P. 113–136.
- Han F., Zhang M., Shang H., Liu Z., Zhou W. Microbial community succession, species interactions and metabolic pathways of sulfur-based autotrophic denitrification system in organic-limited nitrate wastewater // Bioresour. Technol. 2020. V. 315. Art. 123826. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123826>
- Huq A., West P. A., Smal E. B., Huq M. I., Colwell R. R. Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar 01 associated with live copepods in laboratory microcosms // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 48. P. 420–424.
- Imran M., Ghadi S. C. Role of carbohydrate active enzymes (CAZymes) in production of marine bioactive oligosaccharides and their pharmacological applications // Enzymatic technologies for marine polysaccharides / Ed. A. Trincone. Boca Raton: CRC Press, 2019. P. 357–374.
- Imran M., Poduval P. B., Ghadi S. C. Bacterial degradation of algal polysaccharides in marine ecosystem // Marine pollution and microbial remediation / Eds. M. Naik, S. Dubey. Singapore: Springer, 2017. P. 189–203.
- Isipato M., Dessi P., Sánchez C., Mills S., Ijaz U. Z., Asunis F., Spiga D., De Gioannis G., Mascia M., Collins G., Muntoni A., Lens P. N. L. Propionate production by bioelectrochemically-assisted lactate fermentation and simultaneous CO₂ recycling // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 599438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.599438>
- Ohishi K., Yamagishi M., Ohta T., Suzuki M., Izumida H., Sano H., Nishijima M., Miwa T. Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8 // J. Ferment. Bioengin. 1996. V. 82. P. 598–600.
- Kelbrick M., Abed R. M. M., Antunes A. *Motilimonas cestriensis* sp. nov., isolated from an inland brine spring in Northern England // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 71. Art. 004763. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004763>
- Liu G., Wu S., Jin W., Sun C. Amy63, a novel type of marine bacterial multifunctional enzyme possessing amylase, agarase and carrageenase activities // Sci. Rep. 2016. V. 6. Art. 18726. P. 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep18726>

- Lobo S. A., Warren M. J., Saraiva L. M. Sulfate-reducing bacteria reveal a new branch of tetrapyrrole metabolism // Adv. Microb. Physiol. 2012. V. 61. P. 267–295.
- Ma C., Lu X., Shi C., Li J., Gu Y., Ma Y., Chu Y., Han F., Gong Q., Yu W. Molecular cloning and characterization of a novel β -agarase, AgaB, from marine *Pseudoalteromonas* sp. CY24 // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 3747–3754.
- Malecki P. H., Raczyńska J. E., Vorgias C. E., Rypniewski W. Structure of a complete four-domain chitinase from *Moritella marina*, a marine psychrophilic bacterium // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. P. 821–829.
- Mancuso M., Costanzo M. T., Maricchiolo G., Gristina M., Zaccone R., Cuccu D., Genovese L. Characterization of chitinolytic bacteria and histological aspects of Shell Disease Syndrome in European spiny lobsters (*Palinurus elephas*) (Fabricius 1787) // J. Invertebr. Pathol. 2010. V. 104. P. 242–244.
- Masselin A., Rousseau A., Pradeau S., Fort L., Gueret R., Buon L., Armand S., Cottaz S., Choïnard L., Fort S. Optimizing chitin depolymerization by lysozyme to long-chain oligosaccharides // Mar. Drugs. 2021. V. 19. Art. 320. <https://doi.org/10.3390/md19060320>
- Matsumoto A., Kawai S. J., Yamada M. Utilization of various carbon sources for poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] production by *Cobetia* sp. IU180733JP01 (5–11–6–3) which is capable of producing P(3HB) from alginate and waste seaweed // J. Gen. Appl. Microbiol. 2022. V. 68. P. 207–211.
- Médigue C., Krin E., Pascal G., Barbe V., Bernsel A., Bertin P. N., Cheung F., Cruveiller S., D'Amico S., Duilio A., Fang G., Feller G., Ho C., Mangenot S., Marino G., Nilsson J., Parrilli E., Rocha E. P., Rouy Z., Sekowska A., Tutino M. L., Vallet D., von Heijne G., Danchin A. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 // Genome Res. 2005. V. 15. P. 1325–1335.
- Mouchka M. E., Hewson I., Harvell C. D. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts // Integr. Comp. Biol. 2010. V. 50. P. 662–674.
- Muñoz G., Zuluaga F. Biological activities and application of marine polysaccharides / Ed. E. A. Shalaby. InTech, 2017. 328 p. Ch. 5. P. 87–106. <https://doi.org/10.5772/66527>
- Neave M. J., Apprill A., Ferrier-Pagès C., Voolstra C. R. Diversity and function of prevalent symbiotic marine bacteria in the genus *Endozoicomonas* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 8315–8324.
- Nygren A., Parapar J., Pons J., Meißner K., Bakken T., Kongsrud J. A., Oug E., Gaeva D., Sikorski A., Johansen R. A., Hutchings P. A., Lavesque N., Capa M. A mega-cryptic species complex hidden among one of the most common annelids in the North East Atlantic // PLoS One. 2018. V. 13. e0198356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198356>
- Paulsen S. S., Andersen B., Gram L., Machado H. Biological potential of chitinolytic marine bacteria // Mar. Drugs. 2016. V. 14. Art. 230. <https://doi.org/10.3390/md14120230>
- Paulsen S. S., Strube M. L., Bech P. K., Gram L., Sonnenchein E. C. Marine chitinolytic *Pseudoalteromonas* represents an untapped reservoir of bioactive potential // mSystems. 2019. V. 4. e00060–19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00060-19>
- Pesciaroli C., Cupini F., Selbmann L., Barghini P., Fenice M. Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia // Polar Biol. 2012. V. 35. P. 435–445.
- Pike R. E., Haltli B., Kerr R. G. Description of *Endozoicomonas euniceicola* sp. nov. and *Endozoicomonas gorgoniicola* sp. nov., bacteria isolated from the octocorals *Eunicea fusca* and *Plexaura* sp., and an emended description of the genus *Endozoicomonas* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 4294–4302.
- Ringø E., Hoseinifar S. H., Ghosh K., Doan H. V., Beck B. R., Song S. K. Lactic acid bacteria in finfish—an update // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>
- Seki H. Microbiological studies on the decomposition of chitin in marine environment-IX // J. Oceanogr. Soc. Japan. 1965. V. 21. № 6. P. 253–260.
- Skåne A., Minniti G., Loose J. S. M., Mekasha S., Bissaro B., Mathiesen G., Arntzen M. Ø., Vaaje-Kolstad G. The fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* LFI1238 can degrade and metabolize chitin despite gene disruption in the chitinolytic pathway // Appl. Environ. Microbiol. 2021. V. 87. e0052921. <https://doi.org/10.1128/AEM.00529-21>
- 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.
- Sorokin D. Y., Kuenen J. G. Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 52. P. 287–295.
- Tarsi R., Pruzzo C. Role of surface proteins in *Vibrio cholerae* attachment to chitin // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 1348–1351.
- Teramoto M., Suzuki M., Okazaki F., Hatmanti A., Harayama S. *Oceanobacter*-related bacteria are important for the degradation of petroleum aliphatic hydrocarbons in the tropical marine environment // Microbiology (SGM). 2009. V. 155. P. 3362–3370.
- Tomco P. L., Duddleston K. N., Driskill A., Hatton J. J., Grond K., Wrenn T., Tarr M. A., Podgorski D. C., Zito P. Dissolved organic matter production from herder application and in-situ burning of crude oil at high latitudes: Bioavailable molecular composition patterns and microbial community diversity effects // J. Hazard Mater. 2022. V. 424. Pt. C. Art. 127598. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127598>
- Vortsepneva E., Chevaldonné P., Klyukina A., Naduvaeva E., Todt C., Zhadan A., Tzetlin A., Kublanov I. Microbial associations of shallow-water mediterranean marine cave *Solenogastres* (Mollusca) // PeerJ. 2021. V. 9. P. e12655. <https://doi.org/10.7717/peerj.12655>
- Wang X., Zhao Y., Tan H., Chi N., Zhang Q., Du Y., Yin H. Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6, a marine psychrophilic bacterium // Int. J. Biol. Macromol. 2014. V. 70. P. 455–462.
- Wang X., Isbrandt T., Strube M. L., Paulsen S. S., Nielsen M. W., Buijs Y., Schoof E. M., Larsen T. O., Gram L., Zhang S. D. Chitin degradation machinery and secondary metabolite profiles in the marine bacterium *Pseudoalteromonas rubra* S4059 // Mar. Drugs. 2021. V. 19. Art. 108. <https://doi.org/10.3390/md19020108>
- Wang X., Li Y., Xue C. X., Li B., Zhou S., Liu L., Zhang X. H. *Photobacterium chitinilyticum* sp. nov., a marine bacterium isolated from seawater at the bottom of the East China Sea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 1477–1483.

- Wenzel M. A., Douglas A., Piertney S. B. Microbiome composition within a sympatric species complex of intertidal isopods (*Jaera albifrons*) // PLoS One. 2018. V. 13. Art. 0202212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202212>
- Zheng J., Ge Q., Yan Y., Zhang X., Huang L., Yin Y. dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation // Nucl. Acids Res. 2023. V. 51. P. W115–W121. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad328>
- Zheng Q., Meng X., Cheng M., Li Y., Liu Y., Chen X. Cloning and characterization of a new chitosanase from a deep-sea bacterium *Serratia* sp. QD07 // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 619731. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.619731>
- Zobell C. E., Rittenberg S. C. The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea // J. Bacteriol. 1938. V. 35. P. 275–287.
- Zou Y., Robbins J., Heyndrickx M., Debode J., Raes K. quantification of extracellular proteases and chitinases from marine bacteria // Curr. Microbiol. 2020. V. 77. P. 3927–3936.

Chitin Degradation by Microbial Communities of the Kandalaksha Gulf, White Sea

A. M. Dukat¹, A. M. Kuznetsova^{1, *}, S. D. Klyagin¹, V. O. Trushin¹, A. A. Klyukona²,
A. G. El'cheninov², and I. V. Danilova¹

¹Department of Microbiology, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

²Winogradsky Institute of Microbiology, FRC Fundamentals of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: nycterix@mail.ru

Received July 26, 2023; revised August 19, 2023; accepted September 20, 2023

Abstract—Chitin is among the most widespread biopolymers on Earth and occurs in high quantities in the exoskeletons of marine invertebrates. Chitinolytic bacteria are therefore typical components of marine ecosystems and play an important part in chitin biodegradation. The Kandalaksha Gulf area near the White Sea Biological Station, Moscow State University, which is inhabited by numerous invertebrates, is a promising site for the isolation of such bacteria. The composition of environmental prokaryotic communities and of enrichment cultures grown on chitin was determined, and pure cultures of active chitinolytics were isolated and identified as *Pseudoalteromonas undina* and *Vibrio alginolyticus*. The chitinolytic potential of the genera predominant in enrichment cultures was assessed; these may include previously unknown chitinolytic microorganisms.

Keywords: chitinolytic bacteria, hydrolytic bacteria, chitin, White Sea, microbial communities