

ISSN 0026-3656

Том 93, Номер 1

Январь - Февраль 2024



МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 93, номер 1, 2024

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- У берегов исчезающего моря: микробные сообщества Арала и Южного Приаралья
*Н. А. Черных, А. Ю. Меркель, К. В. Кондрашева, Ж. Э. Алимов, А. А. Клюкина,
Е. А. Бонч-Осмоловская, А. И. Слободкин, К. Д. Давранов* 3
- Галактофурананы и галактоманнан клеточных стенок
как хемотаксономические характеристики рода и видов *Clavibacter*
Е. М. Тульская, Д. Ким, Н. В. Потехина, А. С. Шашков 17
- Выделение, идентификация и стратегия выживания галотолерантного штамма *Dietzia maris* MX2
из Якшинского месторождения минеральных солей
М. А. Харитонова, Ф. Г. Курпянова-Ашина, Т. Р. Шакиров, М. С. Вафина, О. Н. Ильинская 25
- Влияние нокаутов генов полифосфатазы *PPN1* и полифосфатсинтетазы *VTC4*
на особенности роста на этаноле и полифосфаты митохондрий у *Saccharomyces cerevisiae*
А. А. Томашевский, Т. В. Кулаковская 36
- Влияние углеводородного загрязнения на сообщества грибов литоральных грунтов
Белого и Баренцева морей
*А. Ю. Фадеев, Л. А. Гавирова, М. Л. Георгиева, В. В. Козловский,
У. В. Симакова, А. И. Шестаков, Е. Н. Бубнова* 43
- Разложение хитина микробными сообществами Кандалакшского залива Белого моря
*А. М. Дукат, А. М. Кузнецова, С. Д. Клягин, В. О. Трушин, А. А. Клюкина,
А. Г. Ельченинов, И. В. Данилова* 52
- Экологическое разнообразие микромицетов воздушной среды библиотек России
Т. Д. Великова, Е. А. Попихина, Е. С. Трепова, С. С. Хазова 67
- Характеристика бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из глинистых органогенных
отложений пещеры Мраморная (Приморский край)
Д. А. Русакова, М. Л. Сидоренко, А. В. Ким 79
- Иммобилизация бактерий рода *Azospirillum* на носителях различной природы
М. А. Курпяшина, Е. Г. Пономарева, Т. Е. Пылаев 91

CONTENTS

No. 1, 2024

EXPERIMENTAL ARTICLES

- At Shores of f Vanishing Sea: Microbial Communities of Aral and Southern Aral Sea Region
N. A. Chernyh, A. Yu. Merkel, K. V. Kondrasheva, Zh. E. Alimov, A. A. Klyukina, E. A. Bonch-Osmolovskaya, A. I. Slobodkin, and K. D. Davranov 3
- Galactofuranans and Galactomannan of Cell Walls as Chemotaxonomic Characteristics of the Genus and Species of *Clavibacter*
E. M. Tul'skaya, D. Kim, N. V. Potekhina, A. S. Shashkov, S. N. Senchenkova, L. V. Dorofeeva, and L. I. Evtushenko 17
- Isolation, Identification and Strategy for Survival of the Halotoleranting Strain *Dietzia maris* MX2 From The Yakshinskoe Mineral Salts Deposit
M. A. Kharitonova, F. G. Kupriyanova-Ashina, T. R. Shakirov, M. S. Vafina, and O. N. Ilinskaya 25
- The Influence of Knockouts of *PPNI* Polyphosphatase and *VTC4* Polyphosphate Synthetase Genes on Growth on Ethanol and Mitochondrial Polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae*
A. A. Tomashevski, and T. V. Kulakovskay 36
- Effect of Hydrocarbon Pollution on the Fungal Communities of the White and Barents Sea Littoral Sediments
A. Yu. Fadeev, L. A. Gavirova, M. L. Georgieva, V. V. Kozlovsky, U. V. Simakova, A. I. Shestakov, and E. N. Bubnova 43
- Chitin Degradation by Microbial Communities of the Kandalaksha Gulf, White Sea
A.M. Dukat, A. M. Kuznetsova, S. D. Klyagin, V. O. Trushin, A. A. Klyukona, A. G. El'cheninov, and I. V. Danilova 52
- Ecological Diversity of Micromycetes in Aerial Environments of Russian Libraries
T. D. Velikova, E. A. Popikhina, E. S. Trepova, and S. S. Khazova
- Characteristics of *Pseudomonas* Bacteria Isolated from Organogenic Clay Deposits of the Mramornaya Cave (Primorskii Krai)
D. A. Rusakova, M. L. Sidorenko, and A. V. Kim 79
- Immobilization of *Azospirillum* Bacteria on Various Carriers
M. A. Kupryasina, E. G. Ponomareva, and T. E. Pylaev 91
-
-

УДК 579.8.06:579.26

У БЕРЕГОВ ИСЧЕЗАЮЩЕГО МОРЯ: МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА АРАЛА И ЮЖНОГО ПРИАРАЛЬЯ

© 2024 г. Н. А. Черных^{a, *}, А. Ю. Меркель^a, К. В. Кондрашева^b, Ж. Э. Алимов^c,
А. А. Ключкина^a, Е. А. Бонч-Осмоловская^{a, d}, А. И. Слободкин^a, К. Д. Давранов^b

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

^bИнститут микробиологии АН РУз, Ташкент, 100128, Узбекистан

^cМеждународный сельскохозяйственный университет, Ташкент, 100140, Узбекистан

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

*e-mail: chernyh3@yandex.com

Поступила в редакцию 16.08.2023 г.

После доработки 31.08.2023 г.

Принята к публикации 08.09.2023 г.

С начала 60-х годов XX века в результате развития сельского хозяйства на орошаемых территориях Узбекистана площадь Аральского моря уменьшилась на 90%, а соленость воды выросла с 1 до 20%. Целью нашей работы было исследование разнообразия микробных сообществ воды и осадков Западного Аральского моря, а также прилегающих почв и водоемов с помощью высокопроизводительного секвенирования варибельного участка гена 16S рРНК. Было установлено, что в воде Аральского моря с минерализацией 22% доминируют галофильные некультивируемые археи семейства *Haloferacaceae* (22–43%), а также бактерии родов *Spiribacter* и *Psychroflexus*. В осадках Аральского моря доля архей была значительно ниже (2–17%), и среди них преобладали некультивируемые *Woesearchaeales*. Среди бактерий в осадках доминировали сульфатредукторы филума “*Desulfobacterota*”, а также представители родов *Fusibacter*, *Halanaerobium*, *Guyarkeria*, *Marinobacter*, *Idiomarina*, *Thiomicrospira*. В образцах почвы бывшего дна Аральского моря с минерализацией 8.2% присутствовали разнообразные археи филума *Halobacterota*, а также некультивируемые бактерии семейства *Nitrosococcaceae*. Однако в ризосфере растущего там же растения терескена Эверсманна (*Krascheninnikovia ewresmanniana*) археи составляли всего 4% и, в основном, представляли семейство *Nitrososphaeraceae*. 33% от всех прокариот в микробиоме ризосферы приходилось на некультивируемые представители филума *Actinomycetota*. Микробное сообщество ризосферы терескена оказалось сходным с микробными сообществами почвы плато Устюрт, расположенного в 3 км от берега Аральского моря. Протекающая по бывшему дну Аральского моря вода, изливающаяся из искусственно пробуренной скважины, также вызывает глубокие изменения в микробном сообществе: на фоне возрастания минерализации (0.5–2%) по руслу ручья развиваются цианобактериальные маты и сопутствующие им органотрофные бактерии. Наконец, наибольшее разнообразие прокариот было обнаружено в микробном сообществе осадка озера Судочье с минерализацией 1%, вероятно, являющимся современным аналогом микробиома Аральского моря до его обмеления.

Ключевые слова: Аральское море, секвенирование генов 16S рРНК, микробные сообщества, галофильные микроорганизмы

DOI: 10.31857/S0026365624010035

До середины XX века Аральское море являлось крупнейшим (четвертым по площади) озером мира, располагаясь на границе современных Казахстана и Узбекистана. Площадь Аральского моря в середине XX века составляла 66 тыс. км², объем воды равнялся 1070 км³, а минерализация воды составляла лишь 9.9‰. Однако развитие сельского хозяйства в 1960–е годы в Узбекистане и соответствующие ирригационные мероприятия, забирающие воду из рек, впадающих в Аральское море — Амударья и Сырдарья, привели к тому, что приток

воды в Аральское море сократился на 90%, площадь Аральского моря стала стремительно уменьшаться, а минерализация — возрастать. В настоящее время основная часть площади южной части Аральского моря, так называемого Большого Арала, представляет собой пустынный ландшафт (пустыня Аралкум); собственно море сократилось до узкого гиперсоленого водоема в юго-западной части (Западное Аральское море, рис. S1), минерализация в 2022 году выросла до 22%. Таким образом, современное Аральское море представляет собой

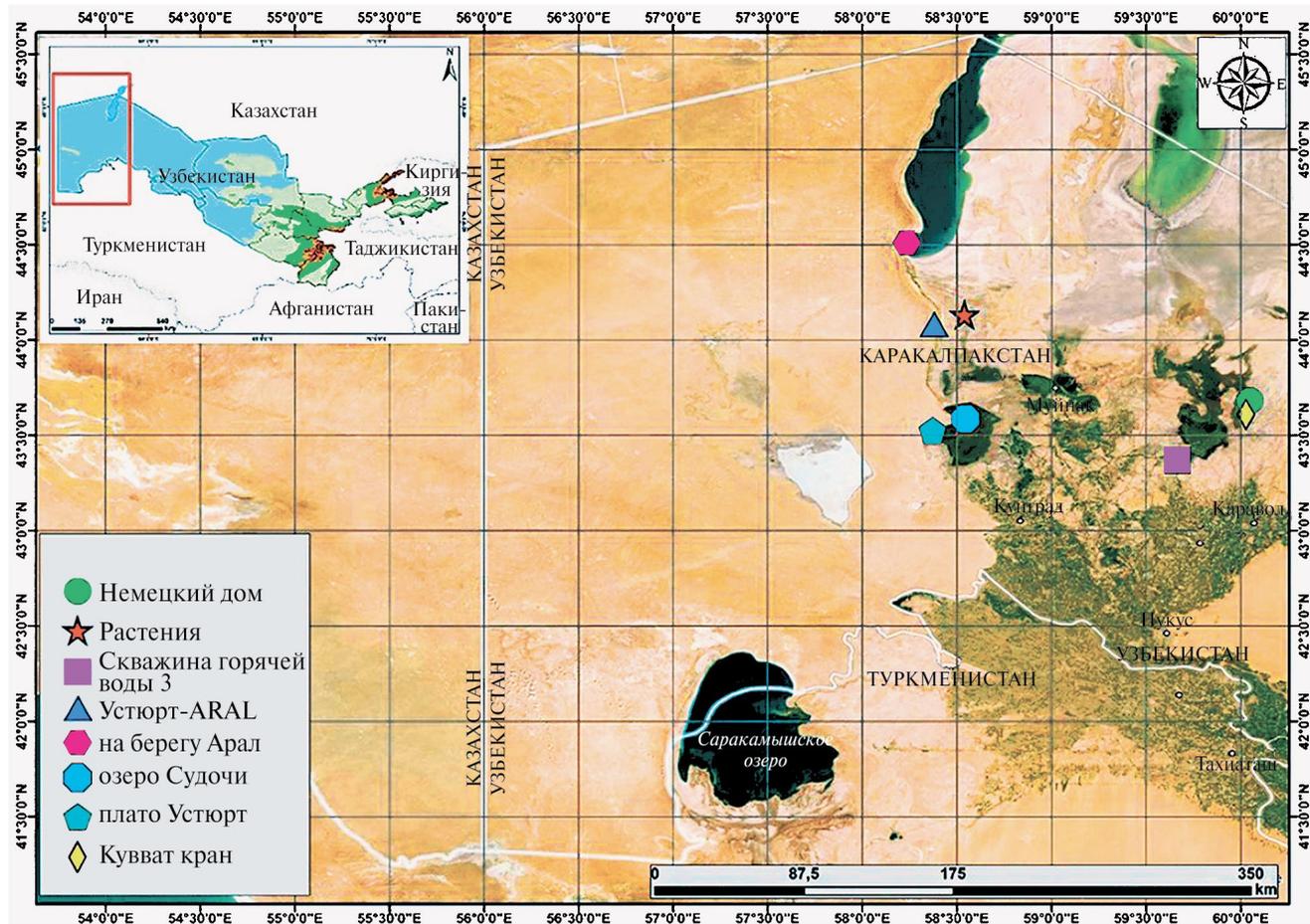


Рис. 1. Карта Аральского моря и места отбора образцов.

экстремальную экосистему. Однако, несмотря на ее уникальность и важнейшее значение для региона, сведения о микробных сообществах Аральского моря и окружающих его местообитаний очень ограничены. Имеется лишь одно сообщение об исследовании этих биотопов методами высокопроизводительного секвенирования, в котором основное внимание уделено микробиомам засоленной почвы (Jiang et al., 2021). Микроорганизмы воды Западного Арала изучались путем создания библиотек клонов генов 16S рРНК архей и бактерий, однако небольшой размер выборки и использование различных систем праймеров для архей и бактерий не позволили дать полноценную количественную характеристику сообществ (Shurygin et al., 2019). Анализ метагенома воды был проведен для Северного (Малого) Арала (Alexyuk et al., 2021), с минерализацией 0.8%, однако эти данные неприменимы к сегодняшнему Западнему Аралу, где минерализация гораздо выше. Микробные сообщества почвы, бывшей ранее дном Аральского моря, в том числе ассоциированные с растущими там растениями, исследовались лишь с помощью стандартных культуральных методов, позволивших идентифицировать представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus*

(Aripov et al., 2016; Stulina et al., 2019). Наконец, данные о разнообразии микроорганизмов в осадках современного Аральского моря и близлежащего озера Судочье отсутствуют.

Целью настоящей работы было исследование с помощью высокопроизводительного секвенирования варибельных участков генов 16S рРНК микробных сообществ воды и осадков Западного Аральского моря и близлежащего грунта, ранее являющегося дном Аральского моря, а также ассоциированных местообитаний: ризосферы произрастающего на бывшем дне Аральского моря растения и осадков ручья, образовавшегося на месте бывшего дна Аральского моря в результате разлива воды из искусственно пробуренной скважины и контрольных точек, не испытывающих влияния вод Аральского моря, а именно плато Устюрт и озеро Судочье.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов для исследования. Образцы воды, осадков и грунта были отобраны осенью 2022 г.

из Западного Арала, пустыни Аралкум, с плато Устюрт и из озера Судочье (рис. 1, таблица).

Параллельно отбирались образцы для исследования физико-химических характеристик и для выделения ДНК с целью последующего профилирования микробных сообществ по гену 16S рРНК. Образцы воды Аральского моря, обозначенные индексом AW (Aral Water), отбирались в 5 л бутылки на расстоянии 100 м от берега на глубине 1 м. В течение 4–6 ч после отбора эти образцы были отфильтрованы через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (“Трековая мембрана”, Дубна, Россия) для сбора микробной биомассы. Образцы осадков Аральского моря (AD, Aral Deposits) были отобраны в приливно-отливной зоне и в 10 м от берега; в последнем случае был отобран керн осадков с глубины около 1 м от поверхности воды. Глубина керна составила 40 см, и он был разделен на верхнюю (0–20 см) и нижнюю (20–40 см) части. Образец осадков озера Судочье (SD, Sudoch'e Deposit) был отобран с помощью металлического пробоотборника с 15 см глубины осадков.

В непосредственной близости от современного берега Аральского моря (50 м) был отобран образец грунта, ранее являвшегося дном Аральского моря и представляющего собой влажный песок (AS, Aral Soil), и аналогичный образец из ризосферы растения терескена Эверсманна — *Krascheninnikovia ewresmanniana* (RS, Rhizosphere Soil). В качестве контрольной группы были отобраны образцы почвы плато Устюрт (US, Ustyurt Soil). Все образцы грунта и почвы отбирались с глубины от 2 до 20 см (таблица).

Еще одним объектом исследования стали микробные сообщества, развивающиеся на изливе воды одной из скважин, пробуренных на глубину от 560 до 630 м в осушенном дне Арала. Образцы собственно воды из скважин (WW, Well Water) были отобраны в стерильные пятилитровые бутылки. В течение 4–6 ч после отбора эти образцы были отфильтрованы через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (“Трековая мембрана”, Дубна, Россия). Также были отобраны образцы цианобактериального мата (WM, Well Mat), развивающегося на изливе воды из скважины WW1 и осадков (WD, Well Deposits) ручья, образованного изливом воды из этой же скважины. Образцы мата и осадков отбирались стерильным шпателем.

Все образцы переносились в стерильные пластиковые пробирки типа Фалькон объемом 50 мл (“Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.”, Китай), где были зафиксированы в 20% этаноле в буфере (0.10 М Трис, 0.15 М ЭДТА; pH 7.6) для последующего выделения ДНК, и затем хранились при 4°C.

Определение физико-химических характеристик образцов. pH воды и водной вытяжки определяли на откалиброванном pH метре Mettler Toledo Five easy F20 (Китай). Концентрацию ионов кальция

и магния определяли методом комплексонометрического титрования водной вытяжки раствором 0.05N Трилона Б с использованием хрома кислотного темно-синего в качестве индикатора. Содержание хлорид-иона в водной вытяжке определяли argentометрически, с добавлением в испытуемый раствор для установления конечной точки титрования хромата калия, который с избытком серебра образует осадок, вызывающий переход окраски раствора от желтой до красно-бурой. Определение сульфата-иона проводили гравиметрическим методом путем осаждения сульфатов раствором $BaCl_2$ с последующим взвешиванием прокаленного осадка. Определение растворимых форм фтора проводили потенциометрически с использованием фторидных ионоселективных электродов.

Определение филогенетического состава исследуемых микробных сообществ. ДНК из отобранных образцов выделяли, используя коммерческий набор реактивов FastDNA Spin Kit (“MP Biomedicals”, США), в соответствии с инструкцией производителя. Библиотеки V4 гипервариабельного участка гена 16S рРНК были приготовлены с помощью ПЦР по ранее описанной методике (Fadrosh et al., 2014). При этом использовалась следующая система праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Hugerth et al., 2014) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3') (Merkel et al., 2019). Секвенирование производили на платформе MiSeq (“Illumina”, США), используя реагенты, позволяющие читать по 150 нуклеотидов с каждого конца ампликона. Предполагая достаточно низкую микробную биомассу в исследованных образцах, для обработки последовательностей микробиома был использован метод ASV (ASV — Amplicon Sequence Variant; Callahan et al., 2017; Caruso et al., 2019). Методы, основанные на ASV, позволяют элиминировать из последующего анализа последовательности, содержащие ошибки ПЦР или секвенирования, и, тем самым, позволяют достоверно отличать природные флотипы, различающиеся даже лишь одним нуклеотидом. Этот подход дает возможность более полно и детально описать имеющееся в образце разнообразие флотипов в сравнении с ОТЕ-анализом (Callahan et al., 2017). ASV-таблица была создана с помощью ПО Dada2 (Callahan et al., 2016) и базы данных SILVA 138 (Quast et al., 2013). Статистическая обработка данных, в том числе и подсчет индексов альфа-разнообразия, производили с помощью ПО Rhae (Lagkouvardos et al., 2017) по результатам ASV, что дает возможность учесть полное биологическое разнообразие анализируемых последовательностей. Последовательности фрагментов гена 16S рРНК были депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA980688.

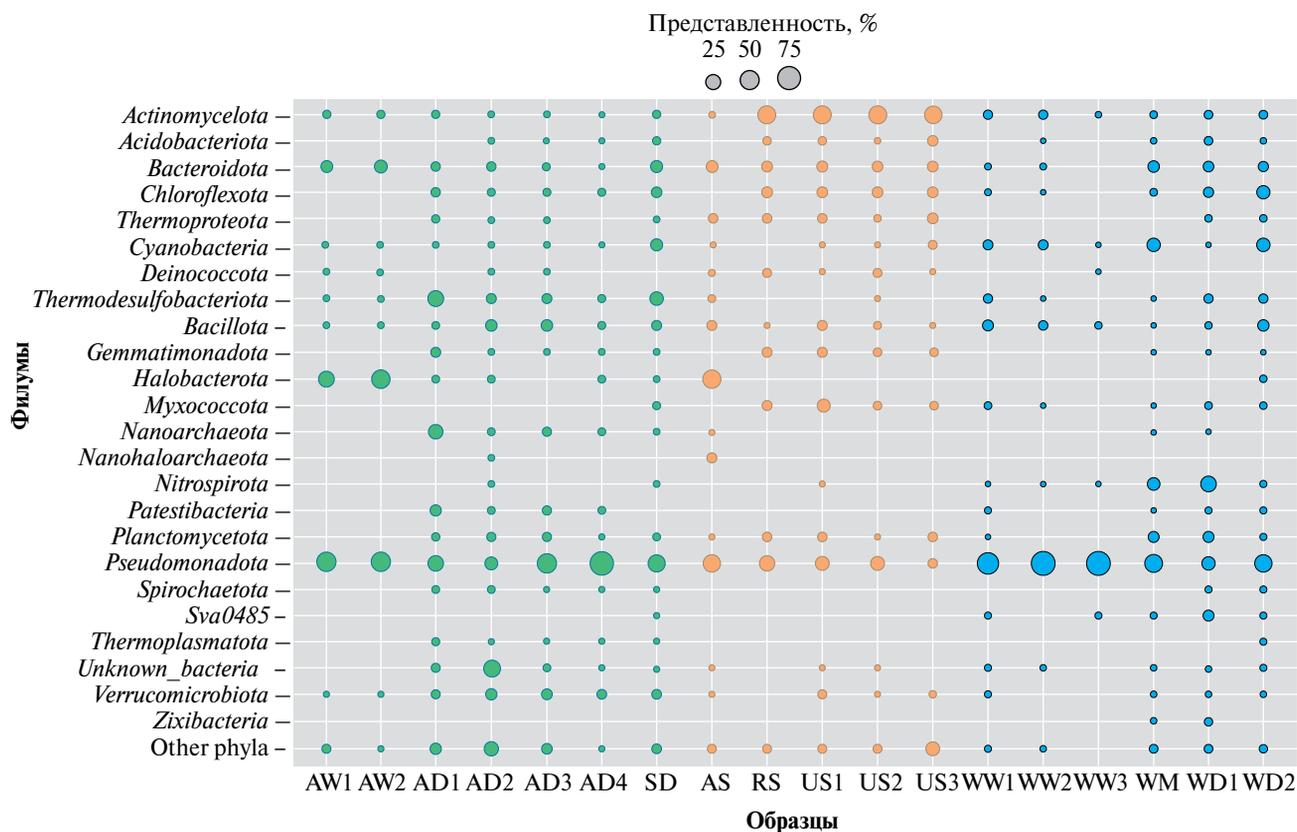


Рис. 2. Относительная представленность (%) филумов прокариот в исследованных образцах. Показаны только филумы с относительной представленностью >1%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика исследованных местообитаний

Исследованные нами местообитания можно подразделить на три группы:

(1) естественные водоемы: Западное Аральское море (вода, AW и осадки, AD) и озеро Судочье (осадки, SD);

(2) почвы: грунт дна бывшего Аральского моря (AS), ризофера выросшего там же растения (RS) и взятая в качестве контроля почва плато Устюрт (US);

(3) подземные воды и образуемые ими наземные ручьи: вода из скважин, пробуренных на месте бывшего дна Аральского моря (WW); микробный мат (WM) и осадки ручья (WD).

Основные характеристики отобранных образцов представлены в табл. 1.

Аральское море и озеро Судочье. Образцы воды Аральского моря (AW1 и AW2) отличаются высокой минерализацией, превышающей 200‰, одинаковой в обоих образцах, отобранных в 100 м от берега на расстоянии 100 м друг от друга. Вода Аральского моря также отличается высокой концентрацией сульфат-иона, превышающей 10 г/л.

Осадки Аральского моря были отобраны в 3-х точках, две из которых располагались в приливной зоне (AD1 и AD2), а третья находилась в 10 м от берега с глубиной воды 1 м. Грунт в приливной зоне, откуда отбирались образцы, был покрыт коркой, под которой содержался черный ил. Осадки, находящиеся на глубине 1 м, также представляли собой черный ил. Минерализацию осадков не определяли, однако по содержанию ионов Cl^- видно, что она лишь незначительно ниже минерализации воды. При этом содержание сульфатов в поверхностных пробах осадков было ниже, чем в воде, что говорит о том, что в них, вероятно, идут процессы трансформации соединений серы. Наиболее низкая концентрация сульфатов была в нижнем слое керна, что указывает на возможность протекания там процесса микробной сульфатредукции.

В осадках оз. Судочье (образец SD) общая минерализация составляла лишь 10‰, что соответствует данным о значительном опреснении озера за счет притока воды из канала, соединяющего его с Амударьей. Низкой минерализации соответствовало значительно более низкое, чем в Аральском море, содержание хлорид- и сульфат-ионов.

Засоленные грунты и почвы. Два образца были отобраны на берегу Аральского моря и представляли собой грунт, в прошлом являвшийся морским

Таблица 1. Характеристика образцов Западного Аральского моря и Южного Приаралья, использованных в работе

Обозначение	Координаты	Описание образца	Т, °С	pH	Минерализация, ‰	Содержание, мг/л				
						Cl ⁻	Ca ⁺²	Mg ⁺²	SO ₄ ⁻²	F
Образцы воды и осадков Западного Аральского моря и озера Судочье										
AW1	44°33'28"N 58°15'40"E	Вода Аральского моря, 10 м от берега	23	8.3	220.0	117764.1	–*	–	10266.8	–
AW2	44°33'32"N 58°15'45"E	Вода Аральского моря, 100 м от берега	23	8.3	220.0	117764.1	–	–	10266.8	–
AD1	44°33'40"N 58°15'43"E	Осадок Аральского моря, приливная зона	16	–	–	87673.1	–	–	16036.4	–
AD2	44°33'38"N 58°15'40"E	Осадок Аральского моря, приливная зона, черный ил	–	–	–	–	–	–	–	–
AD3	44°33'36"N 58°15'39"E	Осадок Аральского моря, верхняя часть керна	15	–	–	101293.4	–	–	29177.9	–
AD4	44°33'32"N 58°15'45"E	Осадок Аральского моря, нижняя часть керна	15	–	–	109487.3	–	–	8431.3	–
SD	43°36'20"N 58°30'24"E	Осадок озера Судочье	19	8.1	10.0	3652.0	0.0	0.0	4451.0	0.8
Образцы грунта и почвы у берега Западного Аральского моря и с плато Устюрт										
AS	44°33'38"N 58°15'35"E	Грунт бывшего дна Аральского моря, 50 м от кромки воды	–	8.8	82.0	3640.0	656.0	96.0	4608.0	–
RS	44°36'08.73"N 58°16'57.48"E	Почва ризоферы <i>Krascheninnikovia ewersmanniana</i> , выросшего на месте бывшего дна Аральского моря	–	8.4	6.3	105.0	–	–	398.0	–
US1	44°09'29.57"N 58°22'31.31"E	Почва со дна высохшей протоки, плато Устюрт	–	8.4	4.0	25.0	140.0	12.0	424.0	–
US2	44°09'28.83"N 58°22'31.83"E	Почва со склона, плато Устюрт N44°33'28"	–	7.9	13.0	788.0	202.0	52.0	650.0	–
US3	44°14'55.32"N 58°12'01.83"E	Почва с плато Южный Устюрт	–	8.8	–	–	–	–	398.0	–
Образцы воды из скважин и осадков по изливу ручья, вытекающего из скважины № 1										
WW1	43°40'52.8"N 60°02'55.1"E	Вода из скважины № 1, глубина 580 м Немецкий дом	41	7.0	2.1	–	1.2	0.0	–	–
WW2	43°36'33.5"N 60°01'46.4"E	Вода из скважины № 2, глубина 560 м Кувват кран	55	7.6	2.2	–	2.2	–	–	–
WW3	43°21'59.2"N 59°39'57.4"E	Вода из скважины скважина горячей воды № 3, глубина 0 м	47	8.3	2.5	734.0	3.7	–	744.0	–
WM	43°40'52.8"N 60°02'55.1"E	Образец мата, развивающегося на изливе скважины № 1	21	8.0	5.0	598.1	–	0.0	0	1.1
WD1	43°40'52.4"N 60°02'55.1"E	Осадок под матом на изливе скважины № 1, рыже-черный	19	8.8	6.0	610.0	–	0.0	681.0	1.0
WD2	43°40'52.1"N 60°02'55.1"E	Черный осадок в 50 м ниже по течению ручья из скважины № 1	18	8.8	20.0	161.0	–	–	1900.0	–

* Нет данных.

дном. Образец AS, состоящий из влажного песка, был отобран в 50 м от современного уреза воды Аральского моря. Минерализация этого образца была значительно ниже по сравнению с водой Аральского моря, однако существенно выше, чем в осадках оз. Судочье, при одинаковом содержании хлорид- и сульфат-ионов. В отличие от оз. Судочье, в грунте бывшего дна Аральского моря

было отмечено высокое содержание ионов кальция и магния. Образец RS представлял собой почву из ризосферы растения терескена Эверсмана — *Krascheninnikovia ewresmanniana*, растения, принадлежащего к группе ксерогалофилов, известных своей устойчивостью к засухе и сульфатному засолению. Из таблицы видно, что почва ризосферы *K. ewresmanniana* при достаточно высоких

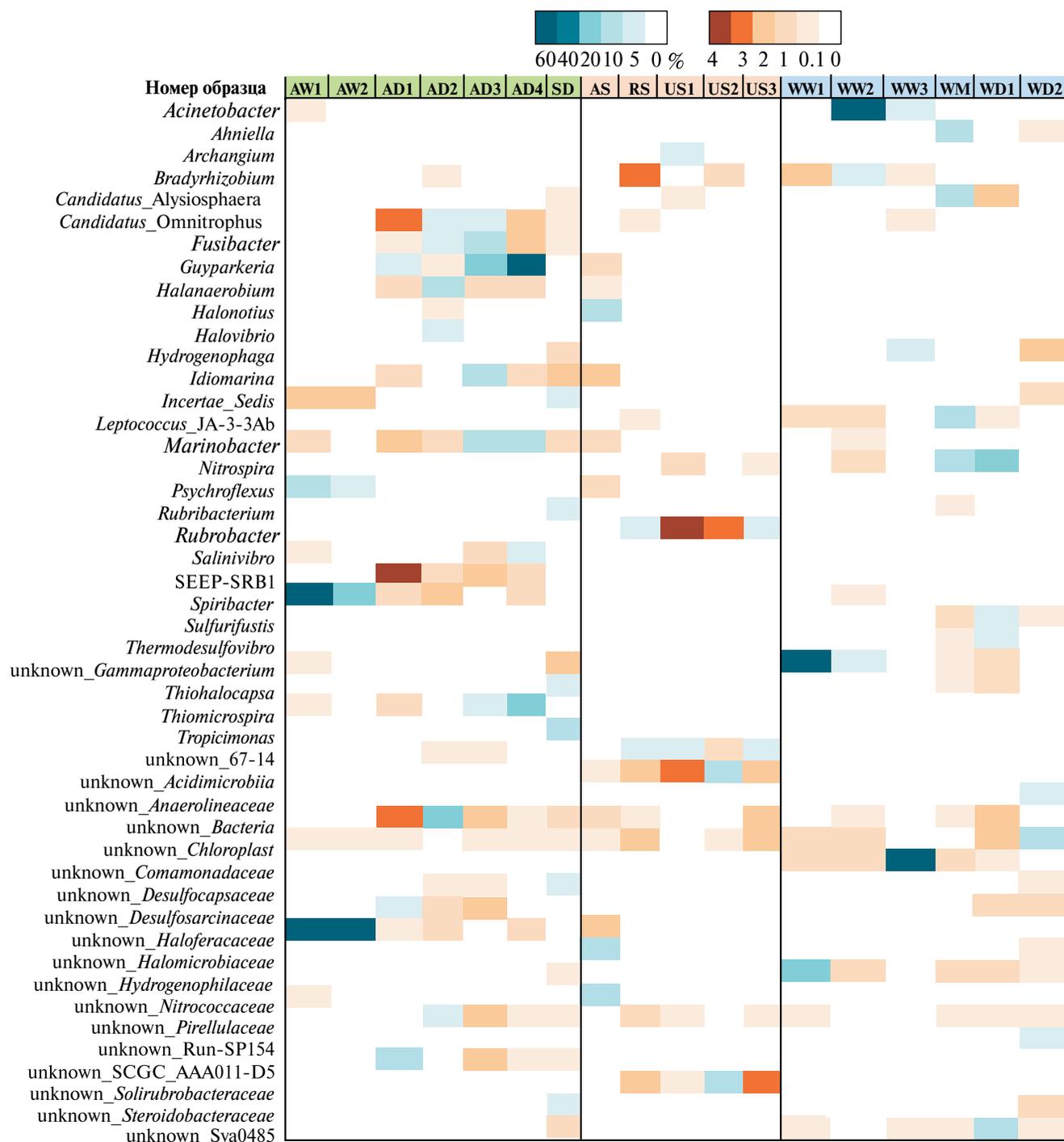


Рис. 3. Тепловая карта, отражающая численность представителей некоторых родов, составляющих более 5% всего сообщества (синий цвет). Коричневым цветом показаны те же представители в количестве менее 5%.

значениях pH отличается от образца AS значительно более низкой минерализацией и содержанием хлоридов и сульфатов.

Образцы почвы плато Устюрт (US1, US2, US3) были отобраны в качестве контроля. Они отличались высокими значениями pH; минерализация и содержание хлоридов и сульфатов примерно соответствовали параметрам, наблюдавшимся в образце ризосферы терескена (RS).

Подземные воды и ручей. Из трех скважин были отобраны образцы изливающейся воды — WW1, WW2 и WW3. Вода поступала с глубины от 560 до 630 м, изливаясь в виде ручьев, протекающих по засоленной почве, аналогичной образцу AS. Были отобраны образцы осадков ручья, вытекающего из скважины WW1 (образцы WD1 и WD2) и микробного мата, развившегося по току этого ручья (образец WM). Исходно температура изливающейся воды достигала значений 41–55°C, причем она не коррелировала с глубиной скважин. Далее по току исследуемого ручья температура постепенно снижалась. Минерализация, наоборот, была минимальной на изливе воды (2.1–2.5 г/л), но повышалась по току ручья, протекающего по засоленной почве, достигая 20 г/л в образце WD2, отобранном в 50 м ниже излива.

Филогенетическое разнообразие микробных сообществ Западного Аральского моря и Южного Приаралья

Общая характеристика. В настоящей работе было проанализировано 18 образцов воды, осадков и грунта из местообитаний, ассоциированных с Аральским морем: морской воды и осадков, осадков обособившегося от Аральского моря оз. Судочье, бывшего дна Аральского моря, пробуренных в нем скважин и вытекающего из одной из них ручья, а также контрольные образцы почвы с плато Устюрт, не подвергавшиеся влиянию Аральского моря и процесса его обмеления.

Исследованные сообщества очень сильно различались между собой даже на уровне филумов (рис. 2).

Наименьшим разнообразием отличались сообщества воды Аральского моря (AW1, AW2), причем отличительной их чертой была значительная представленность галофильного архейного филума *Halobacterota*. В осадках Аральского моря (AD1–4) число присутствующих филумов значительно возросло; наибольшим разнообразием отличались осадки оз. Судочье (SD).

Из исследованных сообществ почвы резко выделяется сообщество грунта, ранее являвшегося дном Аральского моря (AS). Как и в воде, там доминируют представители *Halobacterota*; общее разнообразие филумов незначительно превышает разнообразие в образцах воды. Остальные образцы

почвы, включая ризосферу терескена, выросшего на бывшем дне Аральского моря, были близки между собой и характеризовались важным признаком почвенных сообществ — присутствием значительного количества представителей *Actinomycetota*.

Исходно низкое разнообразие филумов в образцах подземной воды (WW1–3) сменяется значительным их разнообразием в образцах мата и грунтов по течению ручья, вытекающего из скважины № 1 (WW1), подложкой которому служит бывшее дно Аральского моря (WM, WD1 и WD2). Сообщества осадков по составу филумов не напоминают ни воду скважин, ни грунт бывшего Аральского моря, а оказываются наиболее близкими осадкам оз. Судочье. Здесь хорошо представлены *Cyanobacteriota* (образцы MW и WD2); также особенностью сообществ ручья является присутствие значительного количества представителей филума *Nitrospirota*.

Во всех без исключения образцах доминируют представители филума *Pseudomonadota*, однако, учитывая высокое филогенетическое и метаболическое разнообразие внутри этого филума, его высокая представленность не поддается интерпретации.

Разнообразие и количественная характеристика исследованных микробных сообществ на уровне наиболее представленных родов иллюстрируется тепловой картой (рис. 3).

В целом родовое разнообразие подтверждает выводы, сделанные на уровне филумов, однако дает более конкретную информацию о присутствующих в сообществе группах микроорганизмов.

Вода и осадки Аральского моря и оз. Судочье. Образцы воды Аральского моря (AW1 и AW2; рис. 3 и рис. S2), оказались качественно схожими и различались лишь в относительных долях доминирующих групп. Галобактерии оказались представлены членами семейства *Haloferacaceae* (24 и 43% соответственно), включающими три ASV филотипа, до сих пор не полученные в лабораторной культуре. Среди бактерий доминировали бактерии рода *Spiribacter* (семейство *Nitrosococcaceae*) (43 и 36% от общего числа прокариот), представленные во всех образцах тремя ASV филотипами. Также в обоих образцах с долей 6 и 9% присутствовал один ASV филотип бактерии рода *Psychroflexus* (*Bacteroidota*, порядок *Flavobacteriales*). В небольших долях (3% и ниже) присутствовали и другие бактерии, представляющие культивируемые и некультивируемые таксоны, в частности, семейств *Rhodobacteraceae* (9 ASV филотипов) и *Balneolaceae* (4 филотипа).

Образцы осадков более существенно различались по составу на родовом уровне (рис. 3 и рис. S2). В образце, отобранном в приливной зоне и покрытом сверху минеральной коркой (AD1), доминировали разнообразные бактерии (77% от общего числа прокариот), среди которых следует отметить

представителей рода *Guyparkeria* (8%, один ASV фило-тип) и сульфатредуцирующих бактерий филума “*Desulfobacterota*” (29%). Среди них наиболее многочисленными были некультивируемые группы — *Desulfosarcinaceae* (9%), состоящие из 17 фило-типов, и три фило-типа группы SEEP-SR81 (6%). Архей было только 17%, и среди них преобладали некуль-тивируемые *Woesearchaeales* — SCGC AAAB11-D5, всего 33 ASV фило-типа.

В другом образце осадков из приливной зоны (AD2), доминировали представители двух ASV фи-лотипов рода *Fusibacter* (39%) и 12 ASV фило-типов *Halanaerobium* (11%), а также девять ASV фило-типов “*Candidatus Omnitrophus*” (6%). Археи состав-ляли только 2%, но были достаточно разнообраз-ны и представлены 23 ASV фило-типами; среди них можно отметить 12 ASV фило-типов *Halobacterales* и 5 фило-типов некультивируемых предст-авителей порядка *Woesearchaeales* — группа SCGC AAAB11-D5.

В образцах осадков, взятых в 10 м от берега, также доминировали бактерии: в верхнем слое (AD3) присутствовали два ASV фило-типа бак-терий рода *Guyparkeria* (21%), пять фило-типов *Marinobacter* (12%), три фило-типа *Idiomarina* (9%), один фило-тип *Thiomicrospira* (5%) и два фило-типа *Fusibacter* (7%), а также 17 фило-типов “*Candidatus Omnitrophus*” (5%). В нижнем слое осадков (AD4) состав бактерий был примерно таким же, но зна-чительно возрастали доли *Guyparkeria* (34%), пред-ставленного одним фило-типом, и *Thiomicrospira* (28%, 1 фило-тип); доля рода *Marinobacter* (11%), состоящего из четырех фило-типов, снижалась не-значительно, *Idiomarina* (3 фило-типа) и *Fusibacter* (2 фило-типа) исчезли совсем, в то время как по-явился новый член сообщества — *Salinivibrio* (7%, 1 фило-тип).

Осадки оз. Судочье (SD) существенно отлича-лись от осадков Аральского моря, в первую оче-редь присутствием цианобактерий, причем помимо *Synechococcus* (1 фило-тип) и *Cyanobium* (4 фило-типа), значительную часть всех *Cyanobacteriota* (23%) составляли семь разных видов (фило-типов) хлоро-пластов (рис. 3 и рис. S2). Класс *Alphaproteobacteria* (12% от всех прокариот, 36 фило-типов) был представлен разнообразными родами, среди ко-торых доминировали *Tropicomonas* (1 фило-тип), *Rubribacterium* (2 фило-типа) и *Porphirobacter* (2 фи-лотипа). Среди *Gammaproteobacteria* (33 фило-типа) выделялись микроорганизмы цикла серы: *Thiobacillus* (1 фило-тип) и семейство *Chromatiaceae* (10 фило-типов), в том числе *Thiocapsa* (2 фило-типа), *Thiohalocapsa* (1 фило-тип) и некультиви-руемые роды. Филум “*Desulfobacterota*”, включав-ший 28 фило-типов, в образце SD был представлен разнообразными сульфатредуцирующими бак-териями: родом *Desulfatiglans* (7 фило-типов) и се-мейством *Desulfosarcinaceae*, в котором наиболее

значительную долю (21%) занимала некультиви-руемая группа SVA 0081 (2 фило-типа). Также до-статочно многочисленными были представите-ли семейства *Desulfocapsaceae* (3% от всех прока-риот, 6 фило-типов). Интересно, что 12% от всех “*Desulfobacterota*” приходилось на бактерии *incertae cedis* — микроорганизмы неопределенного таксо-номического положения, по всей видимости, пред-ставляющие глубокие филогенетические линии. Филум *Planctomycetota* включал 19 фило-типов (4% от всех прокариот) и был в равной доле предст-авлен классами *Planctomycetia* (38%, 9 фило-типов) и *Phycisphaerae* (37%, 8 фило-типов); оставшиеся 25% составляли некультивируемые планктоми-цеты (4 глубоких линий уровня класса). Филум *Verrucomicrobiota* (12 фило-типов), также был пред-ставлен в основном некультивируемыми организ-мами, в том числе “*Candidatus Omnitrophus*” (1 фи-лотип) и пятью фило-типами класса *Kiritimatiellae* (1% от общего числа прокариот). Археи оз. Су-дочье составляли 1.6% от всего сообщества про-кариот и были представлены тремя ASV фило-ти-пами *Woesearchaeales* (62%), двумя фило-типами *Thermoplasmata* (18%), причем основным компо-нентом *Thermoplasmata* были представители Marine Benthic Group D и DHVEG-1, и одним фило-типом *Bathyarchaeia* (12%). *Halobacterota* (1 фило-тип) со-ставили 5% от всех архей и были представлены ро-дом *Haladaptatus* (1 фило-тип).

Грунты и почвы. В образце бывшего дна Араль-ского моря (AS) археи были в основном (95%) пред-ставлены разнообразнейшими *Halobacterota* (12%, 65 фило-типов), среди которых наиболее массовыми были представители семейства *Haloferacaceae*: роды *Halonotius* (10% от всех прокариот, 5 фило-типов) и *Halorubrum* (5%, 3 фило-типа), оба относящиеся к семейству (рис. 3 и рис. S3). Также значительная доля микробиома приходилась на 6 фило-типов не-культивируемых архей семейства *Halomicrobiaceae* (всего 24 фило-типа; 4% от всех прокариот). 1.9% всего сообщества приходилось на пять фило-типов *Nanosalinaceae*, которые характеризуются нано-размерными клетками и, возможно, симбиотиче-ским образом жизни (Zhao et al., 2022). Бактерии были очень разнообразны: наиболее массовой фор-мой (15% от всех прокариот, три ASV фило-типа) были некультивируемые представители семейства *Nitrococcaceae* (класс *Gammaproteobacteria*); по 3% приходилось на роды из 5 фило-типов *Halomonas*, 1 фило-тип *Aquisalimonas*, *Aliidiomarina* (4.8%, 1 фи-лотип), также относящиеся к этому классу.

В образце почвы, являвшемся ризосферой те-рескена (*K. ewresmanniana*), профиль сообщества абсолютно изменялся. Археи составляли все-го 4%, и на 99% были представлены семейством *Nitrososphaeraceae* (9 фило-типов) (рис. 3 и рис. S3). Остальные 96% были представлены бакте-риями, причем *Pseudomonadota* составляли только 24% от общего числа прокариот, среди которых

доминировали не *Gamma*-, а *Alfaproteobacteria*. Единственным родом в этой группе, доля которого достигала 4% от общего числа прокариот, был род *Skermanella* (сем. *Azospirillaceae*). 8% от всех прокариот приходилось на филум *Bacteroidota* (23 филотипа), 33% — на филум *Actinomycetota* (57 филотипов), представленный родом *Rubrobacter* (класс *Rubrobacteria*, 6 филотипов, 5.6%), а также некультивируемыми представителями класса *Acidimicrobia* и семейства *Solirubrobacteraceae* (класс *Thermoleophilia*, 3 филотипа). В филуме *Chloroflexota* (10% от всех прокариот в образце) доминировали некультивируемые *Thermomicrobiales* (7 филотипов), относящиеся к группе JG30-KFCM45. *Planctomycetota* (18 филотипов) составляли 5% от всех прокариот и были представлены классами *Planctomyces* (75%, в основном некультивируемые представители семейств *Pirellulaceae*, 9 филотипов), *Isophaeraceae* (3 филотипа), *Gemmataceae* (3 филотипа), а также тремя филотипа *Phycisphaerae* (WD2101 soil group).

Микробные профили образцов почв плато Устюрт неожиданно оказались сходными с микробным сообществом ризосферы *K. ewersmanniana*. Главной общей чертой всех почвенных образцов и образца ризосферы оказалось присутствие тех же представителей филума *Actinomycetota* — *Rubrobacter*, некультивируемых *Acidimicrobia* и *Solirubrobacteraceae*. Среди *Chloroflexi* во всех образцах существенное место занимали *Thermomicrobiales*, представленные некультивируемым таксоном JG30-KF-CM45. В образце US2, так же как и в ризосфере терескена, присутствовали бактерии рода *Bradirrhizobium*, в образце US1 — бактерии рода *Skermaniella* (рис. S4).

Подземные воды и ручьи. Подземные воды локализованы на глубине 560–630 м под бывшим дном Аральского моря и обладают крайне низкой минерализацией. В этих образцах преобладали бактерии филума *Pseudomonadota* (от 83 до 88% от общего числа прокариот), причем во всех трех случаях это были бактерии класса *Gammaproteobacteria*. Доминирующие организмы при этом в каждом случае были различными (рис. 3 и рис. S5). В образце воды WW1 43% от общего микробного разнообразия приходилось на четыре филотипа рода *Thiobacillus*, 25% — на некультивируемые *Gammaproteobacteria*; в этом образце присутствовали также представители 34 филотипов *Bacillota* (7%), *Actinomycetota* (3%, 19 филотипов), два филотипа *Desulfobacterota* (2%). В образце WW2 доминирующим родом с долей 60% был род *Acinetobacter* в виде трех филотипов; присутствовали также представители родов, *Thiobacillus* (6%, 4 филотипа), один филотип *Aquabacterium* (4%), один филотип *Bradyrhizobium* (5%). В образце WW3 первое место занимает семейство *Comamonadaceae* (65%), за ним следуют два филотипа *Hydrogenophaga* (6%) и два филотипа *Sphingomonas* (4%).

На изливе воды из скважины K1 развивается зеленый мат (образец WM). Основными продуцентами органического вещества в нем являются цианобактерии (15% от всех прокариот), причем доминирует среди них один филотип — *Leptococcus*. Другой массовой группой в образце зеленого мата является филум *Nitrospirota*, представленный практически единственным родом — *Nitrospira*, в состав которого входят три филотипа (18% от всех прокариот). Вместо *Gammaproteobacteria* в цианобактериальном мате доминируют *Alfaproteobacteria*, доля которых возросла до 26%; наиболее массовой формой там является “*Candidatus Alysiosphaera*”, представленные тремя филотипами (11%; семейство *Genuinicoccaceae*).

В сообществе черно-рыжего осадка, находящегося под цианобактериальным матом (образец WD1), снова обнаруживается высокое содержание бактерий филума *Nitrospirota* (29%), в том числе представителей собственно рода *Nitrospira*, включающего в себя два филотипа (20%), один филотип *Thermodesulfovibrio* (5%) и пять некультивируемых филотипов класса *Thermodesulfovibronia* (3.3%). Помимо *Thermodesulfovibrio*, в цикле серы в этом сообществе могут участвовать шесть некультивируемых филотипов некультивируемой группы Sva0485 (11%), для которой была показана способность к сульфатредукции, и бактерии рода *Sulfurifustis* (6%, 1 филотип), окисляющие соединения серы. Интересно также присутствие в сообществе бактерий рода “*Candidatus Brocadia*” (1 филотип, 2.7%), осуществляющих анаэробное окисление аммония.

И еще больше возрастает разнообразие прокариот в образце WD2 — черном осадке в 50 м от излива скважины — большинство прокариот в нем представлены долями менее 3%. Исключение составляют хлоропласты, говорящие о присутствии в сообществе эукариотных водорослей — 15%. Следует отметить также присутствие в сообществе пяти филотипов некультивируемых *Gammaproteobacteria*, обозначаемых индексом Run-SP154 (2%), и десяти некультивируемых ASV филотипов *Anaerolineaceae* (6.4%). На *Desulfobacterota* приходился 21 филотип, что составляет 8.5% от всего сообщества.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе мы исследовали разнообразие прокариот в трех группах местообитаний: (1) водоемов — современного Западного Аральского моря и озера Судочье, в прошлом соединенного с морем протокой (вода и осадки); (2) почвы, являвшейся ранее дном Аральского моря, в том числе в области ризосферы произрастающего на ней растения; (3) сообществ, развивающихся на бывшем дне Аральского моря при увлажнении его водой, вытекающей из пробуренной скважины. В результате анализа вариабельного участка гена 16S рРНК

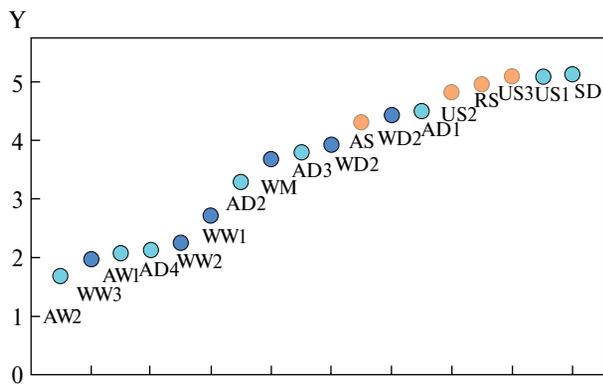


Рис. 4. Индекс разнообразия Шеннона (ось Y). Наименьшее разнообразие ASV филоотипов наблюдается в образцах AW2, WW3, AW1, AD4 и WW2. Наибольшее разнообразие ASV филоотипов выявлено в образцах ризосферы (RS), с плато Устюрт и из оз. Судочье (SD).

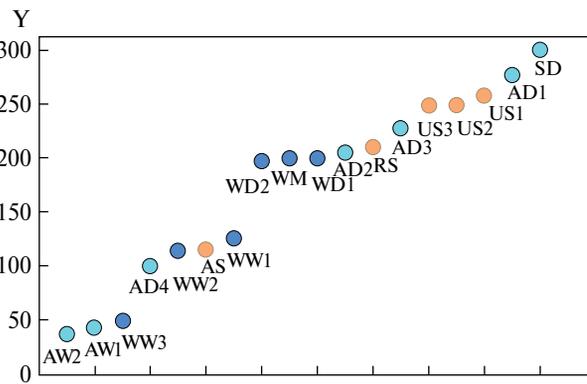


Рис. 5. Богатство (Richness) ASV филоотипов. Ось Y — количество ASV филоотипов. Наименьшее количество филоотипов представлено в образцах AW2, AW1 и WW3. Наибольшее количество филоотипов представлено в образце SD (оз. Судочье).

архей и бактерий исследованные сообщества были охарактеризованы по уровню имеющегося в них разнообразия прокариот. На рис. 4 представлены значения индекса Шеннона для исследованных местообитаний.

Наименьшим разнообразием отличаются сообщества воды Аральского моря с минерализацией 22%. Значительную часть обитающих в воде Аральского моря прокариот составляют некультивируемые археи семейства *Haloferacaceae* — их средняя доля, вычисленная на основании двух независимых измерений, составляла 33%. Представители *Haloferacaceae* являются облигатными аэробами и органотрофами, экстремальными галофилами, растущими в интервале солености от 2.5 до 5.2 мМ. Бактериальная часть сообщества воды Аральского моря представлена разнообразными бактериями, также аэробами и органотрофами. И в том, и в другом исследованном образце доминировали три филоотипа бактерий рода *Spiribacter* (среднее содержание 39%), типовой вид которого был выделен из солеварни в Испании (Leon et al., 2014). Этот организм также является аэробным органотрофом, но уже умеренным галофилом, растущим в интервале 10–25% NaCl. Из других обнаруженных в воде Аральского моря бактерий (8.5% от всего сообщества) можно отметить один филоотип представителей рода *Psychroflexus* (Bowman et al., 1998) — аэробных органотрофов, среди которых имеются и мезофильные, умеренно-галофильные виды (Donachie et al., 2004). Следует отметить полное отсутствие фототрофных прокариот в образцах воды Аральского моря; можно предположить, что энергетическими субстратами эту экосистему обеспечивают микроскопические эукариоты, не учтенные в этом исследовании.

Еще одной группой образцов с низким значением индекса Шеннона были образцы воды из глубинных скважин, что соответствует представлению

о подземной биосфере как крайне разреженной. Наконец, низкое разнообразие было выявлено в одном из образцов донных осадков (AD4), представляющем собой нижнюю часть 40 см керна, что, видимо, объясняется малым притоком энергетических субстратов в нижние слои осадков. Те же самые образцы, которые характеризуются низкими значениями индекса Шеннона, оказались наиболее бедными с точки зрения видового богатства (рис. 5).

Оба использованных индекса возрастают в случае трех оставшихся образцов осадков Аральского моря (рис. 4 и 5). В образцах AD1–3 архей значительно меньше, чем в воде (от 2 до 17%), и среди них доминируют некультивируемые представители *Woesearchaeales*, причем везде одной и той же группы — SCDC AAA B11-D5. Среди бактерий, обитающих в осадках Аральского моря, присутствуют аэробные (*Marinibacter*, *Idiomarina*), факультативно-анаэробные (*Salinivibrio*) и облигатно-анаэробные (*Halanaerobium*, *Fusibacter*) органотрофы. Разнообразие и обилие сульфатредуцирующих (*Desulfobacterota*) и сероокисляющих (*Thiomicrospira*, *Guyparkeria*) свидетельствует об активно протекающем в осадках Арала цикле серы, что коррелирует с высоким содержанием в них сульфатов (от 8 до 29 г/л).

Нельзя не обратить внимание на присутствующую в некоторых образцах осадков некультивируемую бактерию “*Candidatus Omnitrophus*”. Ее доля составляет 5–6% от общей численности прокариот, и появляется она в осадках с преобладанием анаэробных условий — черном сероводородном или прибрежной зоны (образец AD2) или нижнем горизонте осадков, отобранных в 10 м от берега (AD3). “*Omnitrophota*” — недавно описанная глубокая линия уровня филума, которая повсеместно распространена, однако обычно ее доля не превышает 0.1%. Культивировать эти бактерии до сих пор не удалось, однако сведения об

их метаболизме и образе жизни удалось воссоздать путем single-cell секвенирования (Perez-Molphe-Montoya et al., 2022). Исследованные нами местообитания с относительно высоким содержанием “*Omnitrophota*” могут стать оптимальным полигоном для их исследования.

Микробное сообщество бывшего дна Аральского моря, представляющего теперь засоленный песок, по своему составу оказались ближе к сообществам воды Арала, чем к осадкам, в первую очередь по примерно равным долям архей и бактерий и доминированию *Halobacterota*. Оно находится в середине графика, характеризующего индекс Шеннона (рис. 4) и в нижней части графика, иллюстрирующего видовое богатство исследуемых сообществ (рис. 5). Однако проведенные нами исследования того же грунта, но подвергнутого влиянию произрастающего на нем растения или изливающейся из глубинной скважины воды, показывают, как легко возвращается микробное разнообразие при снижении минерализации. Так, в ризосфере растущего на этом же засоленном песке растения минерализация резко падает, и одновременно меняется состав сообщества, приобретая черты почвы, характерной для плато Устюрт (рис. 4 и 5). Точно так же увлажнение песка водой из скважины, содержащей крайне бедный микробиом, дает возможность развиваться цианобактериальным матам и сопутствующим им органотрофам, осуществляющим разложение новообразованного органического вещества (рис. 4 и 5).

Наконец, самым богатым из всех исследованных образцов с точки зрения разнообразия является озеро Судочье. Ранее оно подпитывалось водами Амударьи и соединялось протокой с Аральским морем. Так же как и Аральское море, в связи с развитием системы оросительных каналов оз. Судочье стало пересыхать, однако затем его водный режим был восстановлен, в основном за счет отвода воды из Амударьи через систему коллекторов. Согласно нашим данным, сейчас минерализация воды в оз. Судочье составляет 1%, что соответствует минерализации Аральского моря до его обмеления. В осадках озера Судочье мы обнаружили большое разнообразие бактерий. Прежде всего, здесь, в отличие от осадков Аральского моря, присутствовали значительно более разнообразные фототрофы, в том числе пурпурные несерные бактерии рода *Rubribacterium* (9%), ранее найденные в содовых озерах (Болдарева и соавт., 2009). Цианобактерии — главным образом *Synechococcus* и *Cyanidium* — также присутствовали в значительном количестве (7%); можно предположить, что доля фототрофных прокариот в толще воды озера была еще выше. Аэробные и анаэробные органотрофы и бактерии цикла серы в оз. Судочье были гораздо разнообразнее, чем в Аральском море, в результате чего явно доминирующие группы практически отсутствовали. Как и в осадках Аральского моря, археи в оз.

Судочье были немногочисленны; доминировали те же *Woesearchaeales*, в то время как на *Halobacterota* приходилась лишь малая часть архей. Таким образом, в оз. Судочье сохраняется богатство таксонов, видимо, свойственное Аралу до его обмеления.

Итак, наиболее бедными с точки зрения разнообразия оказались местообитания с высоким содержанием соли: вода Аральского моря и его бывшее дно. Одновременно любое снижение солености — в ризосфере растения или за счет излива подземной воды из скважины — немедленно отражается в увеличении микробного разнообразия, как филогенетического, так, вероятно, и метаболического.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность С. С. Буриеву и А. И. Кулонову за помощь в организации экспедиции и отборе природных образцов, Н. Ю. Бешко за идентификацию растений-галофитов и А. Р. Строевой за помощь в выделении ДНК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Основные работы выполнены при поддержке проекта А-ФА-2021–428 “Микробные сообщества современного Арала и зон Приаралья: разнообразие, свойства и биотехнологический потенциал”. Работы по анализу результатов секвенирования были выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Отбор образцов — Н. А. Черных, А. Ю. Меркель, А. И. Слободкин, Ж. Э. Алимов; физико-химическая характеристика — К. В. Кондрашева; выделение метагеномной ДНК — Н. А. Черных, А. Ю. Меркель; баркодирование и пулирование библиотек генов 16S рРНК — А. А. Ключкина; секвенирование библиотек генов 16S рРНК — А. Ю. Меркель; профилирование микробного сообщества на основе результатов секвенирования — А. Ю. Меркель; анализ данных и подготовка статьи — Н. А. Черных, А. Ю. Меркель, А. И. Слободкин, К. Д. Давранов, Е. А. Бонч-Осмоловская;

руководство проектом — К. Д. Давранов, Е. А. Бонч-Осмоловская. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alexyuk M., Bogoyavlensky A., Alexyuk P., Molakhanov Y., Berezin V., Diegel I.* Epipelagic microbiome of the Small Aral Sea: metagenomic structure and ecological diversity // *Microbiol. Open*. 2021. V. 10. Art. e1142 <https://doi.org/10.1002/mbo3>
- Aripov T. F., Kukanova S. I., Zaynitdinova L. I., Tashpulatov J. J.* Microorganisms of the extreme zones of the Southern Aral Sea region // *BioTechnology: an Indian Journal*. 2016. V. 12. P. 1–7.
- Bowman J. P., McCammon S. A., Lewis T., Skerratt J. H., Brown J. L., Nichols D. S., McMeekin T. A.* *Psychroflexus torquis* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson et al. 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., comb. nov. // *Microbiology (Reading)*. 1998. V. 144. P. 1601–1609.
- Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J., Holmes S. P.* Dada2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods*. 2016. V. 13. P. 581–587.
- Callahan B., McMurdie P., Holmes S.* Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis // *ISME J*. 2017. V. 11. P. 2639–2643.
- Caruso V., Song X., Asquith M., Karstens L.* Performance of microbiome sequence inference methods in environments with varying biomass // *mSystems*. 2019. V. 4. Art. e00163–18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00163-18>
- Donachie S. P., Bowman J. P., Alam M.* *Psychroflexus tropicus* sp. nov., an obligately halophilic Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides group bacterium from an Hawaiian hypersaline lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 935–940.
- Fadrosh D. W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R. M., Ravel J.* An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. V. 2. Art. 6. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-6>
- Jiang H., Huang J., Li L., Huang L., Manzoor M., Yang J., Wu G., Sun X., Wang B., Egamberdieva D., Panosyan H., Birkeland N. K., Zhu Z., Li W.* Onshore soil microbes and endophytes respond differently to geochemical and mineralogical changes in the Aral Sea // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 765. Art. 142675. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142675>
- Lagkouvardos I., Fischer S., Kumar N., Clavel T.* Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons // *PeerJ*. 2017. V. 5. P. 2836–2840.
- León M. J., Fernández A. B., Ghai R., Sánchez-Porro C., Rodríguez-Valera F., Ventosa A.* From metagenomics to pure culture: isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 3850–3857.
- Merkel A. Y., Tarnovetskii I. Y., Podosokorskaya O. A., Toshchakov S. V.* Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // *Microbiology (Moscow)*. 2019. V. 88. P. 671–680.
- Perez-Molphe-Montoya E., Küsel K., Overholt W. A.* Redefining the phylogenetic and metabolic diversity of phylum *Omnitrophota* // *Environ. Microbiol.* 2022. V. 24. P. 5437–5449.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F. O.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 590–596.
- Shurigin V., Hakobyan A., Panosyan H., Egamberdieva D., Davranov K., Birkeland N. K.* A glimpse of the prokaryotic diversity of the Large Aral Sea reveals novel extremophilic bacterial and archaeal groups // *Microbiology Open*. 2019. V. 8. P. 850–865.
- Stulina G., Verkhoviseva N., Gorbacheva M.* Composition of the microorganism community found in the soil cover of the dry seabed of the Aral Sea // *J. Geosci. Environ. Prot.* 2019. V. 7. P. 1–23. <https://doi.org/10.4236/gep.2019.78001>
- Zhao D., Zhang S., Kumar S., Zhou H., Xue Q., Sun W., Zhou J., Xiang H.* Comparative genomic insights into the evolution of *Halobacteria*-associated “*Candidatus* Nanohaloarchaeota” // *mSystems*. 2022. V. 7. P. 669–691. <https://doi.org/10.1128/msystems.00669-22>

At Shores of a Vanishing Sea: Microbial Communities of Aral and Southern Aral Sea Region

N. A. Chernyh^{1, *}, A. Yu. Merkel¹, K. V. Kondrasheva¹, Zh. E. Alimov³, A. A. Klyukina¹,
E. A. Bonch-Osmolovskaya^{1, 3}, A. I. Slobodkin¹, K. D. Davranov²

¹Winogradsky Institute of Microbiology, FRC Fundamentals of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

³International Agricultural University, Tashkent, Uzbekistan

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: chernyh3@yandex.com

Abstract—Since the early 60s of the 20th century, as a result of agricultural development in the irrigated areas of Uzbekistan, the area of the Aral Sea has decreased by 90%, while the water salinity has increased from 1% to 20%. The aim of our work was to investigate the diversity of microbial communities of water and sediments of the Western Aral Sea, as well as of the adjacent soils and reservoirs using high-throughput sequencing of the 16S rRNA genes variable V4 region. It was found that the Aral Sea water with a salinity of 22% was dominated by uncultured *Archaea* of the family *Haloferacaceae* (22–43%), as well as by bacteria of the genera *Spiribacter* and *Psychroflexus*. In the Aral Sea sediments the share of archaea was much lower (2–17%), and among them the uncultured *Woesearchaeales* predominated. Among bacteria, dominating in Aral sediments, there were sulfate reducers of the phylum ‘*Desulfobacterota*’, as well as representatives of the genera *Fusibacter*, *Halanaerobium*, *Guyparkeria*, *Marinobacter*, *Idiomarina* and *Thiomicrospira*. In soil samples of the former Aral Sea bed with salinity of 8.2%, a variety of archaea of the phylum *Halobacterota* were present, as well as uncultured bacteria of the family *Nitrosococcaceae*. However, in the rhizosphere of Ewresmann’s teresken plant (*Kraschenninikovia ewresmanniana*) growing there, archaea accounted for only 4% and mainly represented the family *Nitrososphaeraceae*. 33% of all prokaryotes in the rhizosphere microbiome were the uncultured representatives of the phylum *Actinomycetota*. The microbial community of the teresken rhizosphere turned out to be similar to the microbial communities of the soil of the Ustyurt plateau, located in 3 km from the Aral Sea shore. The fresh water flowing along the former Aral Sea bed from an artificially drilled well also causes significant changes in the microbial communities: cyanobacterial mats and associated organotrophic bacteria develop along the stream bed with the increasing salinity (0.5–2%). Finally, the greatest diversity of prokaryotes was found in the microbial community of Sudochie Lake sediment with salinity of 1%, which is probably a modern analogue of the Aral Sea microbiome before its shallowing.

Keywords: Aral Sea, 16S rRNA gene sequencing, microbial communities, halophilic microorganism

Дополнительные материалы к статье

У БЕРЕГОВ ИСЧЕЗАЮЩЕГО МОРЯ: МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА АРАЛА И ЮЖНОГО ПРИАРАЛЯ

© 2024 г. Н. А. Черных^{а, *}, А. Ю. Меркель^а, К. В. Кондрашева^б, Ж. Э. Алимов^с, А. А. Клюкина^а, Е. А. Бонч-Осмоловская^{а, d}, А. И. Слободкин^а, К. Д. Давранов^б

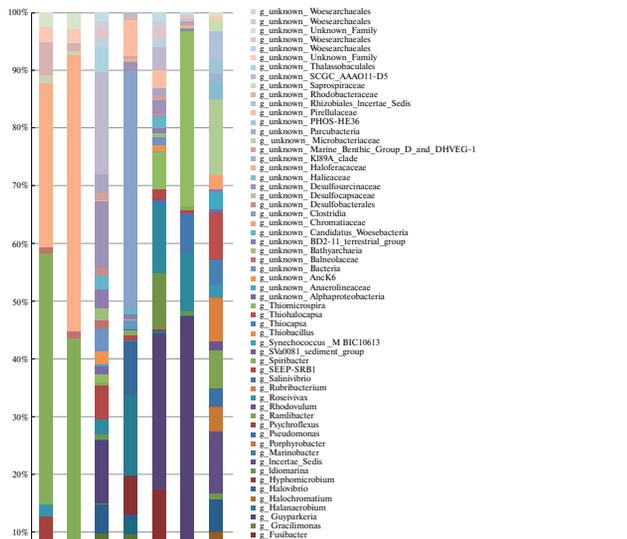


Рис. S1. Гистограмма, отражающая филогенетический состав (уровень семейства или рода) по результатам профилирования по гену 16S рРНК микробных сообществ воды, донных осадков и грунта Западного Аральского моря, а также донного осадка озера Судочье.

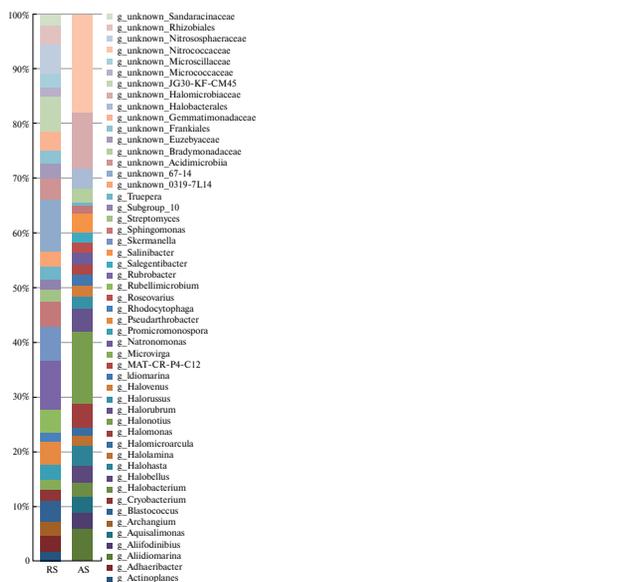


Рис. S2. Гистограмма, отражающая филогенетический состав (уровень рода) по результатам профилирования по гену 16S рРНК микробных сообществ, взятых на берегу Западного Аральского моря, состоящая из влажно-песка и из ризосферы терескена – *Krascheninnikovia ewersmanniana* (RS и AS).

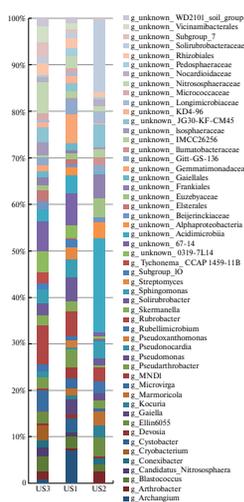


Рис. S3. Гистограмма, отражающая филогенетический состав (уровень рода) по результатам профилирования по гену 16S рРНК микробных сообществ, приуроченных к почвам плато Уstyurt (US3, US1 и US2).

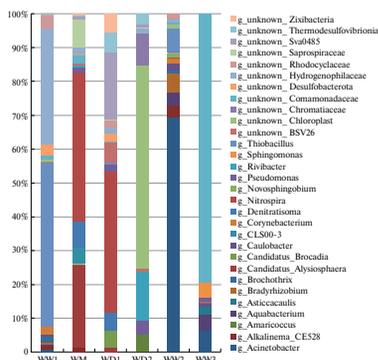


Рис. S4. Гистограмма, отражающая филогенетический состав (уровень рода) по результатам профилирования по гену 16S рРНК микробных сообществ, приуроченных к пресноводным скважинам (WW1-WW3, WM, WD1-WD2).



Фото 1. Вид на Западный Арал с плато Уstyurt.

УДК 579.234 + 279.8

ГАЛАКТОФУРАНАНЫ И ГАЛАКТОМАННАН КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КАК ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОДА И ВИДОВ *CLAVIBACTER*

© 2024 г. Е. М. Тульская^{а, *}, Д. Ким^а, Н. В. Потехина^а, А. С. Шашков^б, С. Н. Сенченкова^б,
Л. В. Дорофеева^с, Л. И. Евтушенко^с

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

^бИнститут органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва, 119991, Россия

^сВсероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина, ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Московская обл., 142290, Россия

*e-mail: em_tulskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 13.09.2023 г.

Принята к публикации 17.09.2023 г.

В клеточных стенках типовых штаммов двух видов фитопатогенных бактерий — *Clavibacter insidiosus* ВКМ Ас-1402Т и *Clavibacter nebraskensis* ВКМ Ас-1404Т (семейство *Microbacteriaceae*, класс *Actinomycetes*) — обнаружено по два гликополимера разных типов. Первый тип представлен новыми, не описанными ранее (1→6)-связанными β-D-галактофурананами, отличающимися у двух изученных штаммов структурой боковых олигосахаридных цепочек. Второй гликополимер, пируватсодержащий галактоманнан, был идентичен у обоих штаммов. Полученные в настоящей работе результаты, в совокупности с ранее опубликованными, указывают на то, что наличие в клеточных стенках пируватсодержащего галактоманнана и (1→6)-связанных β-D-галактофурананов (с одинаковой структурой кора и различными олигосахаридными боковыми заместителями) можно рассматривать в качестве хемотаксономического признака рода *Clavibacter*, в то время как ди-, три- или тетрасахаридные заместители в галактофурананах (отличающиеся по структуре и компонентному составу) специфичны для видов или групп видов. Полученные данные расширяют представления о структурном разнообразии природных гликополимеров и особенностях строения клеточных стенок бактерий различных таксонов и могут представлять интерес для таксономических исследований и работ по выяснению молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клетками растений.

Ключевые слова: *Clavibacter*, галактофуранан, галактоманнан, клеточная стенка, хемотаксономия

DOI: 10.31857/S0026365624010025

Принятые сокращения: HSQC — протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; ROESY — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; TOCSY — тотальная корреляционная спектроскопия; НМВС — гетероядерная корреляция через несколько связей; δ_C, δ_H — значения химических сдвигов атомов ¹³C и ¹H, соответственно.

Представители рода *Clavibacter* (семейство *Microbacteriaceae*, класс *Actinomycetes*) — аэробные коринеформные бактерии, характеризующиеся пептидогликаном В_{2g}-типа на основе 2,4-диаминомасляной кислоты и преобладающим менахиноном МК-9 в составе дыхательной цепи (Saddler, Kerr, 2012). В настоящее время род включает восемь валидно описанных видов: *C. michiganensis*, *C. capsici*, *C. californiensis*, *C. insidiosus*, *C. nebraskensis*,

C. sepedonicus, *C. tessellarius*, *C. zhangzhongii* (<https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter>, 2023). Все виды, за исключением *C. capsici* и *C. californiensis*, являются патогенами сельскохозяйственных культур, из них три вида (*C. michiganensis*, *C. insidiosus* и *C. sepedonicus*) — карантинные (Eichenlaub, Gartemann, 2011; Saddler, Kerr, 2012; https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list, 2022).

Гликополимеры клеточных стенок, ковалентно связанные с пептидогликаном и расположенные на поверхности клетки, играют важную роль в различных жизненных процессах микробной клетки (Brown et al., 2013; Guégin et al., 2022). Гликополимеры бактерий, ассоциированных с высшими организмами, привлекают внимание исследователей в связи с их участием в процессах колонизации и инфицировании организма-хозяина (Schade,

Weidenmaier, 2016). Изучение особенностей строения и компонентного состава гликополимеров важны для понимания их физиологических функций и биологических свойств, выяснения молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клетками макроорганизма, разработки методов борьбы с патогенами (Schade, Weidenmaier, 2016; Guérin et al., 2022). Изучение состава и структур гликополимеров микробного происхождения представляет также интерес для ряда областей фундаментальной науки, в частности, органической химии, микробиологии, эволюции и систематики микроорганизмов.

В настоящее время в основе системы классификации прокариот лежат данные сравнительного анализа геномов, однако информация о фенотипических характеристиках, в том числе хемотаксономических, по-прежнему актуальна (Chun et al., 2018; Nouiouï et al., 2018). Хемотаксономические признаки, такие как “дифференцирующие сахара целых клеток” и “состав сахаров клеточной стенки”, отражающие, в том числе состав структурных компонентов гликополимеров клеточной стенки, используются в систематике различных групп актиномицетов с 60-х годов прошлого столетия (Cummins, 1962; Lechevalier, Lechevalier, 1970; Goodfellow, Jones, 2012). Для видов рода *Clavibacter* в качестве диагностических сахаров клеточных стенок указывались, в частности, галактоза, манноза, рамноза и фукоза (Davis et al., 1984). Было также показано, что типы гликополимеров клеточных стенок актиномицетов (тейхоевые, тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты, арабиногалактаны и другие кислые или нейтральные полисахариды), их комбинации и структуры могут быть специфичными для таксонов разного ранга (Takeuchi et al., 1990; Potekhina et al., 2011; Тульская и соавт., 2011; Evtushenko, Ariskina, 2012; Goodfellow, Jones, 2012; Nouiouï et al., 2018; Шашков и соавт., 2020).

Наши предыдущие исследования клеточных стенок бактерий рода *Clavibacter* (*C. michiganensis*, *C. tessellarius*, *C. phaseoli*) и представителей потенциально новых видов этого рода показали, что все они содержали по два бесфосфатных гликополимера (галактоманнан и галактофуранан), при этом структуры галактофурананов были уникальны и различались у представителей разных видов (Kim et al., 2021, Shashkov et al., 2021; Perepelov et al., 2023a, 2023b).

Целью настоящей работы было установление состава и структур гликополимеров клеточных стенок типовых штаммов двух ранее не исследованных видов рода *Clavibacter* — *C. insidiosus* и *C. nebraskensis* и оценка таксономической значимости признака “состав и структура гликополимеров клеточных стенок” для бактерий этого рода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованные в работе типовые штаммы *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (www.vkm.ru). Культуры выращивали аэробно при перемешивании в течение суток (до середины логарифмической фазы роста) при 28°C на пептонно-дрожжевой среде (ПДС) (г/л): пептон — 5; дрожжевой экстракт — 3; глюкоза — 5, КН₂Р₄ — 0.2; рН 7.2). Клеточные стенки получали методом дифференциального центрифугирования. После разрушения на ультразвуковом дезинтеграторе клетки обрабатывали 2% раствором додецилсульфата натрия — SDS (при 100°C, 10 мин), многократно отмывали дистиллированной водой и лиофилизировали. Выделение гликополимеров из клеточных стенок осуществляли методами экстракции 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) при 2–4°C (“холодная экстракция”) и экстракции 5% ТХУ при 90°C (“горячая экстракция”) (Kim et al., 2021).

Очистку и изучение полимеров химическими и ЯМР-спектроскопическими методами проводили, как описано ранее (Kim et al., 2021). Продукты кислотного гидролиза (2 М НСl, 100°C, 3 ч) клеточных стенок и гликополимеров, а также абсолютную конфигурацию моносахаридов определяли методами хроматографии и электрофореза на бумаге и методами ГЖХ (Kim et al., 2021).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В гидролизатах клеточных стенок обоих штаммов был выявлен одинаковый состав моносахаридов: галактоза (Gal), манноза (Man), фукоза (Fuc), рамноза (Rha), глюкозамин (GlcN) и следовые количества глюкозы (Glc). У штамма *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T обнаружены дополнительно следы рибозы (Rib). Клеточные стенки всех штаммов также содержали пировиноградную кислоту. Фосфатсодержащие соединения не были обнаружены (метод электрофореза) ни в продуктах кислотного гидролиза клеточных стенок штаммов, ни в выделенных из них препаратах гликополимеров.

Методами ГЖХ в кислотных гидролизатах препаратов гликополимеров обоих организмов, полученных методом “холодной экстракции”, выявлен одинаковый состав моносахаридов: Gal, Fuc, Rha и GlcN. Моносахаридный состав препаратов, полученных методом “горячей экстракции”, включал дополнительно Man.

Установлено, что Rha имела L-конфигурацию, а остальные моносахаридные компоненты полимеров (Gal, Man, Fuc и GlcN) были в D-конфигурации.

Полученные данные указывали на присутствие в клеточной стенке каждого из исследованных

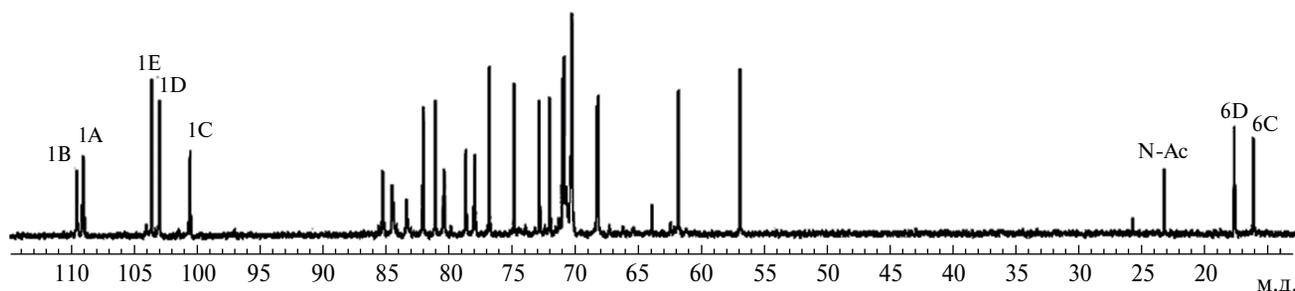


Рисунок. Спектр ¹³C ЯМР препарата “холодной экстракции” из клеточной стенки *C. insidiosus* VKM Ac-1402^T. Арабские цифры в номерах относятся к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами в табл. 1.

организмов, по крайней мере, двух бесфосфатных гликополимеров, различных по составу.

Дальнейшее изучение структур гликополимеров клеточных стенок изучаемых актинобактерий осуществляли химическими и ЯМР-спектроскопическими методами, как описано ранее (Kim et al., 2021).

Спектр ¹³C ЯМР (рисунок, табл. 1) препарата “холодной экстракции” из штамма VKM Ac-1402^T был типичным для полисахарида с регулярно повторяющимся звеном. Этот спектр содержал пять сигналов примерно одинаковой интегральной интенсивности в аномерной области атомов углерода δ_C 100–110 м.д., два сигнала от 6-дезоксисахаров (16.5 и 17.9 м.д.) и сигнал от CH₃-группы N-ацетила при 23.5 м.д. Остальные сигналы были расположены в области δ_C 57–86 м.д.

¹H ЯМР-спектр этого препарата также содержал пять сигналов в аномерной области δ_H 4.7–5.1 м.д., два дублета от 6-дезоксисахаров (δ_H 1.24 и 1.28 м.д.,

*J*_{5,6} 6 Гц) и сигналы от N-ацетильной группы при 2.05 м.д.

Анализ ¹H,¹H COSY, TOCSY и ROESY спектров (не приведены) выявил присутствие двух остатков β-галактофуранозы (β-Galf, остатки **A** и **B**), α-фукопиранозы (α-Fucp, остаток **C**), α-рамнопиранозы (α-Rhap, остаток **D**) и N-ацетилглюкозамин (β-GlcpNAc, остаток **E**).

Заключение о составе моносахаридов, их пиранозной или фуранозой конфигурации, а также аномерной конфигурации гликозидного центра были сделаны на основании сравнения видимых констант спин-спинового взаимодействия и химических сдвигов остатков сахаров и соответствующих пираноз (Altona, Haasnoot, 1980; Janson et al., 1989) и фураноз (Angyal, 1979; Syr, Perlin, 1979; Bock, Pedersen, 1983).

При сравнении ¹³C ЯМР и ¹H ЯМР спектров препарата штамма VKM Ac-1402^T с соответствующими

Таблица 1. Химические сдвиги ¹³C и ¹H ЯМР (δ_C TSP^a–1.6 м.д. и ¹H δ_H TSP 0.0 м.д.) галактофурананов из клеточных стенок *C. insidiosus* VKM Ac-1402^T и *C. nebraskensis* VKM Ac-1404^T

Остатки	(A)	C-1 <i>H-1</i>	C-2 <i>H-2</i>	C-3 <i>H-3</i>	C-4 <i>H-4</i>	C-5 <i>H-5</i>	C-6 <i>H-6 (H-6,6')</i>
→6)-β-Galf-(1→	(B)	109.1 5.07	80.6 4.24	78.1 4.06	83.4 4.18	70.7 3.99	70.5 3.86, 3.64
→6)-β-Galf-(1→ 3) ↑	(C)	109.6 5.04	82.4 4.10	85.4 4.05	84.5 3.98	71.0 3.95	70.5 3.86, 3.64
α-Fucp-(1 3) ↑	(D)	100.8 4.99	68.5 3.89	78.9 3.89	73.1 3.87	68.4 4.17	16.5 1.21
α-Rhap-(1 3) ↑	(E)	103.5 5.00	71.1 4.26	81.3 3.91	72.3 3.52	70.5 3.81	17.9 1.27
β-GlcpNAc-(1	(D)	103.8 4.72	57.1** 3.73	75.0 3.57	71.3 3.47	77.1 3.45	62.1 3.90, 3.75
***α-L-Rhap-(1→(3C)		103.5 5.00	71.1 4.06	72.2 3.85	73.3 3.43	70.1 3.82	17.9 1.27

* TSP — натриевая соль 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты.

** CH₃CON при δ_C 23.5 м.д. (CH₃) и 176.2 м.д.; (CO) и δ_H 2.03 м.д.

*** Для *C. nebraskensis* VKM Ac-1404^T (терминальный остаток дисахарида: α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Fucp-(1→).

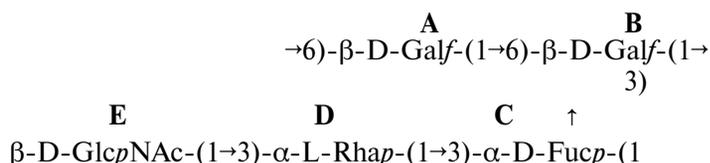
спектрами штамма ВКМ Ас-1403^T, изученного ранее (Kim et al., 2021), было выявлено их полное соответствие (химические сдвиги атомов ¹³С и ¹Н для штамма ВКМ Ас-1402^T приведены в табл. 1 и на рисунке). Полученные данные свидетельствовали о сходстве структур полисахарида штамма ВКМ Ас-1402^T с изученным ранее галактофурананом *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T (Kim et al., 2021).

Спектры ¹³С ЯМР (табл. 1, рисунок) были расшифрованы с использованием двумерного спектра ¹Н, ¹³С HSQC. Анализ спектра ¹Н, ¹³С HSQC выявил положение замещения в остатках сахаров на основании их ¹³С химических сдвигов по сравнению с таковыми для исходных пираноз и фураноз (Vock, Pedersen, 1983). Остатки β-Galf были замещены по положению 6 (А, δ_{C-6} 70.5) и 3,6 (В, δ_{C-3} 85.4 и δ_{C-6} 70.5, соответственно), остатки α-Fucp по положению 3 (С, δ_{C-3} 78.9), остатки α-Rhap по положению 3 (D, δ_{C-3} 81.3) и остатки β-GlcpNAc (Е) являлись терминальными для галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1402^T. Последовательность остатков в полимерной цепи была доказана при анализе спектра ¹Н, ¹Н ROESY (табл. 1), где наблюдались корреляционные пики

δ_H/δ_H между остатками: Н-1(А)/Н-6'(В) (5.07/3.64), Н-1(В)/Н-6'(А) (5.04/3.64), Н-1(С)/Н-3(В) (4.99/4.05), Н-1(D)/Н-3(С) (5.00/3.89), и Н-1(Е)/Н-3(D) (4.72/3.91). Эта последовательность была подтверждена при анализе спектра ¹Н, ¹³С НМВС (табл. 1), где выявлены следующие корреляционные пики δ_H/δ_C между остатками Н-1(А)/С-6(В) (5.07/70.5), Н-1(В)/С-6(А) (5.04/70.5), Н-1(С)/С-3(В) (4.99/85.4), Н-1(D)/С-3(С) (5.00/78.9) и Н1(Е)/С-3(D) (4.72/81.3).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что галактофуранан из клеточной стенки ВКМ Ас-1402^T имел структуру, близкую к описанной ранее у *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T (Kim et al., 2021). Однако эти два полимера различаются положением гликозидной связи между остатками рамнозы (D) и фукозы (С) в трисахаридном заместителе: у штамма ВКМ Ас-1402^T связь 1→3, а у штамма *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T связь 1→2.

Таким образом, повторяющееся звено галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1402^T можно представить следующим образом:



Сравнение ¹³С ЯМР и ¹Н ЯМР спектров препаратов “холодной экстракции” из штамма ВКМ Ас-1404^T (второго исследованного штамма) с соответствующими спектрами штамма ВКМ Ас-1402^T показало их сходство. Однако на двумерных

спектрах ¹Н, ¹³С HSQC, ¹Н, ¹Н ROESY и ¹Н, ¹³С НМВС препарата штамма ВКМ Ас-1404^T были обнаружены дополнительные сигналы, которые расшифрованы как принадлежащие терминальным остаткам рамнопиранозы D_t (табл. 1) в боковом

Таблица 2. Гликополимеры клеточных стенок некоторых штаммов рода *Clavibacter*

Штаммы ВКМ	Гликополимеры						
	ГФ 1	ГФ 2	ГФ 3	ГФ 4	ГФ 5	ГФ 6	ГМ
<i>C. insidiosus</i> Ас-1402 ^T	◆						●
<i>C. michiganensis</i> Ас-1403 ^T		◆					●
<i>C. nebraskensis</i> Ас-1404 ^T			◆				●
<i>C. tessellarius</i> Ас-1406 ^T				◆			● O-Ac
<i>C. phaseoli</i> Ас-2641 ^T					◆		●*
<i>Clavibacter</i> sp. Ас-1371						◆	●
<i>Clavibacter</i> sp. Ас-1372						◆	● O-Ac

Примечание. (◆) — ГФ, галактофуранан, (●) — ГМ, галактоманнан.

ГМ: →3)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-[4,6-S-Pyг]-Manp-(1→3)-α-D-Manp-(1→ (Kim et al., 2021);

ГФ 1: →6)-β-D-Galf-(1→6)-β-D-[β-D-GlcpNAc-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Fucp-(1→3)]-Galf-(1→ (настоящая работа);

ГФ 2: →6)-β-D-Galf-(1→6)-β-D-[β-D-GlcpNAc-(1→3)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-Fucp-(1→3)]-Galf-(1→ (Kim et al., 2021);

ГФ 3: →6)-β-D-Galf-(1→6)-β-D-[β-D-GlcpNAc-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Fucp-(1→3)]-Galf-(1→6)-β-D-Galf-(1→6)-β-D-[α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Fucp-(1→3)]-Galf-(1→ (настоящая работа);

ГФ 4: →6)-β-D-Galf-(1→6)-β-D-[α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Galp-(1→2)-α-D-[α-L-Rhap-(1→3)]-Fucp-(1→2)]-Galf-(1→ (Perepelov et al., 2023a);

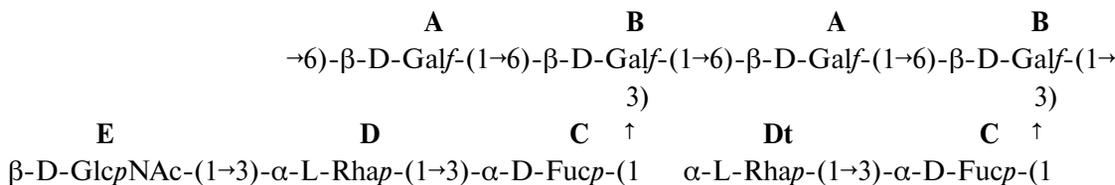
ГФ 5: →6)-β-D-Galf-(1→6)-β-D-[α-D-Manp-(1→2)-α-D-[α-D-Manp-(1→3)]-Ribf-(1→2)]-Galf-(1→ (Perepelov et al., 2023b);

ГФ 6: →6)-β-D-Galf-(1→6)-β-D-[α-D-Manp-(1→2)-α-D-Ribf-(1→2)]-Galf-(1→ (Shashkov et al., 2021).

* Наличие пируватсодержащего галактоманнана в минорных количествах предполагается на основании обнаружения его компонента (пирувиноградной кислоты) химическими методами.

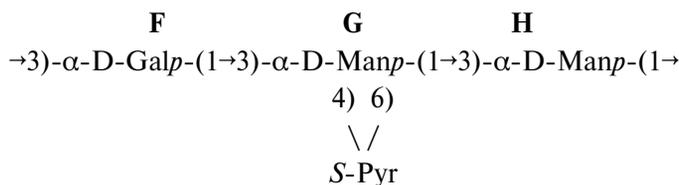
дисахариде α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Fucp-(1→. Дисахарид замещает каждый второй остаток галактофуранозы в интегральной цепи, чередуясь с вышеописанным (для галактофуранана штамма ВКМ Ас-1402^T) трисахаридом.

Таким образом, повторяющееся звено галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1404^T можно представить следующим образом:



Результаты исследований препаратов “горячей экстракции” из клеточных стенок штаммов ВКМ Ас-1402^T и ВКМ Ас-1404^T с использованием ранее описанных методов и подходов (Kim et al., 2021) показали присутствие, помимо галактофурананов,

описанных выше, пируватсодержащего галактоманнана. Структура галактоманнана обоих штаммов была полностью идентична галактоманнани из клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T (Kim et al., 2021):



В результате проведенного исследования установлены структуры гликополимеров клеточных стенок типовых штаммов видов рода *Clavibacter* — *C. insidiosus* и *C. nebraskensis*. Оба штамма содержали по два гликополимера нейтральной и кислой природы.

идентичные таковым у *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, но отличается присутствием дополнительного дисахаридного заместителя α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Fucp-(1→, который чередуется с трисахаридом.

Первый, нейтральный полимер *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, представляет собой (1→6)-связанный β -D-галактофуранан, каждый второй остаток которого несет боковой трисахарид, β -D-GlcpNAc-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Fucp-(1→. Этот полимер отличается от галактофуранана *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, структура которого опубликована ранее (Kim et al., 2021), (1→3)-локализацией гликозидной связи между остатками рамнозы и фукозы в боковом трисахаридном заместителе. Нейтральный гликополимер *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T имеет структуру кора и боковой трисахарид,

Положение (1→3)-гликозидной связи между остатками рамнозы и фукозы в боковом остатке трисахарид, а также наличие боковых дисахаридных заместителей на основной цепи галактофуранана указывает на новые детали структуры, не описанные ранее для *Clavibacter* и других грамположительных бактерий (<http://csdb.glycoscience.ru/>, 2022).

Второй гликополимер клеточных стенок исследованных штаммов — пируватсодержащий галактоманнан с повторяющимся звеном $\rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Galp-} (1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-[4,6-S-Pyr]-Manp-} (1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Manp-} (1 \rightarrow$. Полимер с такой структурой был впервые идентифицирован

Таблица 3. Сахара клеточных стенок изученных штаммов рода *Clavibacter*

Штаммы	Сахара в гидролизатах клеточной стенки*						Ссылка
	Gal	Man	Fuc	Rib	Rha	GlcN	
<i>C. insidiosus</i> ВКМ Ас-1402 ^T	+	+	+	(+)	+	+	Н.р.
<i>C. nebraskensis</i> ВКМ Ас-1404 ^T	+	+	+	—	+	+	Н.р.
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1403 ^T	+	+	+	—	+	+	Kim et al., 2021
<i>C. tessellarius</i> ВКМ Ас-1406 ^T	+	+	+	—	+	—	Perpelov et al., 2023a
<i>C. phaseoli</i> ВКМ Ас-2641 ^T	+	+	—	+	—	—	Perpelov et al., 2023b
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1371	+	+	—	+	—	—	Shashkov et al., 2021
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1372	+	+	—	+	—	—	Shashkov et al., 2021

Примечание. “+” — присутствует; “—” — отсутствует; (+) — следовые количества; н.р. — настоящая работа.
* У всех штаммов обнаруживается также глюкоза в следовых количествах.

у *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403Т (Kim et al., 2021) и к настоящему времени описан только у представителей рода *Clavibacter* (<http://csdb.glycoscience.ru/>, 2022). Хотя методами ЯМР-спектроскопии не удалось определить присутствие пируватсодержащего галактоманнана у *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641Т (вероятно, из-за его незначительного количества) (Perelov et al., 2023б), химическими методами был обнаружен его компонент (пировиноградная кислота) в составе препарата “горячей экстракции”, полученного из клеточных стенок штамма при повторных выращивании (Тульская Е. М., неопубликованные данные).

Сравнительный анализ гликополимеров, идентифицированных в настоящей работе и ранее у представителей разных видов *Clavibacter* (табл. 2), показал, что (1→6)-связанные β-D-галактофурананы (с одинаковой структурой кора и различными боковыми олигосахаридными заместителями), а также пируватсодержащий галактоманнан (несущий в ряде случаев О-ацетильные группы), присутствуют в составе клеточных стенок организмов всех 7 изученных видов *Clavibacter*. Помимо типовых штаммов признанных видов, в это число входят штаммы ВКМ Ас-1371 и ВКМ Ас-1372 — представители двух пока не описанных новых видов (Starodumova et al., 2018).

Полученные в настоящей работе результаты согласуются с ранее высказанным предположением о том, что пируватсодержащий галактоманнан и галактофурананы с олигосахаридными боковыми заместителями специфичны для представителей рода *Clavibacter*. С другой стороны, структуры галактофурананов с ди-, три- или тетрасахаридными заместителями различного состава и структуры могут служить диагностическими признаками видов.

Клеточные стенки всех исследованных в этой работе и ранее штаммов содержали галактозу, маннозу, глюкозу (следовые количества); у некоторых штаммов дополнительно обнаружены фукоза, рамноза, глюкозамин и рибоза. Наши результаты для *C. michiganensis*, *C. insidiosus*, *C. nebraskensis* и *C. tessellarius* в целом совпадают с данными, приведенными для этих видов в работе Davis et al. (1984). Однако у отдельных штаммов нами были дополнительно выявлены глюкозамин и рибоза (табл. 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований получены новые данные о химическом составе клеточных стенок типовых штаммов видов *C. insidiosus* и *C. nebraskensis*. Сравнительный анализ гликополимеров клеточных стенок всех изученных к настоящему времени представителей *Clavibacter* показал, что состав и структуры гликополимеров и их структурные компоненты (определяемые в кислотных гидролизатах клеточных стенок) специфичны для рода и видов *Clavibacter* и могут служить их хемотаксономическими маркерами. Полученные данные могут быть

востребованы в таксономических исследованиях и работах по выяснению молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клетками растений. Изучение галактофурананов как небелковых адгезинов, а также путей их биосинтеза, может представлять интерес для разработки средств борьбы с фитопатогенами рода *Clavibacter*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075–15–2021–1051) и в рамках темы научного проекта государственного задания МГУ № 121032300094–7.

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

- Тульская Е. М., Шашков А. С., Стрешинская Г. М., Сенченкова С. Н., Потехина Н. В., Козлова Ю. И., Евтушенко Л. И. Тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты актиномицетов // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 904–913.
- Tul'skaya E. M., Shashkov A. S., Streshinskaya G. M., Senchenkova S. N., Potekhina N. V., Kozlova Yu. I., Evtushenko L. I. Teichuronic and teichulosonic acids of actinomycetes // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 736–744. <https://doi.org/10.1134/S0006297911070030>
- Шашков А. С., Тульская Е. М., Стрешинская Г. М., Дмитренко А. С., Потехина Н. В., Сенченкова С. Н., Пискункова Н. Ф., Дорофеева Л. В., Евтушенко Л. И. Рамноманнаны и тейхуроновая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^Т // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 428–437.
- Shashkov A. S., Tul'skaya E. M., Streshinskaya G. M., Dmitrenko A. S., Potekhina N. V., Senchenkova S. N., Piskunkova N. F., Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I. Rhamnomannans and teichuronic acid from cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 369–377. <https://doi.org/10.1134/S0006297920030128>
- Altona C., Haasnoot C. A. G. Prediction of anti and gauche vicinal proton-proton coupling constants in carbohydrates: a simple additivity rule for pyranose rings // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. P. 417–429. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270130606>
- Angyal S. J. Hudson's rules of isorotation as applied to furanosides, and the conformations of methyl aldofuranosides // Carbohydr. Res. 1979. V. 77. P. 37–50. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83791-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83791-X)

- Bock K., Pedersen C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1983. V. 41. P. 27–66.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60055-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60055-4)
- Brown S., Santa Maria J. P. Jr., Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* 2013. V. 67. P. 313–336.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412155620>
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D. R., da Costa M. S., Rooney A. P., Yi H., Xu X. W., De Meyer S., Trujillo M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 461–466.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>
- Cummins C. S. La composition chimique des parois cellulaires d'actinomycetes et son application taxonomique // *Ann. Inst. Pasteur.* 1962. V. 103. P. 385–391.
- Davis M. J., Graves Gillaspie A. Jr., Vidaver A. M., Harris R. W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cyndodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1984. V. 34. P. 107–117.
<https://doi.org/10.1099/00207713-34-2-107>
- Evtushenko L. I., Ariskina E. V. *Nocardioideaceae* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* / Ed. Whitman W. B. 2015. P. 1–18.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00042>
- Guérin H., Kulakauskas S., Chapot-Chartier M. P. Structural variations and roles of rhamnose-rich cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria // *J. Biol. Chem.* 2022. V. 298. Art. 102488.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102488>
- Goodfellow M., Jones A. L. Order V. *Corynebacteriales* ord. nov. // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn. / Eds. Whitmann W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. New York–Dordrecht–Heidelberg–London: Springer, 2012. V. 5. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00009>
- Eichenlaub R., Gartemann K.-H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011. V. 49. P. 445–464.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>
- Janson P.-E., Kenne L., Widmalm G. Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ¹H- and ¹³C-n.m.r. data // *Carbohydr. Res.* 1989. V. 188. P. 169–191.
[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)84069-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84069-8)
- Kim D., Shashkov A. S., Dmitrenok A. S., Potekhina N. V., Senchenkova S. N., Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I., Tul'skaya E. M. Novel galactofuranan and pyruvylated galactomannan in the cell wall of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* VKM Ac-1403^T // *Carbohydr. Res.* 2021. V. 500. Art. 108247.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108247>
- Lechevalier M. P., Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1970. V. 20. P. 435–443.
- Nouioui I., Carro L., Garcia-Lopez M., Meier-Kolthoff J. P., Woyke T., Kyrpides N. C., Pukall R., Klenk H. P., Goodfellow M., Goker M. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 2007.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
- Perepelov A. V., Shashkov A. S., Kim D., Potekhina N. V., Dmitrenok A. S., Senchenkova S. N., Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I., Tul'skaya E. M. A highly branched novel galactofuranan in the cell wall of *Clavibacter tesselarius* VKM Ac-1406^T // *Carbohydr. Res.* 2023a. V. 529. Art. 108823.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108823>
- Perepelov A. V., Kim D., Tul'skaya E. M., Potekhina N. V., Dmitrenok A. S., Senchenkova S. N., Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I., Shashkov A. S. A novel cell wall galactofuranan in *Clavibacter phaseoli* VKM Ac-2641^T // *Carbohydr. Res.* 2023b. V. 525. P. 108778.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108778>
- Potekhina N. V., Streshinskaya G. M., Tul'skaya E. M., Shashkov A. S. Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria // *Taxonomy of Prokaryotes. Methods in Microbiology* / Eds. Rainey F. A., Oren A. London: Academic Press, 2011. V. 38. Ch. 6. P. 132–164.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00006-1>
- Saddler G. D., Kerr E. M. “Genus V. *Clavibacter* Davis, Gillaspie, Vidaver and Harris 1984” // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn. // Eds. Whitmann W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. New York–Dordrecht–Heidelberg–London: Springer, 2012. V. 5. P. 877–883.
- Schade J., Weidenmaier C. Cell wall glycopolymers of *Firmicutes* and their role as nonprotein adhesins // *FEBS Lett.* 2016. V. 590. P. 3758–3771.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12288>
- Shashkov A. S., Potekhina N. V., Kim D., Dmitrenok A. S., Senchenkova S. N., Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I., Tul'skaya E. M. Cell wall galactofuranan and pyruvate-containing galactomannan in the cell walls of *Clavibacter* strains // *Carbohydr. Res.* 2021. V. 510. Art. 108435.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108435>
- Starodumova I., Prisyazhnaya N., Tarlachkov S., Dorofeeva L., Vasilenko O., Evtushenko L. Taxonomy of the genus *Clavibacter* // XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation Conference Proceedings. Moscow: Moks-Press, 2018. P. 107.
- Syr N., Perlin A. S. The conformations of furanosides. A ¹³C nuclear magnetic resonance study // *Can. J. Chem.* V. 57. 1979. P. 2504–2511.
<https://doi.org/10.1139/v79-399>
- Takeuchi M., Yokota A., Misaki A. Comparative structures of the cell-wall polysaccharides of four species of the genus *Microbacterium* // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1990. V. 36. P. 255–271.

Galactofuranans and Galactomannan of Cell Walls as Chemotaxonomic Characteristics of the Genus and Species of *Clavibacter*

E. M. Tul'skaya^{1, *}, D. Kim¹, N. V. Potekhina¹, A. S. Shashkov², S. N. Senchenkova²,
L. V. Dorofeeva³, L. I. Evtushenko³

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

²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

³All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: em_tulskaya@mail.ru

Received July 10, 2023; revised September 13, 2023; accepted September 17, 2023

Abstract—Two types of glycopolymers of different structures were found in the cell walls of type strains of two species of phytopathogenic bacteria, *Clavibacter insidiosus* VKM Ac-1402^T and *Clavibacter nebraskensis* VKM Ac-1404^T (family *Microbacteriaceae*, class *Actinomycetes*). The first type is represented by new, previously undescribed (1→6)-linked β-D-galactofuranans, which differ in the studied strains of the two species by the structure of side oligosaccharide chains (the structures are given in the text). The structure of the second glycopolymer, pyruvate-containing galactomannan, was identical in both strains. The results obtained in this work, together with those previously obtained, indicate that the presence of pyruvate-containing galactomannan and galactofuranans with an identical core structure and different oligosaccharide side substituents can be considered as a chemotaxonomic trait of the genus *Clavibacter*, and galactofuranans with di-, tri-, or tetrasaccharide substituents of different composition and structures can serve as chemotaxonomic markers of species. The data obtained expand our understanding of the structural diversity of natural glycopolymers and structural features of the bacteria cell walls of various taxa and may be of interest for taxonomic studies and studies aimed at elucidating the molecular mechanisms of interaction between bacteria and plant cells.

Keywords: *Clavibacter*, galactofuranan, galactomannan, cell wall, chemotaxonomy

УДК 579.8 + 579.26

ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО ШТАММА *DIETZIA MARIS* MX2 ИЗ ЯКШИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ МИНЕРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ

© 2024 г. М. А. Харитонов^{а, *}, Ф. Г. Куприянова-Ашина^а, Т. Р. Шакиров^б,
М. С. Вафина^б, О. Н. Ильинская^а

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

^бАО “Центральный Научно-Исследовательский Институт геологии нерудных полезных ископаемых”
Казань, 420097, Россия

*e-mail: Maya_Kharitonova@mail.ru

Поступила в редакцию 13.07.2023 г.

После доработки 06.09.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

Галотолерантные микроорганизмы обладают высоким биотехнологическим потенциалом. Они являются продуцентами биологически активных веществ, стрессозащитных средств, гидролитических ферментов, используются для биоремедиации окружающей среды. Вместе с тем, характеристика новых галотолерантных бактерий и установление стратегий их солеустойчивости являются актуальными фундаментальными задачами. В настоящей работе из скважинного рассола Якшинского месторождения калийно-магниевых солей был выделен бактериальный штамм MX2. Изолят представлен не образующими спор аэробными грамположительными неподвижными бактериями, морфология которых варьирует от кокков до коротких палочек, способных к формированию V-образных форм. Колонии округлые, имеют ровные края и приподнятый центр, блестящие, оранжевого цвета. Бактерии штамма MX2 являются галотолерантными и способны к росту при концентрации NaCl до 9%. Геном штамма MX2 был секвенирован. Его размер составил 3747717 п.о., число белок-кодирующих генов — 3562. Изолят был идентифицирован как принадлежащий к виду *Dietzia maris* на основании анализа последовательностей генов 16S рРНК, *gyrB*, *groB*, *recA*, *rrk*, а также с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS). *D. maris* MX2 обладает полными метаболическими путями синтеза эктоина, гидроксiekтоина и трегалозы, а также системами транспорта эктоина, гидроксiekтоина, трегалозы, глицерина, глицерин-3-фосфата, L-пролина и глицин-бетаина. Таким образом, для обеспечения осмотического баланса *D. maris* MX2 использует стратегию накопления совместимых органических растворенных веществ.

Ключевые слова: *Dietzia*, галотолерант, стратегия адаптации, эктоин, трегалоза

DOI: 10.31857/S0026365624010032

В микробных сообществах, адаптированных к жизни при высоких концентрациях солей, представлены все три домена жизни — археи, бактерии и эукариоты (Oren, 2016). Галофильные и галотолерантные бактерии обладают различными типами метаболизма и принадлежат к разным филогенетическим ветвям. В их числе аэробные гетеротрофные и аноксигенные фототрофные гаммапротеобактерии, сульфатредуцирующие анаэробные дельтапротеобактерии и различные представители типов *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* (Ventosa et al., 1998).

При всем разнообразии механизмов противостояния низкой водной активности соляных сред существует две основные стратегии обеспечения осмотического баланса между цитоплазмой клеток

и средой обитания: (1) “много соли внутри (high salt-in)” — стратегия соленакопления при которой в цитоплазме облигатных галофилов поддерживаются высокие концентрации KCl, а весь внутриклеточный аппарат адаптирован для функционирования в присутствии высоких концентраций солей; (2) “мало соли внутри (low salt-in)” — стратегия накопления растворимых органических веществ, так называемых совместимых растворов (compatible solutes). Накопление осуществляется в результате процессов активного транспорта молекул из внешней среды, а также синтеза *de novo* (Oren, 2016). Такие растворенные вещества представляют собой незаряженные или цвиттерионные молекулы, которые не влияют на процессы метаболизма. Существует множество совместимых растворенных

веществ, среди которых аминокислоты, сахара, полиолы и их производные, а также азотсодержащие соединения (Hagemann et al., 2016). Преобладающими совместимыми растворами умеренных галофилов являются такие производные аминокислот как эктоин и глицин-бетаин (Waditee-Sirisattha et al., 2016). Вторая стратегия способна обеспечить высокую адаптивность микроорганизмов к изменениям солености среды, поскольку изменения внутриклеточных концентраций совместимых растворенных веществ не оказывают отрицательного воздействия на активность внутриклеточных ферментов (Gunde-Simerman et al., 2018).

Среды обитания галофильных и галотолерантных бактерий многочисленны, к ним относятся моря, океаны, соляные озера, солончаки (Ogen et al., 2016). Гиперсалиновые среды обитания формируются и в результате антропогенных воздействий, таких как промышленные разработки месторождений калийно-магниевых и натриевых солей. Еще в середине XX века при изучении примесей, обуславливающих красную окраску минералов Верхнекамского месторождения, Н. К. Чудинов обнаружил в рассоле структуры в виде нерастворимых хлопьев, не выпадающих в осадок. Микроскопический анализ показал наличие подвижных структур разнообразной формы, которые Н. К. Чудинов назвал “палеоорганизмами” (Литовский, 2008). Породами палеозоя представлен и осадочный чехол Верхне-Печорского бассейна (Вишняков и соавт., 2018). Исследования нижнепермской соляной толщи южной части Якшинского месторождения Верхне-Печорского калиеносного бассейна свидетельствуют о наличии органической составляющей, которая, помимо флюидных включений жидких углеводородов, представлена бактериями, водорослями, спорами и пылью растений (Шанина и соавт., 2018). Зоны засоления, образующиеся при промышленной добыче и переработке солей, являются местообитанием галофильных и галотолерантных бактерий (Плотникова и соавт., 2001; Корсакова и соавт., 2013; Ястребова и соавт., 2020; Пьянкова и соавт., 2022).

Характеристика новых галофильных и галотолерантных бактерий и установление стратегий осмоадаптации являются актуальными фундаментальными задачами. Кроме того, галотолерантные микроорганизмы находят широкое практическое применение. Они используются для биоремедиации окружающей среды и как продуценты биологически активных веществ, стрессозащитных средств, гидrolитических ферментов. Способность к росту в присутствии повышенных концентраций солей позволяет снизить риск микробной контаминации и обуславливает значительную экономию за счет снижения требований к стерильности условий культивирования (Waditee-Sirisattha et al., 2016).

Целью настоящей работы являлось выявление аэробных культивируемых галотолерантных бактерий в скважинном рассоле Якшинского месторождения минеральных солей, определение их таксономического статуса и стратегии выживания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Физико-химический анализ пробы. Отбор образца рассола из скважины № 31 (6144'16" с.ш., 56°36'42" в.д.) Якшинского месторождения произведен после вымывания водорастворимых солей из породы, представленной пластами карналлита ($\text{KMgCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и галита (NaCl) на глубине 412.6–416.0 м. В качестве растворителя использовалась вода из гидрогеологической скважины № 30Г/1 (61°44'15.5" с.ш., 56°36'31.0" в.д.). Образец был предоставлен в.н.с. ФГУП “ЦНИИГеолнедр” А. К. Вишняковым. Измерение содержания элементов в пробе проводили с использованием титриметрического и гравиметрического анализа, а также атомно-эмиссионной спектроскопии (оптический эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Optima 4300 DV (“Perkin Elmer”, США). Спектры образцов снимали на инфракрасном Фурье-спектрометре Tensor 27 (“Bruker”, Германия) при скорости сканирования 10 кГц и разрешении 4 см^{-1} . Исследования выполнены методом спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО или ATR, attenuated total reflection). Изображения проб, получали с помощью растрового электронного микроскопа “РЭМ-100У” (Россия) в режиме съемки: $U_{\text{уск}} = 30 \text{ кВ}$. Контрастирование производили путем напыления углерода.

Выделение и культивирование микроорганизмов. Выделение микроорганизмов проводили посредством прямого посева образцов скважинного рассола на чашки Петри с агаризованной минеральной солевой средой (МСС) (Nesterenko et al., 1982) с добавлением 0.5% глюкозы и 3% NaCl. Колонии пересевали на среду ГРМ (ТУ 9398–001–78095326–2006). Фиксированные препараты микроорганизмов, окрашенные по Граму, изучали с помощью оптического микроскопа Axiovert 200M (“Carl Zeiss”, Германия). На среде МСС бактерии выращивали при температуре 28°C в течение 72 ч на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об./мин. Контроль роста культуры осуществляли нефелометрически на КФК-2 при длине волны 590 нм. За единицу биомассы принимали поглощение в 1 см кювете, равное 1. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Excel, рассчитывая среднеквадратичное отклонение (σ). Результаты считали достоверными при $\sigma \leq 10\%$. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

MALDI-TOF/MS анализ. Одну колонию суточной культуры микроорганизмов наносили на ячею слайда, затем наслаивали 1 мкл раствора матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота) и подсушивали на воздухе в течение 5 мин. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра VITEK MS (“BioMerieux”, Франция). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение MYLA (“BioMerieux”, Франция).

Определение последовательности гена 16S рРНК. ДНК выделяли с использованием набора FastDNA Spin Kit For Soil (“MP Biomedicals”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР проводили с использованием пары 16S рДНК-специфичных праймеров 27F и 1492R и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Детекция продуктов секвенирования проводилась в автоматическом режиме методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США) на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета.

Полногеномное секвенирование (WGS) осуществляли на платформе Illumina MiSeq (“Illumina”, США) на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета с использованием наборов NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina и MiSeq Reagent Kits v3 (600-Cycle Kit). Сборка генома проводилась с использованием алгоритма SPAdes 3.15.5.

Биоинформационный анализ. Поиск гомологичных последовательностей проводили с использованием баз данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>). Филогенетический анализ был проведен с помощью программы MEGA 6 (“MEGA software group”, США). Для построения деревьев использовали метод максимального правдоподобия

(maximum likelihood, ML) с бутстреп-анализом 500 повторов (Tamura et al., 2013). Множественные выравнивания были выполнены с использованием ClustalW. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК, генов домашнего хозяйства, а также генов ферментов, участвующих в синтезе и транспорте осмолитов, были получены из базы данных GenBank (NCBI). Сведения о метаболических путях синтеза осмолитов были получены с использованием баз данных Киотской энциклопедии генов и геномов KEGG (Kanehisa, 2000). Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью пакета программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Сравнительный анализ полногеномных последовательностей проводили путем расчета средней идентичности нуклеотидных последовательностей (average nucleotide identity, ANI) (Rodriguez and Konstantinidis, 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика образцов скважинного рассола. Содержание H₂O в пробе составило 874.65 г на 1 кг рассола. Преобладающими ионами являлись ионы натрия и хлора. NaCl присутствовал в доле 73.83% и отражал основную составляющую породы — галит (табл. 1).

Доля карналлита (KMgCl₃ · 6H₂O) в растворе — 19.76%. Содержание MgCl₂ и KCl было примерно одинаково (11.08 и 12.08% соответственно), CaSO₄ содержался в меньших количествах (3.79%). Методом растровой электронной микроскопии были получены изображения пробы скважинного рассола (рис. 1).

Образцы представлены частицами неправильной, изломанной формы размером менее 40 мкм, часть их имеет нерезкие оплывшие грани, что характерно для карналлита. Дифференциальным фильтрованием через фильтры Шотта были получены фракции пробы скважинного рассола,

Таблица 1. Количественный химический анализ скважинного рассола и пересчет на солевой и минеральный составы (содержание H₂O в пробе: 874.65 г/кг рассола)

Ионный состав, %					
K ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
6.34	28.13	2.83	1.23	58.79	2.68
Солевой состав, %					
KCl	NaCl	MgCl ₂	CaSO ₄		
12.08	73.83	11.08	3.79		
Минеральный состав, %					
KCl (сильвин)	NaCl (галит)	KMgCl ₃ ·6H ₂ O (карналлит)	CaSO ₄ (ангидрит)		
3.41	73.83	19.76	3.79		

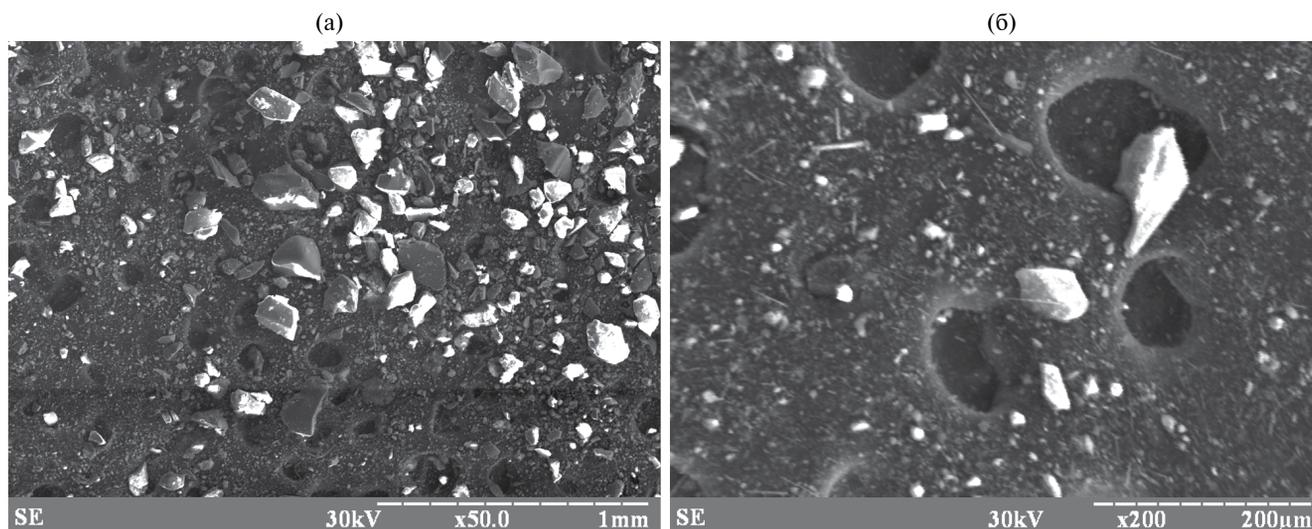


Рис. 1. Изображения пробы скважинного рассола, полученные методом растровой электронной микроскопии при 50-кратном (а) и 200-кратном увеличении (б). Длина масштабных меток: 1 мм (а), 200 мкм (б).

которые исследовались методом инфракрасной спектроскопии (табл. 2, рис. 2).

Во всех фракциях в области $3650\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ наблюдали полосы валентных колебаний ОН-, NH- и СН-групп. Разделение полос поглощения в области $3650\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ и наличие полосы поглощения при $\sim 1635\text{ см}^{-1}$ свидетельствуют о наличии NH-связей в образцах 1, 2 и 3. Полосу поглощения при 905 см^{-1} можно отнести к деформационным колебаниям СН-связей. Минералогическая составляющая образцов проявляется в области $1200\text{--}600\text{ см}^{-1}$. Полосы при 797 и 778 см^{-1} указывают на большое содержание калиевого полевого шпата и кварца во фракциях 3 и 5. Сравнение ИК-спектров всех фракций показало, что органические вещества присутствуют в исходной пробе 1, а также во фракциях 2 и 6. Отмывка приводила к очищению от органической части.

Выявление и идентификация галотолерантных микроорганизмов в скважинном рассоле. Прямое микроскопирование фиксированных препаратов образцов скважинного рассола показало наличие

в нем объектов в форме кокков и эллипсов (коротких палочек), окрашивающихся по Граму в синий цвет (рис. 3а).

Через 48 ч после посева образцов на солевом агаре появлялись бактериальные колонии трех типов. Преобладали мелкие светло-оранжевые гладкие колонии (8.7×10^3 КОЕ/мл), в 4 раза меньше было полупрозрачных колоний молочного цвета (2.1×10^3 КОЕ/мл), в незначительном количестве присутствовали матовые колонии с неровным краем (0.7×10^2 КОЕ/мл). Для дальнейшего исследования были выбраны микроорганизмы, присутствующие в пробе в наибольшем количестве. Их пересев на среду ГРМ приводил к росту выпуклых, блестящих, ярко-оранжевого цвета колоний с ровными краями и приподнятым центром, диаметр которых достигал 3–4 мм на 10 сут культивирования (рис. 3в). Обратная сторона колоний, прилегающая к субстрату, окрашена неравномерно: центр имеет оранжево-желтую окраску, периферия яркого оранжевого цвета. По прошествии двух недель цвет колоний становился кораллово-красным.

Таблица 2. Характеристика фракций проб скважинного рассола, полученных дифференциальным фильтрованием через фильтры Шотта

Фракция	Описание пробы	Полосы поглощения, см^{-1}
1	Исходная проба, содержащая блески и хлопья	3384, 1637, 1439, 999, 905, 795, 631
2	Блески и хлопья, выделенные фильтрацией (S00, 250–500)	3377, 3242, 1635, 1005, 798, 628
3	Отмытые блески и хлопья (S0, 160–250)	3395, 1638, 1439, 992, 797778, 746, 695, 643
4	Отмытые хлопья (S1, 100–160)	3110, 1639, 1450, 1001, 906, 795, 631
5	Отмытые блески (S2, 40–100)	3355, 2922, 1460, 992, 191ДП, 645
6	Раскристаллизованный раствор фильтрации (S3, 16–40)	3377, 3243, 1634, 1113, 1006

Примечание. В скобках указаны класс и пористость фильтров Шотта в мкм.

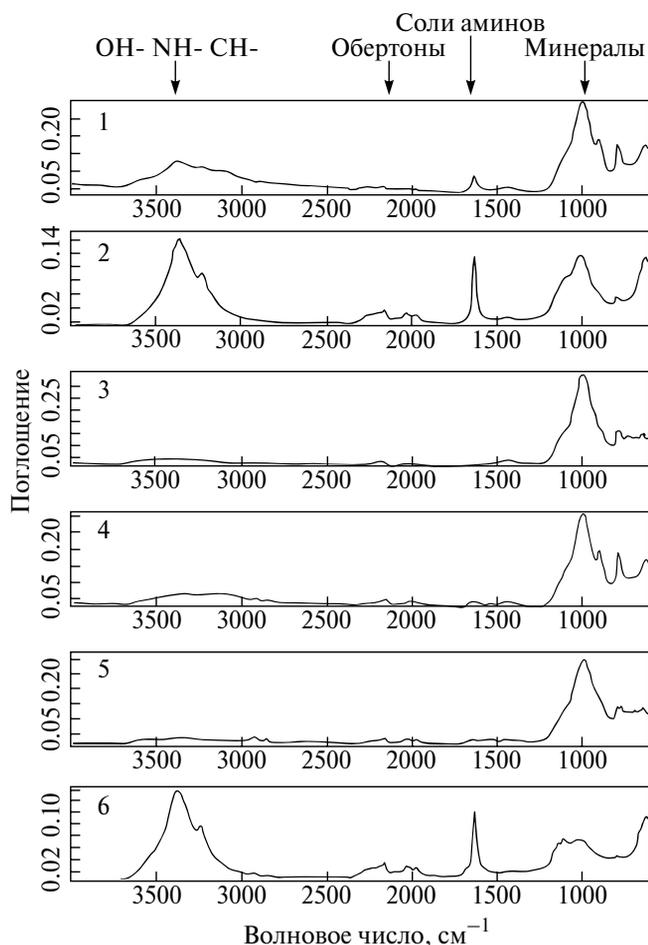


Рис. 2. ИК-спектры фракций пробы скважинного рассола, полученных дифференциальным фильтрованием через фильтры Шотта.

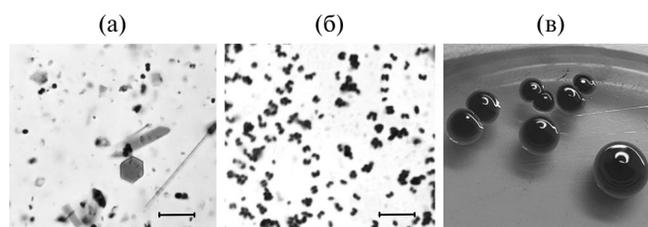


Рис. 3. Выявление микроорганизмов в скважинном рассоле: прямое микрофотографирование фиксированного препарата образца скважинного рассола (а); микрофотографирование *D. maris* MX2 (б); колонии *D. maris* MX2 на агаризованной среде ГРМ (в). Длина масштабной метки 5 мкм.

Микроскопия окрашенных по Граму фиксированных препаратов показала, что колонии состоят из грамположительных не споровых кокковых и эллипсоидных клеток, образующих V-образные формы (рис. 3б). Для определения интервала галотолерантности штамм MX2 выращивали в среде МСС с добавлением NaCl в диапазоне концентраций от 1 до 10% (рис. 4).

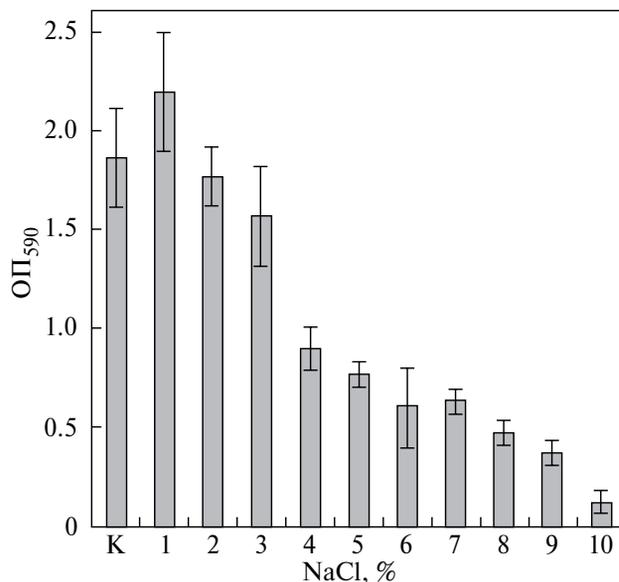


Рис. 4. Влияние различных концентраций NaCl на рост *D. maris* MX2. К — культивирование в минеральной солевой среде МСС, содержащей 0.1% NaCl.

Установлено, что оптимальными являются концентрации NaCl до 3%; вместе с тем, штамм MX2 способен к росту в присутствии 4–9% NaCl. Увеличение концентрации соли выше оптимальной приводило к снижению интенсивности роста в 2–8 раз. Поскольку в образцах скважинного рассола ионы натрия и хлора преобладали, а концентрация NaCl составила 9.2%, можно предположить, что штамм MX2 способен к жизнедеятельности в гиперосмотических условиях, создающихся в рассоле в результате вымывания солей из породы.

В результате MALDI-TOF-MS анализа было установлено, что исследуемый микроорганизм является представителем актинобактерий — *Dietzia maris* с показателем достоверности идентичности белковых профилей 99.9. Была проведена молекулярно-генетическая идентификация штамма MX2 посредством анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Последовательность гена 16S рРНК была депонирована в базе данных GenBank NCBI под регистрационным номером ON527787, ее длина составила 1332 нуклеотида. Анализ сходства с последовательностями, депонированными в GenBank, показал, что исследуемый штамм принадлежит к роду *Dietzia*. Наиболее близкими видами являются *D. maris* и *D. kunjimensis*. Было выявлено 22 штамма *D. maris* нуклеотидная идентичность с генами 16S рРНК которых составила 99.85–100.00% (MT632637, MK254648, MN134494, MG547917, MK318606, KU601225, OP218699, MW599789, KJ939458, OK299010, KF923451, KF740541, MZ292942, MZ149266, MW965720, MW624378, JF798365, GQ870425, NR_116685, NR_037025, NR_118596, MN134494, X79291).

Идентичность с геном 16S рРНК типового штамма *D. maris* DSM 43672—99.92%. Также высокий уровень сходства генов 16S рРНК (99.77—100%) показали шесть штаммов *D. kunjomensis* (*D. kunjomensis* WD821, *D. kunjomensis* 313, *D. kunjomensis* NC162, *D. kunjomensis* D143, *D. kunjomensis* ssp. *Schimae* DSM 45139, *D. kunjomensis* DSM 44907). Идентичность с генами 16S рРНК типовых штаммов *D. kunjomensis* DSM 44907—99.85%, *D. kunjomensis* ssp. *schimae* DSM 45139—99.77%.

К настоящему времени последовательности геномов *D. kunjomensis* получены в виде контигов (RAQB01, JAALDS01, JAALDR01, FXTG01) и скаффолдов (JAPWIF01, JASIRP01), расшифровка генома штамма *D. kunjomensis* 313 полностью завершена (GCA_024125715). Референсным является геном штамма *D. kunjomensis* ssp. *schimae* DSM 45139 (FXTG01). Геномы *D. maris* не расшифрованы полностью, 6 геномов представлены набором контигов: (JALXXM01, QNTT01, JAALDN01, JALXXI01, CANNAK01, CANNAO01), у двух геномов контиги упорядочены в скаффолды (LMTF01, JAPWIO01). Опубликованный геном типового штамма *D. maris* DSM 43672 по данным GenBank (от 05.09.2023 г.) контаминирован (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_001630765.1/). Ранее референсным считался геном штамма *D. maris* p3-SID1051 (JALXXI01). В 2023 году референсным был назначен геном штамма *D. maris* IEGM 44 (JAPWIO01), выделенный из загрязненных нефтью почв.

Было проведено секвенирование генома штамма MX2, который был депонирован в Genbank под номером доступа JAUNTB01. Геном представлен 111 контигами, его размер составил 3747717 п.о., содержание пар Г + Ц — 70.18%, число белок-кодирующих генов — 3562. Были выявлены полные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК, генов домашнего хозяйства (“housekeeping”) *gyrB* (β-субъединицы ДНК-гиразы), *rpoB* (β-субъединицы РНК-полимеразы), *recA* (рекомбиназа А), *ppk* (полифосфаткиназа), а также ген *alkB*

(алкан-монооксигеназа). Наличие гена *alkB*, кодирующего ключевой ферментом деградации n-алканов (van Beilen et al., 2007), может свидетельствовать о том, что штамм MX2 наряду с другими представителями рода *Dietzia* (Gharibzahedi et al., 2014) способен разлагать алифатические углеводороды. Нуклеотидная идентичность полных генов 16S rRNA (1523 п.о.) штамма MX2 и типовых штаммов *D. maris* DSM 43672 и *D. kunjomensis* DSM 44907 одинакова и составила 99.93%. Идентичность с генами 16S rRNA штаммов *D. maris* IEGM 44 и *D. kunjomensis* ssp. *schimae* DSM 45139 составила 100%. Существует вероятность того, что результаты MALDI-TOF-MS анализа могут быть ошибочны (Lorente-Leal et al., 2022) в связи с высоким сходством между видами и/или отсутствием спектров *D. kunjomensis* в базе данных. Поскольку возможности идентификации на основе последовательности генов 16S rRNA у близкородственных видов бывают ограничены (Cohan, 2001), для уточнения филогенетического положения были использованы гены “домашнего хозяйства”, эволюционирующие сравнительно медленно, но быстрее, чем гены 16S рРНК. Наиболее высокой идентичностью обладали гены домашнего хозяйства штамма *D. maris* IEGM 44 (*gyrB* — 98.58%, *rpoB* — 99.77%, *recA* — 99.19%, *ppk* — 99.76%). Нуклеотидная идентичность с генами домашнего хозяйства *D. kunjomensis* ssp. *schimae* DSM 45139, *D. kunjomensis* DSM 44907 и *D. kunjomensis* 313 была на 0.2—2.76% ниже. Идентичность с последовательностями генов домашнего хозяйства других видов *Dietzia* была ниже 92%. Кроме того, ген *alkB* штамма *D. maris* IEGM 44 обладал наибольшей идентичностью (99.19%) с геном, принадлежащим штамму MX2. Был проведен сравнительный анализ полногеномных последовательностей штамма MX2, *D. maris* IEGM 44, *D. maris* p3-SID1051, *D. kunjomensis* ssp. *schimae* DSM 45139, *D. kunjomensis* 313, основанный на расчете средней идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI). Наиболее высокий показатель ANI (98.49 и 97.27%) был установлен для штаммов вида *D. maris* (табл. 3).

Таблица 3. Попарное сравнение значений ANI (в %) геномов штаммов MX2, *D. maris* IEGM 44, *D. maris* p3-SID1051, *D. kunjomensis* DSM 44907, *D. kunjomensis* ssp. *Schimae* DSM 45139, *D. kunjomensis* 313

	<i>D. kunjomensis</i> 313	<i>D. kunjomensis</i> ssp. <i>Schimae</i> DSM 45139	<i>D. kunjomensis</i> DSM 44907	<i>D. maris</i> IEGM 44	<i>D. maris</i> p3-SID1051	MX2
<i>D. kunjomensis</i> 313	100.00	96.82	97.93	97.13	97.17	97.12
<i>D. kunjomensis</i> ssp. <i>Schimae</i> DSM 45139	96.82	100.00	96.77	96.57	96.63	96.56
<i>D. kunjomensis</i> DSM 44907	97.93	96.77	100.00	96.77	96.85	96.92
<i>D. maris</i> IEGM 44	97.13	96.57	96.77	100.00	97.20	98.49
<i>D. maris</i> p3-SID1051	97.17	96.63	96.85	97.20	100.00	97.27
MX2	97.12	96.56	96.92	98.49	97.27	100.00

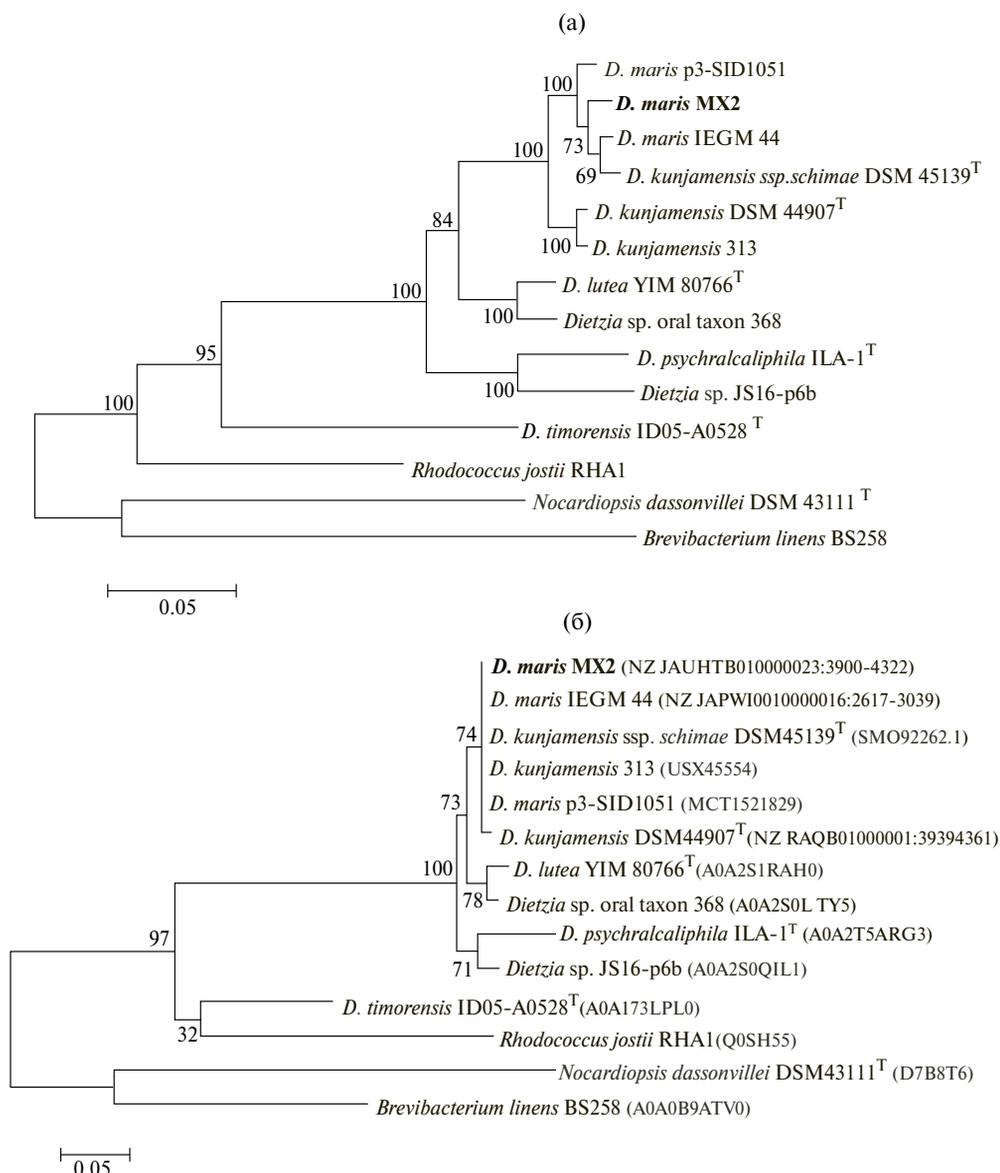


Рис. 5. Неукорененные филогенетические деревья, построенные методом максимального правдоподобия по результатам сравнительного анализа: (а) нуклеотидных последовательностей генов *gyrB* и (б) аминокислотных последовательностей L-эктоинсинтазы штаммов *D. maris* MX2, *D. maris* IEGM 44, *D. maris* p3-SID1051, *D. kunjamenis* ssp. *schimae* DSM 45139T, *D. kunjamenis* DSM 44907T, *D. kunjamenis* 313, *D. lutea* YIM 80766T, *D. psychralcaliphila* ILA-1T, *Dietzia* sp. oral taxon 368, *Dietzia* sp. JS16-p6b, *D. timorensis* ID05-A0528T, *Rhodococcus jostii* RHA1, *Nocardiopsis dassonvillei* DSM 43111T, *Brevibacterium linens* BS258. Цифрами указана статистическая значимость порядка ветвления (в %), определенная с помощью бутстреп-анализа 500 альтернативных деревьев. Масштабная метка — 0.05 замен на одну нуклеотидную позицию.

Таким образом, штамм MX2 был идентифицирован, как принадлежащий к виду *Dietzia maris*. Дерево, показывающее филогенетическое положение штамма *Dietzia maris* MX2, на основе анализа последовательностей гена *gyrB* представителей рода *Dietzia*, а также других актинобактерий (*Rhodococcus jostii* RHA1, *Nocardiopsis dassonvillei* DSM 43111, *Brevibacterium linens* BS258) представлено на рис. 5а.

Результаты исследования влияния различных концентраций NaCl на рост штамма MX2 согласуются с данными литературы (Koerner et al., 2009;

Пьянкова и соавт., 2022), свидетельствующими о способности *D. maris* к росту при концентрации NaCl в среде культивирования до 7%, что позволяет считать данные бактерии галотолерантными микроорганизмами. Присутствие штамма *D. maris* MX2 в образце рассола может быть связано как с выделением непосредственно из соляной толщи в процессе подземного растворения, так и с наличием данных бактерий в растворителе. Ранее было показано, что бактерии рода *Dietzia* отсутствуют в растворителе, но при этом в рассоле скважины

№ 31 они были выявлены (Пьянкова и соавт., 2022). Таким образом, вероятным источником *D. maris* MX2 является соляная толща. Отсутствие органической составляющей в отмытых фракциях (нерастворимые компоненты: хлопья и блестки) свидетельствует о том, что бактерии могут быть обнаружены только в растворимой части породы.

Стратегия выживания *D. maris* MX2 в гиперосмотических условиях. Род *Dietzia* был предложен Rainey в 1995 г. как моноспецифический таксон для микроорганизма, ранее классифицированного как *Rhodococcus maris* (Nesterenko et al., 1982; Rainey et al., 1995). На момент написания статьи род *Dietzia* включал 14 культивируемых достоверно охарактеризованных видов, входящих в семейство *Dietziaceae* и образующих отдельную кладу на филогенетическом дереве семейства *Corynebacteriaceae*. Представители *Dietzia* встречаются в широком спектре водных и наземных местообитаний. Они были выделены из щелочных подземных вод, соленых озер, почвы, нефтяных месторождений, образцов, взятых у пациентов с острыми инфекциями и с поверхности растений (Koerner et al., 2009). Разнообразие сред обитания, во многих из которых создаются стрессовые для бактериальной клетки условия, свидетельствует о наличии механизмов адаптации. Так, в клеточных стенках актинобактерий рода *Dietzia*, принадлежащего к надродовому таксону *Mycolata*, содержатся миколовые кислоты, играющие важную роль в сопротивляемости к обезвоживанию, химическим воздействиям и антибактериальным препаратам (Goodfellow, Maldonado, 2006).

Способность штамма MX2 к существованию в средах обитания с широким диапазоном концентраций солей, позволяет предположить, что данная актинобактерия для обеспечения осмотического гомеостаза использует вторую стратегию выживания в гиперосмотических условиях. Для представителей актинобактерий *Actinopolyspora halophila* и *Nocardiopsis* sp. известно, что доминирующими совместимыми веществами являются эктоин и бетаин, наименее значимы гидроксиэктоин и трегалоза (Gunde-Cimerman et al., 2018). Актинобактерии порядка *Micrococcales* (*Brevibacterium epidermidis*, *Kocuria varians*, *Nesterenkonia halobia*) и порядка *Streptomycetales* (*S. coelicolor*, *S. griseolus*) также накапливают эктоин, бетаин, гидроксиэктоин и трегалозу (Pastor et al., 2010). *Rhodococcus jostii* RNA1, принадлежащий, как и виды рода *Dietzia* к порядку *Corynebacteriales*, в условиях стресса индуцирует пути биосинтеза эктоина (LeBlanc et al., 2008). *R. jostii* PD630 продуцирует три осмолита — трегалозу, эктоин и гидроксиэктоин (Alvarez, 2004). Вероятно, *D. maris* MX2, как и другие галотолерантные актинобактерии, для адаптации к гиперосмотическим условиям накапливает подобные осмолиты.

Анализ полных последовательностей геномов представителей рода *Dietzia* (*D. lutea* YIM 80766, *D. psychrocaliphila* ILA-1, *D. timorensis* ID05-A0528, *D. kunjomensis* 313, *Dietzia* sp. JS16-p6b, *Dietzia* sp. oral taxon 368 W5195) с использованием баз данных KEGG pathway показал наличие в них метаболических путей биосинтеза и деградации эктоина. Эктоин синтезируется из L-аспартат-4-полуальдегида в цепи реакций, которые осуществляет диаминобутират-2-оксоглутарат транс-аминаза [EC:2.6.1.76], L-2,4-диамино-бутират ацетил-трансфераза [EC:2.3.1.178] и L-эктоин-синтаза [EC:4.2.1.108]. Данные ферменты у различных грамотрицательных и грамположительных бактерий кодируются эволюционно консервативным кластером генов, *ectABC* (Bursy et al., 2007). Субстрат для синтеза эктоина, L-аспартат-4-полуальдегид, образуется из аспартата при помощи аспартаткиназы [EC: 2.7.2.4] и аспартат-полуальдегид-дегидрогеназы [EC: 1.2.1.11]. Под воздействием эктоингидроксилазы (*EctD*) [EC:1.14.11.55] осуществляется гидроксилирование эктоина с образованием гидроксиэктоина. Для установления возможности использования эктоина в качестве инструмента второй стратегии борьбы с осмотическим стрессом, в геноме *D. maris* MX2 был произведен поиск генов, кодирующих ферменты метаболических путей синтеза эктоина. Выявленные последовательности идентичны гомологичным генам *D. maris* IEGM 44 на 97.68–99.53% и *D. maris* p3-SID1051 на 97.15–98.83%. Также высокой идентичностью обладают гены *D. kunjomensis* ssp. *schimae* DSM 45139 (96.30–99.06%) *D. kunjomensis* DSM 44907 (96.41–99.53%) и *D. kunjomensis* 313 (96.41–99.77%). Гены штаммов *D. maris* MX2 и *D. maris* IEGM 44, кодирующие L-эктоин-гидроксилазу, идентичны на 100%, гомологичные гены *D. maris* p3-SID1051, *D. kunjomensis* ssp. *schimae* DSM 45139 и *D. kunjomensis* 313 идентичны на 96.30–96.76%. Идентичность гомологичных генов представителей других видов рода *Dietzia* существенно ниже (74.71–94.10%). На филогенетическом дереве, построенном на основании выравнивания аминокислотных последовательностей L-эктоинсинтаз, *D. maris* MX2 располагается в общей клade с представителями *D. kunjomensis* и *D. maris*. Данная клada, в свою очередь, находится в клade, объединяющей другие виды рода *Dietzia* (рис. 5б). Подобное расположение соответствует топологии филогенетического дерева, сформированного на основании последовательностей генов *gyrB* видов рода *Dietzia* и других представителей актинобактерий (рис. 5а). Это может свидетельствовать о том, что гены L-эктоинсинтазы рода *Dietzia* являются гомологами, возникшими от предкового гена в процессе видообразования.

Сопrotивляемость солевому стрессу с помощью эктоина осуществляется галотолерантными бактериями не только путем синтеза, но и за счет его поглощения из окружающей среды. Ранее было показано, что в геномах представителей рода *Dietzia*,

выделенных из водной среды, наиболее распространены гены, кодирующие АТФ-связывающие транспортные белки суперсемейства ABC (Fang et al., 2020). В геноме штамма *D. maris* MX2 обнаружены гены, для которых на основании гомологии транслированных аминокислотных последовательностей установлено, что они кодируют субъединицы ABC-транспортера эктоина/гидроксиэктоина (АТФ-связывающий белок EhuA, субстрат-связывающий белок EhuB, гомологичные пермеазы EhuC и EhuD). Таким образом, штамм *D. maris* MX2 способен как поглощать эктоин из внешней среды, так и синтезировать его *de novo*. Помимо генов ABC-транспортеров эктоина, в геноме *Dietzia* sp. MX2 были обнаружены и другие осмопротекторные транспортеры. Это ABC-транспортер глицерина и глицерин-3-фосфата (гены *ugpA*, *ugpB*, *ugpC*), ABC-транспортер L-пролина и глицин-бетаина (гены *proX* и *proP*), а также транспортер глицин-бетаина пермеаза OpuD.

Важную роль в защите бактерий в условиях водного и гиперосмотического стресса играет такое осмопротекторное соединение как трегалоза, углевод из группы невосстанавливающих дисахаридов. Наиболее распространенным является путь синтеза трегалозы из UDP-глюкозы и глюкозо-6-фосфата при участии трегалозо-6-фосфат синтазы и трегалозо-6-фосфат фосфатазы. Трегалозо-6-фосфат синтаза (OtsA, EC2.4.1.15) была выделена у актинобактерии *Rhodococcus opacus* (Tischler et al., 2013). Установлено, что в геномах *D. lutea* YIM 80766, *D. psychralcaliphila* ILA-1, *Dietzia* sp. oral taxon 368, *D. timorensis* ID05-A0528, присутствуют гены, транслированные аминокислотные последовательности которых на 65.73–66.67% идентичны трегалозо-6-фосфат синтазе *R. opacus*. В геноме *D. maris* MX2 также были обнаружены гены, кодирующие ферменты, ответственные за синтез трегалозы из UDP-глюкозы и глюкозо-6-фосфата. При этом наибольшей идентичностью с ними (99.38–100.00%) обладали гены *D. maris* IEGM 44. Кроме того, с использованием баз данных KEGG pathway у представителей рода *Dietzia* обнаружен другой метаболический путь синтеза трегалозы, в котором происходит превращение олиго/полимальтодекстринов/гликогена в трегалозу в двустадийной реакции с помощью мальтоолигозилтрегалозо синтазы (TreY, EC:5.4.99.15) и мальтоолигозилтрегалозо трегалогидролазы (TreZ, EC:3.2.1.141). Установлено, что последовательности, кодирующие оба фермента, присутствуют в геноме *D. maris* MX2 и показывают высокое сходство с гомологичными последовательностями *D. maris* IEGM 44 (98.69% (*treY*) и 97.92% (*treZ*)) и *D. maris* p3-SID1051 (98.90% (*treY*) и 93.24% (*treZ*)).

В результате анализа генома штамма *D. maris* MX2 на наличие систем транспорта трегалозы, были обнаружены последовательности генов,

кодирующих белки-переносчики трегалозы — пермеазы SugA и SugB. Гомологичные пермеазы являются компонентами транспортера трегалозы у актинобактерии *Mycobacterium tuberculosis*. Поскольку у млекопитающих трегалоза отсутствует, данный транспортер необходим *M. tuberculosis* для ретроградного транспорта трегалозы как побочного продукта биосинтеза миколовых кислот клеточной оболочки (Kalscheuer et al., 2010). Соответственно, пермеазы SugA и SugB штамма *D. maris* MX2 с большой вероятностью осуществляют не только транспорт трегалозы из окружающей среды, но и обеспечивают рециркуляцию трегалозы, освобождаясь при формировании клеточной стенки.

Таким образом, из Якшинского месторождения минеральных солей был выделен новый штамм *D. maris* MX2, который является галотолерантным и адаптируется к высоким концентрациям солей в среде обитания посредством второй стратегии обеспечения осмотического баланса путем регулирования процессов синтеза и/или транспорта таких осмопротекторов как эктоин, гидроксиэктоин, трегалоза, глицерин, глицерин-3-фосфат, L-пролин и глицин-бетаин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность за возможность использования ресурсов, предоставляемых Междисциплинарным центром коллективного пользования Казанского (Приволжского) федерального университета.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства КФУ (Приоритет 2030) и поддержана грантом РНФ № 22–24–00036.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Вишняков А. К., Вафина М. С., Игнатович О. О. Структура и условия формирования калийных солей западной части Верхнепечорского соленосного бассейна // Отечественная геология. 2018. № 2. С. 70–78.

- Vishnyakov A. K., Vafina M. S., Ignatovich O. O.* Structure and formation conditions of potash salts, western part of verkhnepechorsky salt-bearing basin // *Otechestvennaya geologiya* (National Geology). 2018. № 2. P. 70–78. (In Russian).
- Корсакова Е. С., Ананьина Л. Н., Назаров А. В., Бачурин Б. А., Плотникова Е. Г.* Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей // *Микробиология*. 2013. Т. 82. С. 247–250.
- Korsakova E. S., Anan'ina L.N., Nazarov A. V., Bachurin B. A., Plotnikova E. G.* Diversity of bacteria of the family *Halomonadaceae* at the mining area of the Verkhnekamsk salt deposit // *Microbiology* (Moscow). 2013. V. 82. P. 249–252.
- Литовский В. В.* Мировые минеральные ресурсы: калийные соли Прикамья и фундаментальные проблемы геобиогенеза. Екатеринбург: Изд-во Урал. гос. ун-та путей сообщения, 2008. 162 с.
- Litovskiy V. V.* World mineral resources: potassium salts of the Prikamye and fundamental problems of geobiogenesis. Yekaterinburg: Publishing house of the Ural State University of Railway Transport, 2008. 162 p. (In Russian).
- Плотникова Е. Г., Алтынцева О. В., Демаков В. А., Кошелева И. А., Пунтус И. Ф., Филонов А. Е., Гавриш Е. Ю., Боронин А. М.* Бактериальные деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенных из засоленных почв и донных отложений в районах добычи соли // *Микробиология*. 2001. Т. 70. С. 61–69.
- Plotnikova E. G., Altyntseva O. V., Demakov V. A., Kosheleva I. A., Puntus I. F., Filonov A. E., Gavriush E. Yu., Boronin A. M.* Bacterial degraders of poly cyclic aromatic hydrocarbons isolated from salt-contaminated soils and bottom sediments in salt mining areas // *Microbiology* (Moscow). 2001. V. 70. P. 51–58.
- Пьянкова А. А., Плотникова Е. Г., Шанина С. Н.* Бактериальное сообщество рассолов, извлекаемых при подземном растворении калийно-магниевых солей Якшинского месторождения (Республика Коми) // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки*. 2022. Т. 164. кн. 3. С. 457–474.
- Pyanikova A. A., Plotnikova E. G., Shanina S. N.* Bacterial community of the brines extracted during the underground dissolution of potassium-magnesium salts of the Yakshinskoe deposit (Komi Republic, Russia) // *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*. 2022. V. 164. № 3. P. 457–474. (In Russian)
- Шанина С. Н., Галамай А. Р., Игнатович О. О., Бурдельная Н. С., Вальяева О. В.* Органическое вещество соляной толщи южной части Якшинского месторождения калийно-магниевых солей // *Геохимия*. 2018. Т. 56. № 7. С. 693–708.
- Shanina S. N., Burdelnaya N. S., Valyaeva O. V., Galamay A. R., Ignatovich O. O.* Organic matter of the salt sequence in the southern part of the Yakshinskoe potassium-magnesium salt deposit // *Geochem. Int.* 2018. V. 56. С. 719–734.
- Ястребова О. В., Плотникова Е. Г.* Филогенетическое разнообразие бактерий семейства *Micrococcaceae*, выделенных из биотопов с различным антропогенным воздействием // *Вестн. Пермского ун-та. Сер. Биология*. 2020. Вып. 4. С. 321–333.
- Yastrebova O. V., Plotnikova E. G.* Phylogenetic diversity of bacteria of the *Micrococcaceae* family, isolated from biotopes with different anthropogenic impacts // *Bulletin of the Perm University. Series Biology*. 2020. Iss. 4. P. 321–333. (In Russian).
- Alvarez H. M., Silva R. A., Cesari A. C., Zamit A. L., Peressutti S. R., Reichelt R., Keller U., Malkus U., Rasch C., Maskow T., Mayer F., Steinbüchel A.* Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004. V. 50. P. 75–86.
- Bursy J., Pierik A. J., Pica N., Bremer E.* Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 31147–31155.
- Cohan F. M.* Bacterial species and speciation // *Syst. Biol.* 2001. V. 50. P. 513–524.
- Fang H., Xu J. B., Nie Y., Wu X. L.* Pan-genomic analysis reveals that the evolution of *Dietzia* species depends on their living habitats // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 861–877.
- Gharibzahedi S. M.T., Razavi S. H., Mousavi M.* Potential applications and emerging trends of species of the genus *Dietzia*: a review // *Ann. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 421–429.
- Goodfellow M., Maldonado L. A.* The Families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae* // *The Prokaryotes* / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. N.Y.: Springer, 2006. P. 843–889.
- Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A.* Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations // *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. V. 42. P. 353–375.
- Hagemann M.* Coping with high and variable salinity: molecular aspects of compatible solute accumulation // *The physiology of microalgae. Developments in applied phycology* / Eds. Borowitzka M., Beardall J., Raven J. Cham: Springer, 2016. V. 6. P. 359–372.
- Kalscheuer R., Weinrick B., Veeraraghavan U., Besra G. S., Jacobs W. R. Jr.* Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugB-SugC is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 21761–21766.
- Kanehisa M., Goto S.* KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 27–30.
- LeBlanc J.C., Gonçalves E. R., Mohn W. W.* Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 2627–2636.
- Lorente-Leal V., Liandris E. Bezos J., Pérez-Sancho M., Romero B., de Juan L.* MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid screening alternative for non-tuberculous mycobacterial species identification in the veterinary laboratory // *Front. Vet. Sci.* 2022. V. 9. P. 827702.
- Nesterenko O. A., Nogina T. M., Kasumova S. A., Kvasnikov E. I., Batrakov S. G.* *Rhodococcus luteus* nom. nov. and *Rhodococcus maris* nom. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982. V. 32. P. 1–14.
- Oren A.* Life in Hypersaline Environments // *Their world: A diversity of microbial environments. Advances in Environmental Microbiology* / Eds. Hurst C. Cham: Springer, 2016. V. 1. P. 301–339.
- Pastor J. M., Salvador M., Argandoña M., Bernal V., Reina-Bueno M., Csonka L. N., Iborra J. L., Vargas C., Nieto J. J., Cánovas M.* Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 8. P. 782.

- Rainey S., Klatt S., Kroppenstedt R. M. *Dietzia*, a newgenus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 32–36.
- Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K. T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // PeerJ Preprints. 2016. V. 4. e1900v1.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipitski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Tischler D., Niescher S., Kaschabek S. R., Schlömann M. Trehalose phosphate synthases OtsA1 and OtsA2 of *Rhodococcus opacus* 1CP // FEMS Microbiol. Lett. 2013. V. 342. P. 113–122.
- van Beilen J. B., Funhoff E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. P. 13–21.
- Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. P. 504–544.
- Waditee-Sirisattha R., Kageyama H., Takabe T. Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology // AIMS Microbiol. 2016. V. 2. P. 42–54.

Isolation, Identification and Survival Strategy of *Dietzia maris* MX2 Halotolerant Strain from the Yakshinskoe Mineral Salts Deposit

M. A. Kharitonova^{1, *}, F. G. Kupriyanova-Ashina¹, T. R. Shakirov², M. S. Vafina², O. N. Ilinskaya¹

¹Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, 420008, Russia

²JSC “Central Research Institute of Geology of Non-metallic Mineral Resources”, Kazan, 420097, Russia

*e-mail: Maya_Kharitonova@mail.ru

Received July 13, 2023; revised September 6, 2023; accepted September 6, 2023

Abstract—Halophilic and halotolerant microorganisms have a high biotechnological potential. They are producers of biologically active substances, stress-protective agents, hydrolytic enzymes, and are used for environmental bioremediation. At the same time, the characterization of novel halotolerant bacteria and the disclosure of their salt tolerance strategy are topical fundamental problems. In the present work, a new strain MX2 was isolated from the salt well brine of the Yakshinskoe potassium-magnesium salt deposit. The isolate is represented by aerobic gram-positive non-motile bacteria that do not produce spores. The cell morphology varies from cocci to short rods that are capable of producing V-shaped forms. Colonies on the surface of agar nutrient medium were circular with an entire edge and raised center, glistening and orange. Bacteria of strain MX2 are halotolerant microorganisms capable of growing at NaCl concentrations up to 9%. Strain MX2 was sequenced. Its size was estimated at 3747717 b.p., the number of protein-coding genes — 3562. Strain MX2 was identified as belonging to the species *Dietzia maris* based on analysis of 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *recA*, *ppk* gene sequences and using time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *D. maris* MX2 has complete metabolic pathways for the synthesis of ectoine, hydroxyectoine, and trehalose, as well as transport systems for ectoine, hydroxyectoine, trehalose, glycerol, glycerol-3-phosphate, L-proline, and glycine-betaine. Thus, to ensure the osmotic balance, *D. maris* MX2 uses the strategy of accumulating compatible organic solutes.

Keywords: *Dietzia*, halotolerant, strategy of adaptation, ectoine, trehalose

УДК 579.258:579.22

ВЛИЯНИЕ НОКАУТОВ ГЕНОВ ПОЛИФОСФАТАЗЫ *PPN1* И ПОЛИФОСФАТСИНТЕТАЗЫ *VTC4* НА ОСОБЕННОСТИ РОСТА НА ЭТАНОЛЕ И ПОЛИФОСФАТЫ МИТОХОНДРИЙ У *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© 2024 г. А. А. Томашевский^{а, *}, Т. В. Кулаковская^а^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: tomashevskialexandr25@gmail.com

Поступила в редакцию 30.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 03.10.2023 г.

Одной из функций неорганических полифосфатов (полиР), как соединений с фосфоэфирными связями, является участие в энергетическом обмене. Митохондрии дрожжей содержат собственный пул полифосфатов, однако пути участия этих полимеров в функционировании митохондрий у этих микроорганизмов изучены недостаточно. Целью данной работы было выявление влияния нокаут-мутаций генов полифосфатсинтетазы *VTC4* и одной из полифосфатаз *PPN1* на содержание полифосфатов и полифосфатазную активность в митохондриях *S. cerevisiae* и особенности роста мутантных штаммов на этаноле. Показано, что нокаут гена *VTC4* приводил к значительному снижению содержания полиР в митохондриях. Нокаут гена *PPN1* приводил к исчезновению полифосфатазной активности, но только к небольшому увеличению содержания полифосфатов в митохондриях при росте на глюкозе. При росте на этаноле содержание полиР в митохондриях у данного штамма и родительского штамма совпадало и было примерно в два раза меньше, чем при росте на глюкозе. Оба мутанта способны расти на среде с этанолом в качестве источника углерода, однако характеризуются удлинением лаг-фазы при переходе от потребления глюкозы к потреблению этанола. Сделано предположение, что полифосфаты митохондрий могут представлять собой энергетический резерв этих органелл, необходимый для формирования полноценных митохондрий при переходе от гликолиза к окислительному фосфорилированию.

Ключевые слова: митохондрии, полифосфаты, *PPN1*, *VTC4*, окислительное фосфорилирование, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026365624010045

Неорганические полифосфаты (полиР) – линейные полимеры, содержащие от нескольких до нескольких сотен ортофосфатных остатков и выполняющие в клетке многочисленные функции, включая резервирование фосфата и энергии, связывание катионов, образование мембранных каналов, участие в формировании и функционировании клеточной оболочки, регуляцию экспрессии генов и активности ферментов и приспособление к стрессовым условиям (Kulaev et al., 2004; Rao et al., 2009; Deponcourt, Downey 2021; Orell et al., 2012).

Ген *VTC4* кодирует основной фермент, обладающий полифосфатсинтетазной активностью у дрожжей и синтезирующий полиР с использованием энергии АТФ (Hothorn et al., 2009). *Vtc4* катализирует перенос терминального фосфатного остатка с АТФ на полиР. Активатором полиР синтетазы является 5-PP-InsP5 (Gerasimaite et al., 2017).

Белок *Vtc4* является частью VTC комплекса вакуолярной мембраны дрожжей, в состав которого также входят белки *Vtc1*, *Vtc2* и *Vtc3* (Muller et al., 2002; Muller et al., 2003). Этот комплекс локализован в вакуолярной мембране, и к числу его функций относится функция шаперона по отношению к V-АТФазе этой мембраны и участие в слиянии вакуолярной мембраны с другими мембранными структурами (Muller et al., 2002; Muller et al., 2003). Нокаут-мутанты по гену *VTC4* содержат очень мало полиР по сравнению с родительскими штаммами (Voysse et al., 2006; Tomashevsky et al., 2021).

Ген *PPN1* кодирует фермент, обладающий экзополифосфатазной и эндополифосфатазной активностью и участвующий в регуляции метаболизма полифосфатов (Sethuraman et al., 2001; Andreeva et al., 2015). Моновалентные катионы стимулируют экзополифосфатазную активность *Ppn1*, ионы NH_4^+

также стимулируют и эндополифосфатазную активность (Andreeva et al., 2019). Недавно открыт новый способ пост-трансляционной модификации белков, приводящий к изменению их свойств и активности, — ковалентное присоединение полиР к остаткам лизина, так называемое лизин-полифосфорилирование (Azevedo et al., 2015; 2020). Показано, что Ppn1 способна гидролизовать эти полиР (Azevedo et al., 2015). У мутанта *Δppn1* исчезала полифосфатазная активность митохондриальной мембраны и резко снижалась эта активность в вакуолях и ядрах (Lichko et al., 2006). Эти данные, в совокупности со сравнительным анализом свойств полифосфатаз, свидетельствуют о том, что полифосфатаза Ppn1 локализована в вакуолях, ядрах и митохондриальных мембранах. В первой работе, посвященной идентификации и функциям полифосфатазы Ppn1, было установлено, что мутации в гене *PPN1*, приводящие к отсутствию этой полифосфатазы в клетках *S. cerevisiae*, вызывают увеличение содержания полиР и их длины цепи (Sethuraman et al., 2001). При более детальном анализе содержания различных фракций полиР у мутанта *Δppn1* было показано, что на стационарной стадии роста происходило двукратное увеличение содержания наиболее короткоцепочечной фракции полиР1, а содержание других фракций мало изменялось (Кулаковская и соавт., 2006). Анализ содержания полиР в изолированных субклеточных фракциях показал, что у мутанта *Δppn1* наблюдается увеличение содержания полиР в митохондриях и вакуолях (Lichko et al., 2006). Также было показано, что у штамма *MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1* (Sethuraman et al., 2001) с нокаутом *PPN1* снижена выживаемость в стационарной стадии роста. Это снижение было объяснено тем, что данный штамм не способен к потреблению лактата и этанола (Pestov et al., 2005). В митохондриях этого штамма снижена полифосфатазная активность и увеличено содержание полиР (Pestov et al., 2005). Было сделано предположение о том, что полиР играют важную роль в регуляции функционального состояния митохондрий дрожжей.

В клетках млекопитающих полиР/поли-β-гидроксипутират- Ca^{2+} комплексы могут участвовать в функционировании канала митохондриальной мембраны, так называемого mitochondrial permeability transition pore (Pavlov et al., 2005). ПолиР митохондрий млекопитающих вовлечены в нормальное функционирование этих органелл и в процесс изменения проницаемости в условиях стресса (Abramov et al., 2007). Недавно было показано, что полиР митохондрий млекопитающих активируют дыхание, не сопряженное с синтезом АТФ (V2), но ингибируют АДФ-зависимое дыхание (V3). Кроме того, они могут стимулировать активность F_0F_1 -АТФазы в присутствии АТФ и могут быть синтезированы и гидролизованы этим ферментом вместо АТФ (Baev et al., 2020).

В недавних работах с культурами человеческих клеток было показано, что значительное ферментативное снижение содержания полиР в митохондриях (посредством экспрессии в генетически модифицированных клетках дрожжевой полифосфатазы PPX) приводит к переключению энергетического обмена клетки с окислительного фосфорилирования на гликолиз (Solesio et al., 2021). В клетках, содержащих такие генетические конструкции, наблюдали изменение экспрессии многих белков митохондрий, что может быть объяснено как общим нарушением метаболизма, так и тем, что полиР митохондрий, возможно, напрямую участвуют в регуляции экспрессии некоторых белков этих органелл (Guitart-Mampel et al., 2022). Эти данные показывают, что полиР митохондрий млекопитающих могут быть одним из важнейших регуляторных факторов этих органелл.

Дрожжи остаются эффективной моделью для исследований в области энергетического обмена у эукариот. В настоящее время доступны коммерческие мутантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, что позволяет проводить исследования с использованием мутантов, содержащих стандартизованные генетические конструкции. Это особенно важно в связи с тем, что многие мутации у дрожжей обладают плейотропным действием, которое может зависеть от способа получения мутантов.

Целью данной работы было выявление влияния нокаут-мутаций по *VTC4* и *PPN1* на полифосфатазную активность и содержание полифосфатов в митохондриях *S. cerevisiae* и особенности роста мутантных штаммов на этаноле с использованием в качестве объекта исследования мутантных штаммов из коллекции Dharmacon.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования. В работе были использованы родительский штамм BY4741 (*MATa his3D1 leu2D0 lys2D0 ura3D0*) и мутантные штаммы *Δppn1* и *Δvtc4*, полученные из коммерческой коллекции Dharmacon.

Состав среды и условия культивирования. Клетки дрожжей выращивали в среде YPD (0.5% дрожжевого экстракта (“Difco”), 1% пептона (“Диаэм”, Россия), 1% глюкозы) в колбах по 200 мл среды на качалке (145 об./мин) при 29°C до стационарной стадии роста, осаждали, промывали и использовали для выделения митохондрий. Для получения митохондрий в условиях культивации на спирте клетки выращивали в среде YPD до стационарной стадии роста, осаждали, промывали водой и переносили в среду YPEth (0.5% дрожжевого экстракта, 1% пептона, 1% этанола) в колбах по 50 мл среды в количестве ~1 г на колбу. Клетки культивировали в течение 10 ч на качалке (250 об./мин) при 29°C. Биомассу осаждали, промывали и использовали

для выделения митохондрий. Для оценки продолжительности лаг-фазы клетки выращивали на среде YPD до логарифмической стадии, осаждали, промывали и переносили в среду YPEth в количестве ~0.3 г сырой биомассы на 50 мл среды.

Выделение митохондрий производили методом дифференциального центрифугирования согласно описанной ранее методике с модификациями (Lichko et al., 2006). Сферопласты, полученные путем инкубации клеток с “улиточным ферментом” (лиофилизированным желудочным соком виноградной улитки), промывали 1.2 М сорбитом и разрушали в буфере (20 мМ Tris-HCl pH 6.8, 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонил фторид), 1 мМ ЭДТА, 4 мМ MgSO₄, 0.02% бычий сывороточный альбумин, 0.05% конканавалин А) без осмотического стабилизатора в гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в течение 3 мин. После чего быстро при перемешивании добавляли равный объем того же буфера, но с 1.2 М сорбитом. Гомогенат центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Осадок гомогенизировали тefлоновым пестиком в буфере с 0.6 М сорбитом 1 мин, центрифугировали при 2500 g в течение 10 мин. Митохондрии из супернатанта, полученного после второго низкоскоростного центрифугирования, осаждали при 10000 g в течение 10 мин. Для получения препарата митохондрий из клеток, выращенных на среде с этанолом, клетки, выращенные на среде с глюкозой до стационарной стадии, переседали на свежую среду с этанолом и культивировали в течение 10 ч. Разрушение сферопластов проводили в буфере, содержащем 0.6 М сорбит.

Определение белка производили по методу Брэдфорд, используя реагент Coomassie Plus (“Pierce”) согласно протоколу производителя. В качестве стандарта использовали БСА.

Определение ферментативных активностей. АТФазную активность определяли по скорости высвобождения фосфата при 30°C в течение 30 мин в 1 мл реакционной смеси, содержащей 1 мМ MgSO₄ и 1 мМ АТФ в 50 мМ Tris-HCl с pH 8.5 в присутствии и отсутствии 5 мМ NaN₃. Экзополифосфатазную активность определяли по скорости высвобождения фосфата при 30°C в течение 30 мин в 1 мл реакционной смеси, содержащей 2.5 мМ MgSO₄ и 1 мМ полиР со средней длиной цепи 188 фосфатных остатков (концентрация выражена по кислоталабильному фосфору) в 50 мМ Tris-HCl с pH 7.2. Высвобождающийся фосфат в обоих случаях измеряли колориметрически (Kulakovskaya et al., 1999).

Экстракция полиР. Для экстракции полифосфатов к суспензии митохондрий (~1 мг белка) добавляли 1 мл 1 М HClO₄, инкубировали 15 мин при перемешивании при 4°C, осаждали центрифугированием 10000 g 10 мин. В супернатанте измеряли фосфат до и после обработки 1 М HCl при 100°C

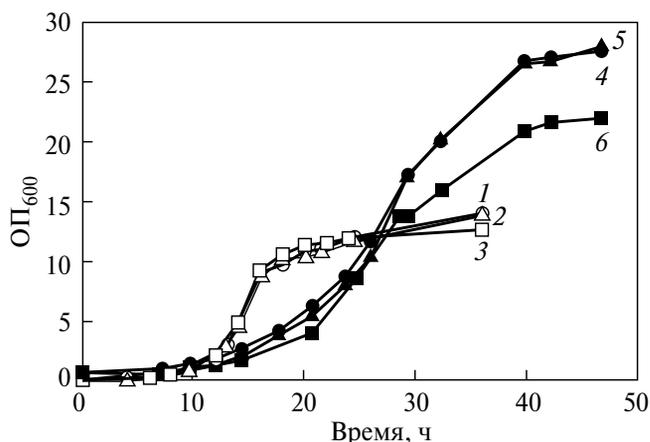


Рис. 1. Кривые роста на среде YPD и YPEth: 1 — родительский штамм на YPD; 2 — штамм с нокаутом гена *PPN1* на YPD; 3 — штамм с нокаутом гена *VTC4* на YPD; 4 — родительский штамм на YPEth; 5 — штамм с нокаутом гена *PPN1* на YPEth; 6 — штамм с нокаутом гена *VTC4* на YPEth.

в течение 10 мин. Уровень кислоторастворимых полифосфатов оценивали по разнице в содержании фосфата до и после указанной обработки. К осадку добавляли 800 мкл 0.5 М HClO₄ и инкубировали при перемешивании 25 мин при 100°C и осаждали при 10000 g 10 мин. Уровень кислотонерастворимых полифосфатов оценивали по количеству выделившегося фосфата.

Эксперименты проводили в трех повторностях, на рисунках представлены средние значения со среднеквадратичным отклонением, рассчитанные с помощью стандартной программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кривые роста штаммов *S. cerevisiae* приведены на рис. 1. В отличие от изученного ранее мутанта с нокаутом гена *PPN1* (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1*) (Sethuraman et al., 2001), штамм, использованный в данной работе, был способен расти на этаноле, и, более того, его рост не отличался от родительского штамма. Мутант с нокаутом гена *VTC4* демонстрировал некоторое замедление роста как на среде с глюкозой, так и на среде с этанолом.

Так как полифосфаты в митохондриях дрожжей хорошо определяются при выращивании на среде с глюкозой, мы выделили митохондрии и измерили в них АТФазную активность, содержание полифосфатов и экзополифосфатазную активность при выращивании клеток на среде YPD. Биомассу собирали в начале стационарной фазы (24 ч). Величина АТФазной активности в Е/мг белка составила 0.531 ± 0.01 у родительского штамма, 0.378 ± 0.01 у штамма с нокаутом гена *PPN1* и 0.520 ± 0.03 у штамма с нокаутом гена *VTC4*. Ингибирование активности азидом

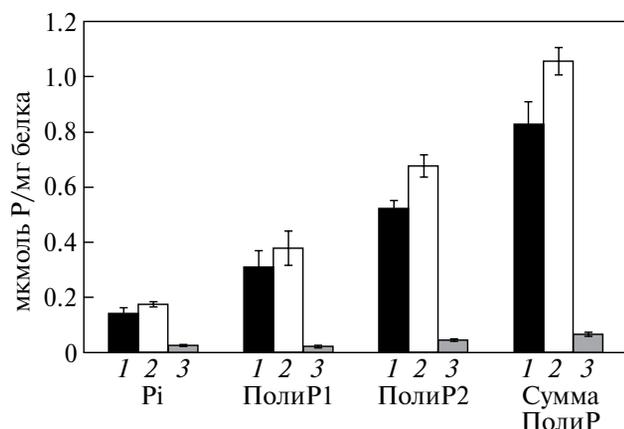


Рис. 2. Содержание полиР в митохондриях из клеток, выращенных на глюкозе, мкмоль Р/мг белка: 1 — родительский штамм; 2 — штамм с нокаутом гена *PPN1*; 3 — штамм с нокаутом гена *VTC4*.

составило 80, 81 и 78% соответственно, что говорит о достаточной чистоте препарата митохондрий.

Данные по содержанию неорганических полифосфатов в митохондриях представлены на рис. 2.

Как видно из рисунка, у штамма с нокаутом гена *VTC4* содержание полифосфатов в митохондриях снижено на порядок, что свидетельствует о том, что большая часть полиР митохондрий синтезируется полифосфатсинтетазой *Vtc4*. Ферментный комплекс, содержащий полифосфатсинтетазу, присутствует не только в вакуолярной мембране, но и в мембране эндоплазматического ретикулума (Gerasimaitė, Mayer, 2016), который имеет тесное взаимодействие с митохондриями, в том числе и посредством везикулярного транспорта (Wozny et al., 2023). По-видимому, основная часть полиР у дрожжей доставляется в митохондрии из эндоплазматического ретикулума. У штамма с нокаутом гена *PPN1* содержание полифосфатов

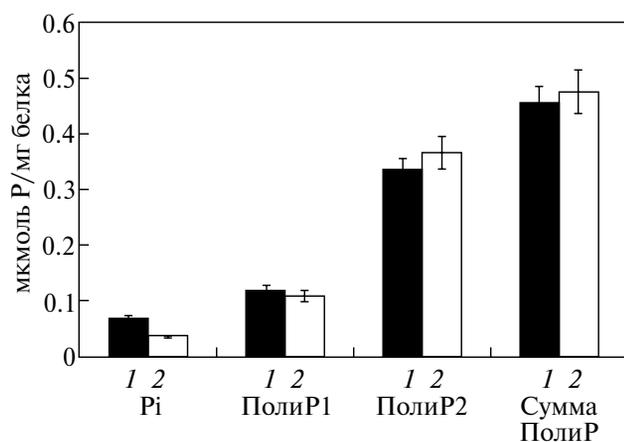


Рис. 3. Содержание полиР в митохондриях из клеток, выращенных на этаноле, мкмоль Р/мг белка: 1 — родительский штамм; 2 — штамм с нокаутом гена *PPN1*.

примерно на 30% больше, чем у родительского. Эта разница существенно менее выражена, чем у пары родительский-мутантный штамм, полученных ранее (Sethuraman et al., 2001) и исследованных в этом отношении (Pestov et al. 2005).

У штамма, изученного ранее, наблюдалось значительное снижение экзополифосфатазной активности. Чтобы проверить, воспроизводится ли этот эффект, была измерена экзополифосфатазная активности в митохондриях у родительского штамма и мутанта с нокаутом гена *PPN1*. Наличие активности удалось достоверно зафиксировать только у штамма дикого типа. Она составила 0.58 ± 0.02 Е/мг белка.

Для объяснения неспособности ранее изученного штамма с нокаутом гена *PPN1* к росту на спирте была предложена гипотеза, согласно которой снижение полифосфатазной активности приводит к неспособности клетки сократить количество полифосфатов в митохондриях при переходе с гликолиза на окислительное фосфорилирование, что, в свою очередь, приводит к нарушению снятия каталитической репрессии. Для проверки этой гипотезы мы выделили митохондрии из клеток родительского штамма и штамма с нокаутом гена *PPN1*, выращенных на спирте, и измерили в них АТФазную активность, содержание полифосфатов и экзополифосфатазную активность. Величина АТФазной активности в Е/мг белка составила 0.513 ± 0.05 у родительского штамма и 0.439 ± 0.03 у штамма с нокаутом гена *PPN1*. Ингибирование активности азидом составило 87 и 85% соответственно.

Экзополифосфатазная активность составила 0.055 ± 0.001 и 0.019 ± 0.001 Е/мг белка у родительского и мутантного штамма соответственно. Как видно, в данных условиях у обоих штаммов активность очень низкая. При этом у мутантного штамма она в 3 раза меньше, чем у родительского. Однако содержание полифосфатов (рис. 3) у штаммов одинаковое и снижено в сравнении с данными при росте на глюкозе.

Известно, что при росте на этаноле или лактате уровень полиР в митохондриях низкий (Pestov et al., 2004). Мы предполагали, что это снижение связано с гидролизом полифосфатов полифосфатазой Ppn1, которая присутствует в митохондриальной мембране (Lichko et al., 2006). Однако в данной серии мутантов отсутствие полифосфатазы Ppn1 не оказало существенного влияния на содержание полиР в митохондриях как при росте на глюкозе, так и при росте на этаноле. Вероятно, снижение содержания полиР при росте на этаноле обеспечивается либо снижением поступления их в эти органеллы, либо участием других белков в их гидролизе. Причины того, что мутант по данному гену, который был исследован ранее (Pestov et al., 2005), имел повышенное содержание полиР в митохондриях и не потреблял окисляемые субстраты, остаются неизвестными и, по-видимому, связаны с особенностями

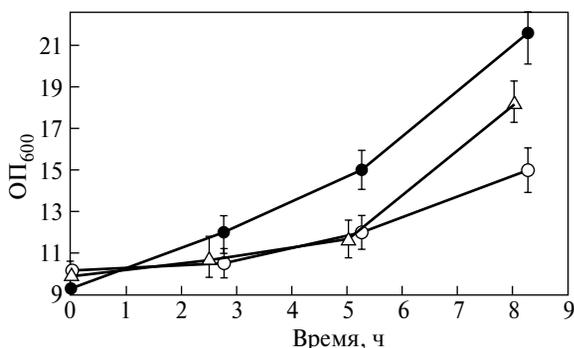


Рис. 4. Возобновление роста штаммов после пересева на среду *YPEth*: 1 — родительский штамм; 2 — штамм с нокаутом гена *PPN1*; 3 — штамм с нокаутом гена *VTC4*.

генетического конструирования мутанта, которое могло затронуть и другие гены.

Хотя кривые роста мутантных штаммов при обычном способе посева отличались незначительно (рис. 1), мы использовали условия культивирования, когда засев производится существенным количеством биомассы, что позволяет более четко наблюдать лаг-фазу роста (см. раздел Материалы и методы исследования) (рис. 4).

Как видно из рис. 4, при переходе клеток от потребления глюкозы к потреблению этанола, и, соответственно, с гликолиза на окислительное фосфорилирование, у мутанта с нарушенным синтезом полиР наблюдается значительная задержка возобновления роста по сравнению с родительским штаммом. Данное наблюдение позволяет предположить, что полиР митохондрий являются значимым фактором при переключении метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование. Поэтому их нехватка, вызванная нарушением их синтеза, приводит к увеличению длительности лаг-фазы. Однако у мутанта с нокаутом гена *PPN1* задержка возобновления роста тоже наблюдается, хоть и не столь значительная. Известно, что *Ppn1* регулирует не только количество полифосфатов, но и их длину цепи (Andreeva et al., 2015). Можно предположить, что для перехода на окислительное фосфорилирование важны полифосфаты митохондрий определенной, низкой длины цепи, образующиеся благодаря эндополифосфатазной активности *Ppn1*.

Можно заключить, что полифосфатсинтетаза *Vtc4* ответственна за синтез основной части полиР митохондрий дрожжей. *Ppn1* ответственна за всю измеряемую экзополифосфатазную активность митохондрий, однако, ее отсутствие не оказало существенного влияния на обмен полифосфатов в этих органеллах. Полученные данные не противоречат гипотезе об участии полиР митохондрий в переключении метаболизма между гликолизом и окислительным фосфорилированием.

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

- Кулаковская Т. В., Трилисенко Л. В., Личко Л. П., Вагабов В. М., Кулаев И. С. Влияние инактивации генов экзополифосфатазы *PPX1* и *PPN1* на содержание полифосфатов различных фракций у *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 35–39.
- Kulakovskaya T. V., Trilisenko L. V., Lichko L. P., Vagabov V. M., Kulaev I. S. The effect of inactivation of the exo- and endopolyphosphatase genes *PPX1* and *PPN1* on the level of different polyphosphates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 25–28.
- Abramov A., Fraley C., Diao C., Winkfein R., Colicos M., Duchon M., French R., Pavlov E. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 18091–18096.
- Andreeva N., Trilisenko L., Eldarov M., Kulakovskaya T. Polyphosphatase *PPN1* of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0119594.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119594>
- Andreeva N., Ledova L., Ryazanova L., Tomashevsky A., Kulakovskaya T., Eldarov M. Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with *Ppn1*, *Ppx1*, and *Ddp1* polyphosphatases // Biochimie. 2019. V. 163. P. 101–107.
- Azevedo C., Livermore T., Saiardi A. Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate // Molecular Cell. 2015. V. 58. P. 71–82.
- Azevedo C., Desfougères Y., Jiramongkol Y., Partington H., Trakansuebkul S., Singh J., Steck N., Jessen H. J., Saiardi A. Development of a yeast model to study the contribution of vacuolar polyphosphate metabolism to lysine polyphosphorylation // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 1439–1451.
- Baev A. Y., Angelova P. R., Abramov A. Y. Inorganic polyphosphate is produced and hydrolyzed in F_0F_1 -ATP synthase of mammalian mitochondria // Biochem. J. 2020. V. 477. P. 1515–1524.
- Boyce K. J., Kretschmer M., Kronstad J. W. The *vtc4* gene influences polyphosphate storage, morphogenesis, and virulence in the maize pathogen *Ustilago maydis* // Eucar. Cell. 2006. V. 5. P. 1399–1409.

- Denoncourt A., Downey M. Model systems for studying polyphosphate biology: a focus on microorganisms // *Curr. Genet.* 2021. V. 67. P. 331–346.
- Gerasimaitė R., Mayer A. Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles // *Biochem. Soc. Trans.* 2016. V. 44. P. 234–239.
- Gerasimaitė R., Pavlovic I., Capolicchio S., Hofer, A., Schmidt A., Jessen H. J., Mayer A. Inositol pyrophosphate specificity of the SPX-dependent polyphosphate polymerase VTC // *ACS Chem. Biol.* 2017. V. 12. P. 648–653.
- Guitart-Mampel M., Urquiza P., Carnevale Neto F., Anderson J. R., Hambarikar V., Scoma E. R., Merrihew G. E., Wang L., MacCoss M.J., Raftery D., Peffers M. J., Soleisio M. E. Mitochondrial inorganic polyphosphate (polyP) is a potent regulator of mammalian bioenergetics in SH-SY5Y cells: a proteomics and metabolomics study // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. P. 833127. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.833127>
- Hothorn M., Neumann H., Lenherr E. D., Wehner M., Rybin V., Hassa P. O., Uttenweiler A., Reinhardt M., Schmidt A., Seiler J., Ladurner A. G., Herrmann C., Scheffzek K., Mayer A. Catalytic core of a membrane-associated eucaryotic polyphosphate polymerase // *Science.* 2009. V. 324. P. 513–516.
- Kulaev I. S., Vagabov V. M., Kulakovskaya T. V. The biochemistry of inorganic polyphosphates. Chichester: Wiley, 2004.
- Kulakovskaya T. V., Andreeva N. A., Karpov A. V., Sidorov I. A. Kulaev I. S. Hydrolysis of tripolyphosphate by purified exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cytosol: kinetic model // *Biochemistry (Moscow).* 1999. V. 64. P. 1180–1184.
- Lichko L., Kulakovskaya T., Pestov N., Kulaev I. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of *PPX1* and *PPN1* genes // *Biosci. Rep.* 2006. V. 26. P. 45–54.
- Muller O., Bayer M. J., Peters C., Andersen J. S., Mann M., Mayer A. The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V(0) trans-complex formation // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 259–269.
- Muller O., Neumann H., Bayer M. J., Mayer A. Role of Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 1107–1115.
- Orell A., Navarro C. A., Rivero M., Aguilar J. S., Jerez C. A. Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions // *Extremophiles.* 2012. V. 16. P. 573–583.
- Pavlov E., Zakharian E., Bladen C., Diao C. T., Grimbley C., Reusch R. N., French R. J. A large, voltage-dependent channel, isolated from mitochondria by water-free chloroform extraction // *Biophys J.* 2005. V. 88. P. 2614–2625.
- Pestov N. A., Kulakovskaya T. V., Kulaev I. S. Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess // *FEMS Yeast Res.* 2004. V. 4. P. 643–648.
- Pestov N. A., Kulakovskaya T. V., Kulaev I. S. Effects of inactivation of the *PPN1* gene on exopolyphosphatases, inorganic polyphosphates and function of mitochondria in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2005. V. 5. P. 823–828.
- Rao N. N., Gómez-García M.R., Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival // *Ann. Rev. Biochem.* 2009. V. 78. P. 605–647.
- Sethuraman A., Rao N. N., Kornberg A. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 8542–8547.
- Solesio M. E., Xie L., McIntyre B., Ellenberger M., Mitaishvili E., Bhadra-Lobo S., Bettcher L. F., Bazil J. N., Raftery D., Jakob U. Depletion of mitochondrial inorganic polyphosphate (polyP) in mammalian cells causes metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis // *Biochem. J.* 2021. V. 478. P. 1631–1646.
- Tomashevsky A., Kulakovskaya E., Trilisenkob L., Kulakovskiy I., Kulakovskaya T., Fedorov A., Eldarov M. VTC4 polyphosphate polymerase knockout increases stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* // *Cells. Biol.* 2021. V. 10. Art. 487. <https://doi.org/10.3390/biology10060487>
- Wozny M. R., Di Luca A., Morado D. R., Picco A., Khaddaj R., Campomanes P., Ivanović L., Hoffmann P. C., Miller E. A., Vanni S., Kukulski W. In situ architecture of the ER-mitochondria encounter structure // *Nature.* 2023. V. 618. P. 188–192. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06050-3>

The Influence of Knockouts of *PPN1* Polyphosphatase and *VTC4* Polyphosphate Synthetase Genes on Growth on Ethanol and Mitochondrial Polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae*

A. A. Tomashevski^{1, *}, T. V. Kulakovskaya¹

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

*e-mail: tomashevskialexandr25@gmail.com

Received August 30, 2023; revised October 3, 2023; accepted October 3, 2023

Abstract—One of the functions of inorganic polyphosphates (polyP), as compounds with phosphoester bonds, is participation in energy metabolism. Yeast mitochondria contain their own pool of polyphosphates; however, the ways in which these polymers are involved in the functioning of mitochondria in these microorganisms are not well understood. The aim of this work was to identify the effect of knockout mutations of the *VTC4* polyphosphate synthetase gene and *PPN1* one of the polyphosphatases gene on the content of polyphosphates and polyphosphatase activity in mitochondria of *S. cerevisiae* and the characteristics of the growth of mutant strains on ethanol. It was shown that knockout of the *VTC4* gene led to a significant decrease in the content of polyP in mitochondria. Knockout of the *PPN1* gene led to the disappearance of polyphosphatase activity, but only to a slight increase in the content of polyphosphates in mitochondria during growth on glucose. When grown on ethanol, the polyP content in the mitochondria of this strain coincided with that of the parental strain, and in both strains it was approximately two times less than when grown on glucose. Both mutants are able to grow on a medium with ethanol as a carbon source; however, they are characterized by an elongation of the lag phase upon the transition from glucose consumption to ethanol consumption. It has been suggested that mitochondrial polyphosphates may represent the energy reserve of these organelles, which is necessary for the formation of full-fledged mitochondria during the transition from glycolysis to oxidative phosphorylation.

Keywords: mitochondria, polyphosphates, *PPN1*, *VTC4*, oxidative phosphorylation, *Saccharomyces cerevisiae*

УДК 574.24 + 579.26

ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДОРОДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СООБЩЕСТВА ГРИБОВ ЛИТОРАЛЬНЫХ ГРУНТОВ БЕЛОГО И БАРЕНЦЕВА МОРЕЙ

© 2024 г. А. Ю. Фадеев^a, Л. А. Гавирова^a, М. Л. Георгиева^{a, b}, В. В. Козловский^c,
У. В. Симакова^d, А. И. Шестаков^a, Е. Н. Бубнова^{a, *}

^aБиологический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

^bНаучно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, 119021, Россия

^cЦентр морских исследований Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия

^dИнститут океанологии им. П. П. Ширшова РАН, Москва, 117997, Россия

*e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

Поступила в редакцию 15.07.2023 г.

После доработки 20.09.2023 г.

Принята к публикации 21.10.2023 г.

Проведено исследование влияния углеводородного загрязнения на микобиоту грунтов литорали холодноводных Белого и Баренцева морей. Образцы отбирали в локациях, в разной степени загрязненных нефтепродуктами — от припортовых зон до относительно чистых территорий. Использование среды на дизельном топливе позволило практически во всех исследованных грунтах выявить грибы, способные к разложению углеводородов. Они представляют собой относительно малочисленную группу, в которой наиболее обильными были виды *Penicillium chrysogenum* и *P. brevicompactum*. В то же время сообщества грибов, выделяемые на среде, содержащей сахара, показывали большее разнообразие и численность, а наиболее распространенными грибами здесь были *Pseudogymnoascus pannorum*, *Penicillium chrysogenum* и *Acremonium fuci*. Важнейшими факторами, влияющими на структуру сообществ грибов, были доля углеводородов от общей массы органического углерода в случае углеводородоокисляющих, и локация — в случае сахароразрушающих. В эксперименте наибольшую активность показали представители видов *Penicillium chrysogenum* (снижение концентрации остаточных углеводородов на 77.4%), *Cadophora fastigiata* (72%) и *Tolypocladium inflatum* (67.2%).

Ключевые слова: морские грибы, углеводородное загрязнение, арктические моря, углеводород-окисляющие грибы

DOI: 10.31857/S0026365624010051

Загрязнение морских акваторий и литоральных зон нефтепродуктами — одна из распространенных проблем в современном мире (Немировская, 2013). Загрязнение углеводородами (УВ) оказывает сильное воздействие на различных гидробионтов (Андрианов и соавт., 2016), но о его влиянии на морские грибы и их сообщества сведений пока крайне мало. В основном такие исследования связаны с катастрофическими разливами нефти или нефтепродуктов в тропических и субтропических регионах (Sadaba, Sarinas, 2010; Bik et al., 2012; Bovio et al., 2017), и пока только одна подобная работа была сделана в арктических морях (Исакова и соавт., 2023). Данные о связи численности УВ-окисляющих грибов с количеством углеводородов в морской среде противоречивы. С одной стороны, было показано, что в сообществах микобиоты под влиянием загрязнения вследствие разлива большого количества

топлива заметно увеличилась доля УВ-окисляющих штаммов (Bovio et al., 2017). С другой стороны, и численность, и доля УВ-окисляющих грибов в микобиоте в целом снижались по мере увеличения количества углеводородов в грунтах и почвах литорали на участках, в разной степени подверженных постоянной антропогенной нагрузке (Исакова и соавт., 2023). Последнее неожиданно, и, с нашей точки зрения, труднообъяснимо. Метагеномные исследования трансформации сообществ про- и эукариот при нефтяном загрязнении показали, что в таких условиях грибы из минорной могут становиться преобладающей группой: их обилие увеличивается в десятки раз, хотя при этом разнообразие снижается (Bik et al., 2012). Но, в то же время, обнаружено, что после такой трансформации микобиота восстанавливается довольно быстро и через три года уже может вернуться к своему исходному состоянию,

о чем свидетельствуют увеличение как общего видового разнообразия грибов, так и доли минорных видов (Sadaba, Sarinas, 2010).

Способность (зачастую высокая) к окислению как алифатических (АУВ), так и полициклических ароматических (ПАУ) углеводов, входящих в состав нефти и нефтепродуктов, была показана для морских изолятов грибов из различных родов (Артемчук, 1981; Simister et al., 2015; Batista-García et al., 2017; Bovio et al., 2017; Barnes et al., 2018; Maamar et al., 2020; Velez et al., 2020). В качестве активных окислителей УВ указываются, например, *Aspergillus terreus* и *Fusarium solani* (Simister et al., 2015), *A. terreus* и *Penicillium citreonigrum* (Bovio et al., 2017), *P. polonicum*, *P. chrysogenum* и *P. cyclopium* (Maamar et al., 2020). В работе Р. Л. Симистера и соавт. (Simister et al., 2015) было отмечено, что грибы чаще разлагают короткоцепочечные ($<C_{18}$), нежели длинноцепочечные ($C_{19}-C_{36}$) АУВ; линейные C_{17} и C_{18} АУВ, нежели разветвленные, а среди ПАУ более подверженными разложению были низкомолекулярные соединения. Однако в других работах изученные штаммы отдавали предпочтение более длинноцепочечным ($>C_{24}$) АУВ (Bovio et al., 2017; Barnes et al., 2018).

В целом, следует отметить, что сведения, как о влиянии УВ загрязнения на сообщества грибов в морских экосистемах, так и об УВ-окисляющей способности выделяемых из этих экосистем штаммов, пока не очень многочисленны и зачастую противоречивы. Кроме того, в арктических морях было проведено пока только одно исследование влияния нефтяного загрязнения на микобиоту литорали Баренцева моря.

Цель работы состояла в изучении и сравнении влияния УВ загрязнения на микобиоту литорали Баренцева и Белого морей, а также УВ-окисляющую активность обитающих здесь грибов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов. Материалами нашего исследования послужили 30 образцов грунта средней литорали, собранных в начале августа 2020 года в 10 точках на Белом (3 в городе Кандалакша и 3 в его окрестностях; 4 в окрестностях ББС — Беломорской биостанции им. Н. А. Перцова в Кандалакшском заливе) и в 5 точках на Баренцевом море (2 в городе Мурманск и 3 — в поселке Териберка и окрестностях), по 2 образца в каждой точке (представлены далее в табл. 1). Образцы отбирали из верхних 2 см грунта, в локациях, в разной степени загрязненных углеводородами: от припортовых зон Мурманска и Кандалакши — до удаленных от крупных населенных пунктов относительно “чистых” участков в районе природного заказника (ББС) и поселка Териберка. Впоследствии для каждой точки определяли гранулометрический состав

и соленость грунта, содержание АУВ и ПАУ, а также $C_{орг}$ — массовую долю органического углерода от общей массы осадка и долю УВ от $C_{орг}$ — массовую долю углеводов от общей массы органического углерода. Первые два показателя были определены самостоятельно, остальные — в лаборатории отдела современных и древних осадков и взвеси Мирового океана Института океанологии им. П. П. Ширшова РАН (Москва, Россия).

Определение видового состава грибов. Для определения видового состава грибов в образцах использовали метод комочков на агаризованных питательных средах: сусло-агар (Malt Extract Agar — MEA: на 1 л — 2 г общего содержания сахаров, при расчете разведения исходного ячменно-солодового концентрата, ТУ 9185-020-93454900-12; 20 г соли морской для аквариумов Red Sea Salt, “RS”, Израиль; 15 г агара) и дизель-агар (Diesel Oil Agar — DOA: на 1 л — 10 мл дизельного топлива зимнего, добавляли после стерилизации; 20 г соли морской для аквариумов Red Sea Salt, “RS”, Израиль; 15 г агара). В среды добавляли антибиотик цефатоксим, 0,8 г/л. Для посевов брали по 0,1 г грунта от каждого образца на каждую среду и стерильным шпателем равномерно распределяли его по поверхности среды; инкубировали при 8°C (MEA), 8 и 25°C (DOA) в течение 4–6 недель.

По окончании инкубации выделяли чистые культуры мицелиальных грибов для идентификации. Первичную идентификацию проводили по морфолого-культуральным признакам. Для уточнения таксономического положения ряда изолятов применяли молекулярно-генетические методы. Геномную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора LumiPure from AnySample (“Lumiprobe”, Германия), согласно приложенному протоколу. Для проведения ПЦР использовали праймеры ITS1F и ITS4R (Simister et al., 2015). Секвенирование ПЦР-продукта после очистки с помощью ацетата аммония (0,125 М) и 80% спирта проводили в компании “Синтол” (Москва, Россия). Полученные хроматограммы обрабатывали в программе CodonCode Aligner. Последовательности сравнивали с GenBank (Benson et al., 2017) с помощью алгоритма BLAST (Altschul et al., 1990). Пороговое значение сходства для идентификации на видовом уровне было принято равным 99%. Синонимии и актуальное положение всех идентифицированных таксонов приводили в соответствие с данными в базе MycoID (<https://www.mycobank.org/page/>). Последовательности ITS1-5.8S-ITS2 67 изолятов депонированы в GenBank, им присвоены номера OR269188-OR269254.

Определение углеводородокисляющей активности выделенных грибов. Для определения углеводородокисляющей (УВО) активности, отобрали 11 чистых культур разных видов из числа тех, которые первично были выделены на среду DOA. Это были изоляты факультативных морских грибов: *Acrostalagmus*

luteoalbus, *Penicillium brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. glabrum*, *Tolypocladium inflatum*, *T. tundrense* из Белого моря и *Cadophora fastigiata* и *C. malorum* из Баренцева; а также — изоляты облигатных морских грибов: *Acremonium fuci* и *Paradenryphiella arenariae* из Белого и *Asteromyces cruciatus* из Баренцева морей. Культивирование проводили в трех повторностях в колбах со 100 мл модифицированной среды Чапека (на 100 мл: 1 мл дизельного топлива зимнего, добавляли в колбы после стерилизации; 0.2 г NaNO₃; 0.1 г KH₂PO₄; 0.05 г MgSO₄ · 7H₂O; 0.05 г KCl; 2 г соли морской для аквариумов Red Sea Salt, “RS”, Израиль; 0.1 мл Tween 80). В качестве контроля использовали ту же среду, без инокуляции культурами. Колбы инкубировали на орбитальном шейкере Innova 43R (“New Brunswick Scientific”, США) при температуре 8°C и 130 об./мин в течение пяти недель. Экстракцию углеводов нефти гексаном проводили в соответствии со стандартом (ГОСТ Р 52406-2005, ISO 9377-2:2000). Элюат высушивали и взвешивали на аналитических весах вместе с тарой, также взвешивали тару отдельно и высчитывали массу остаточных углеводов (ОУВ). Процент биотического вклада в убыль углеводов рассчитывали по формуле: $100 \times (M_{\text{ОУВ контроль}} - M_{\text{ОУВ образец}}) / M_{\text{ОУВ контроль}}$.

Определение видового разнообразия. Для определения видового разнообразия рассчитывали индекс Шеннона (Magurran, 1988). Для первичного

исследования связей структуры микобиоты с известными параметрами среды (Jongman et al., 1999) применяли анализ соответствий (Correspondence Analysis — CA). Расчет различий таксономического состава микобиоты географических точек проводили с использованием индекса Брея-Кёртиса (Jongman et al., 1999). На основании полученных матриц различий проводили ординацию методом неметрического многомерного шкалирования (Multidimensional Scaling — nMDS) для выявления общих тенденций в распределении сообществ (Jongman et al., 1999). Для проверки правильности группировки вариантов была проведена проверка неслучайности группировки объектов (Analysis of Similarities — ANOSIM); пороговым уровнем значимости, ниже которого группировка считалась неслучайной, принимали равным 5% (Clarke, Warwick, 2001). Были проверены объединения вариантов в следующие группы: 1) по признаку локации (Кандалакша и окрестности; ББС и окрестности; Мурманск; Териберка и окрестности); 2) по типу грунта (песок без ила; песок слабозаиленный; ил с песком); 3) по уровню солености, psu (около 5; около 15; 20–25); 4) по содержанию АУВ, мкг/г (10–30; 50–75); 5) по содержанию ПАУ, нг/г (0; 0–500; 800–5000; более 5000); 6) по содержанию C_{орг}, % (менее 0.1, 0.1–0.2, более 0.2); 7) по доле УВ от C_{орг}, % (около 1; 1.5–2.5; более 2.8). Оценку вклада отдельных видов во внутривидовое сходство и выявление индикационных видов

Таблица 1. Характеристики отобранных образцов

Показатели	Баренцево море					Белое море									
	Мурманск		Териберка			Кандалакша					ББС				
	BS-01	BS-02	BS-03	BS-04	BS-05	WS-01	WS-02	WS-03	WS-04	WS-05	WS-06	WS-07	WS-08	WS-09	WS-10
Географическое положение															
Северная широта (°)	68.99	68.99	69.16	69.17	16.17	67.07	67.03	64.15	67.13	67.12	67.13	66.55	66.55	66.55	66.54
Восточная долгота (°)	33.05	33.05	35.13	35.14	35.17	34.40	32.32	32.40	34.43	32.47	32.41	33.10	33.10	33.07	33.13
Соленость и тип грунта															
Соленость (psu)	13.3	13.1	11.9	20	23.7	13.8	13.5	6.1	5.2	12.3	10.9	22.3	23.2	23.2	24.8
Тип грунта	3	3	2	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2
Параметры углеводородного загрязнения															
АУВ (мкг/г)	53.87	70.09	50.48	15.89	12.37	16.62	23.80	27.06	16.72	17.74	27.27	11.95	30.60	16.75	15.66
ПАУ (нг/г)	121500	141200	3750	310	480	820	0	150	260	110	4680	360	0	170	0
C _{орг} (%)	0.130	0.182	0.150	0.075	0.042	0.164	0.334	0.080	0.104	0.034	0.040	0.115	0.265	0.252	0.157
Доля УВ от C _{орг} (%)	3.56	3.45	2.89	1.82	2.53	0.87	0.61	2.91	1.38	4.49	5.86	0.89	0.99	0.57	0.86
Полученные количественные характеристики микобиоты															
Число колоний	41/6	42/10	30/7	9/1	4/2	63/14	77/5	38/9	20/9	18/7	35/5	49/15	46/9	7/6	37/6
Число морфотипов	8/3	9/5	13/5	3/1	3/2	20/5	20/4	14/7	8/6	8/5	13/4	13/6	13/1	4/5	6/2
Индекс Шеннона	1.8/0.9	1.8/1.4	2.1/1.5	0.7/0	1.1/0.7	2.6/1.2	2.6/1.3	2.3/3.1	1.7/1.7	1.8/1.5	2.4/1.3	2.1/1.2	2.3/0	1.3/1.6	1.5/0.7

Примечание. Тип грунта: 1 — песок; 2 — песок слабозаиленный; 3 — ил с песком. Данные о присутствии грибов (число колоний и число морфотипов) и значениях индекса разнообразия Шеннона приводятся отдельно по разным средам (MEA/DOA).

проводили с помощью процедуры SIMPER. Для расчетов использовали программу PRIMER v6 (Clarke, Warwick, 2001).

Статистическая обработка результатов. При выделении чистых культур грибов на каждой чашке подсчитывали число колоний каждого морфотипа, в дальнейшем суммировали результаты, полученные по двум образцам в каждой точке, и вычисляли обилие каждого морфотипа в каждой географической точке как отношение числа его колоний к общему числу колоний, выраженное в процентах. Во всех дальнейших расчетах использовали этот показатель.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность выделенных грибов. Из навески одного образца массой 0.1 г выделялось 1–52 колонии на среде MEA и 0–8 колоний на среду DOA, или суммарно от 4 до 77 колоний на MEA и от 0 до 15 колоний на DOA из каждой географической точки (табл. 1). В пересчете на 1 грамм это дает десятки–сотни спор грибов. В целом, такой порядок численности характерен для грунтов холодноводных морей (Бубнова, Коновалова, 2018; Bubnova et al., 2020; Исакова и соавт., 2023), хотя в некоторых случаях численность может быть на порядок выше (Khusnullina et al., 2018). Ранее отмечалось, что чем ниже заиление, тем ниже содержание спор грибов в грунте (Bubnova et al., 2020). В данном случае также из песчаных не заиленных грунтов выделялось наименьшее число колоний грибов на обе среды. Еще одной особенностью исследованных образцов явилось то, что во всех случаях на среду DOA выделялось грибов меньше, чем на среду MEA (табл. 1). Это было ожидаемо, и мы связываем с неспособностью части грибов использовать УВ в качестве единственного источника питания, а также с возможным токсическим действием УВ на часть штаммов (Bovio et al., 2017; Maamar et al., 2020). В то же время в недавнем исследовании микобиоты побережья Баренцева моря, во многих случаях была обнаружена более высокая численность УВ-окисляющих грибов, а также увеличение их доли в сообществе при уменьшении содержания углеводов в среде (Исакова и соавт., 2023).

Общее разнообразие микобиоты. Всего из всех посево́в мы выделили представителей 88 морфотипов мицелиальных грибов, из которых 66 идентифицировали до вида по морфологическим или генетическим критериям, а оставшиеся 22 — до уровня рода, или выше по генетическим критериям (табл. 2). Обнаружены представители только двух отделов: *Mucoromycota* — 3 морфотипа и *Ascomycota* — все остальные. Наиболее многочисленными были представители классов *Sordariomycetes* (всего 235 колоний в 24 образцах), *Eurotiomycetes* (191 колония в 29 образцах) и *Leotiomycetes* (142 колоний в 18 образцах); представители класса *Dothideomycetes* были более

редкими (40 колоний в 17 образцах). Наиболее разнообразными были классы *Sordariomycetes* (46 морфотипов) и *Dothideomycetes* (18 морфотипов). Высокое обилие эврициевых обусловлено высокой представленностью рода *Penicillium*: в общей сложности 190 колоний восьми его видов были обнаружены во всех точках отбора, в 29 образцах. Также очень заметной группой был род *Acremonium*: 100 колоний десяти его морфотипов также обнаружены во всех точках, но в 21 образце. Из видов чаще других встречались *Penicillium chrysogenum* (107 колоний в 23 образцах из 14 точек), *Pseudogymnoascus pannorum* (89 колоний в 10 образцах из 9 точек) и *Acremonium fuci* (66 колоний в 15 образцах из 12 точек). Остальные морфотипы встречались реже и менее обильно, многие — единично. Подобная структура микобиоты в целом характерна для грунтов холодноводных морей. Класс *Eurotiomycetes* зачастую бывает наиболее многочисленным и/или разнообразным, именно за счет рода *Penicillium* (Бубнова, Коновалова, 2018; Khusnullina et al., 2018; Luo et al., 2020; Исакова и соавт., 2023). Большую численность и разнообразие представителей сордариевых и леоциевых, также как и дотидеевых, ранее отмечали для грунтов разных арктических морей (Khusnullina et al., 2018; Bubnova et al., 2020; Luo et al., 2020). И также во многих случаях высокое разнообразие этих групп выявлялось молекулярными методами, причем даже их использование не всегда помогало установить принадлежность исследуемых культур к каким-то видам, а только к категориям более высокого ранга (Rämä et al., 2017; Luo et al., 2020), как и в нашем случае. Большинство обнаруженных нами видов известны не только из морских, но и из наземных экосистем. Обязатно морскими являются только четыре: *Acremonium fuci*, *Asteromyces cruciatus*, *Paradendryphiella arenariae*, *P. salina*. Из этих четырех *A. cruciatus* был впервые обнаружен нами в арктических морях, а остальные довольно обычны здесь (Rämä et al., 2017). Кроме *A. cruciatus*, еще 11 видов ранее не были известны в арктических морях (табл. 2), все они выделялись небольшим числом колоний, чаще — единичными, из отдельных образцов.

Особенности комплексов грибов, выделявшихся на разные среды. Как уже было отмечено, численность грибов, выделяемых на среду DOA ниже выделяемых на среду MEA. Различия в видовом составе и структуре сообществ также существенны. В общей сложности на DOA выделились представители 44 морфотипов, из которых только 19 были уникальными для этого типа среды; на MEA выделились представители 69 морфотипов грибов, из которых 44 были уникальными; 25 морфотипов выделялись на оба варианта среды (табл. 1 и 2). Заметим, что все виды, уникальные для среды DOA и большинство видов, уникальных для MEA, выделялись единичными колониями, составляя минорный компонент сообщества. Наиболее представленными видами, с суммарным обилием выше 10%, в сообществах, выделявшихся на DOA,

Таблица 2. Таксономическое разнообразие исследованной микобиоты

MUCOROMYCOTA	
<i>Mucoromycetes</i>	<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer (3/0), <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. (8/0)
<i>Umbelopsidomycetes</i>	<i>Umbelopsis ramanniana</i> (Möller) W. Gams (3/0)
ASCOMYCOTA	
<i>Incertae sedis</i>	<i>Ascomycota</i> i.s.* (1/0), <i>Pezizomycotina</i> i.s.* (1/0)
<i>Dothideomycetes</i>	<i>Capnodiales</i> i.s.* (1/0), <i>Dydimellaceae</i> i.s. 1* (1/2), <i>Dydimellaceae</i> i.s. 2* (1/0), <i>Sympoventuriaceae</i> i.s.* (0/1) <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. (1/0), <i>A. chlamydospora</i> Mouch.* (0/1), <i>A. phragmospora</i> Emden* (0/1), <i>Alternaria</i> i.s.* (1/0), <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud (2/0), <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries (2/1), <i>C. sphaerospermum</i> Penz. (5/0), <i>Cladosporium</i> i.s. (1/0)*, <i>Juxtiphoma eupyrena</i> (Sacc.) Valenz.-Lopez, Crous, Stchigel, Guarro & Cano* (1/1), <i>Paradendryphiella arenariae</i> (Nicot) Woudenb. & Crous (11/1), <i>P. salina</i> (G. K. Sutherl.) Woudenb. & Crous (2/0), <i>Paraphoma fimeti</i> (Brunaud) Gruyter, Aveskamp & Verkley* (0/1), <i>Paraphoma</i> i.s.* (1/0), <i>Phoma</i> i.s.* (0/1)
<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx (22/0), <i>P. brevicompactum</i> Dierckx (16/16), <i>P. chrysogenum</i> Thom (73/34), <i>P. citrinum</i> Thom (6/1), <i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling (8/3), <i>P. lanosum</i> Westling (6/2), <i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom (0/2), <i>P. thomii</i> Maire (1/0), <i>Phialophora verrucosa</i> Medlar (0/1)
<i>Leotiomycetes</i>	<i>Helotiales</i> i.s.* (1/0), <i>Asteromyces cruciatus</i> C. Moreau & Moreau ex Hennebert (2/1), <i>Cadophora fastigiata</i> Lagerb. & Melin (21/2), <i>C. malorum</i> (Kidd & Beaumont) W. Gams (9/4), <i>C. luteo-olivacea</i> (J.F.H. Beyma) T. C. Harr. & McNew* (6/3), <i>Pseudeurotium hygrophilum</i> (Sogonov, W. Gams, Summerb. & Schroers) Minnis & D. L. Lindner (2/0), <i>Pseudoeurotium</i> i.s.* (0/1), <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D. L. Lindner (88/1), <i>Thelebolus</i> i.s.* (1/1)
<i>Saccharomycetes</i>	<i>Dipodascus geotrichum</i> (E. E. Butler & L. J. Petersen) Arx (2/1)
<i>Sordariomycetes</i>	<i>Sordariomycetes</i> i.s.* (1/0), <i>Hypocreales</i> i.s.* (1/0), <i>Hypocreomycetidae</i> i.s.* (1/0), <i>Sordariomycetidae</i> i.s.* (1/0) <i>Acaulium acremonium</i> (Delacr.) Sand.-Den., Guarro & Gené (3/0), <i>Acremonium alternatum</i> Link* (0/1), <i>A. byssoides</i> W. Gams & T. M. Lim (1/0), <i>A. fuci</i> Summerb., Zuccaro & W. Gams (61/5), <i>A. masseei</i> (Sacc.) W. Gams* (3/0), <i>A. murorum</i> (Corda) W. Gams (10/3), <i>A. rutilum</i> W. Gams (11/0), <i>A. sclerotigenum</i> (Moreau & R. Moreau ex Valenta) W. Gams* (1/0), <i>Acremonium</i> i.s. 1* (2/0), <i>Acremonium</i> i.s. 2 (0/1), <i>Acremonium</i> i.s. 3 (1/0), <i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (Link) Zare, W. Gams & Schroers (21/1), <i>Akanthomyces lecanii</i> (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha (2/0), <i>Cephalotrichum microsporium</i> (Sacc.) P. M. Kirk (1/0), <i>C. nanum</i> (Ehrenb.) S. Hughes (9/0), <i>C. stemonitis</i> (Pers.) Nees (1/0), <i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams (1/0), <i>Cordyceps farinosa</i> (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (1/1), <i>Cylindrocarpon</i> i.s.* (1/0), <i>Dialonectria ullevolea</i> Seifert & Gräfenhan* (1/0), <i>Emericellopsis maritima</i> Beliakova* (0/1), <i>Fusarium oxysporum</i> Shtldl. (3/0), <i>F. acuminatum</i> Ellis & Everh.* (1/1), <i>Fusarium</i> i.s. (1/2), <i>Gibellulopsis nigrescens</i> (Pethybr.) Zare, W. Gams & Summerb. (0/1), <i>Ilyonectria</i> cf. <i>destructans</i> (Zinssm.) Rossman, L. Lombard & Crous (1/0), <i>Lasionectriopsis</i> cf. <i>pteridii</i> (W. Gams & J. C. Frankland) Lechat & P.-A. Moreau (0/1), <i>Lecanicillium psalliotae</i> (Treschew) Zare & W. Gams (0/3), <i>Microdochium lycopodium</i> (Jaklitsch, Siepe & Voglmayr) Hern.-Restr. & Crous* (1/0), <i>Nectria ramulariae</i> (Wollenw.) E. Müll. (4/1), <i>Neonectria candida</i> (Ehrenb.) Rossman, L. Lombard & Crous* (0/1), <i>N. lugdunensis</i> (Sacc. & Therry) L. Lombard & Crous* (2/0), <i>Papulaspora immersa</i> Hotson (6/0), <i>Plectosphaerella cucumerina</i> (Lindf.) W. Gams* (1/0), <i>Sarocladium kiliense</i> (Grütz) Summerb. (0/1), <i>S. strictum</i> (W. Gams) Summerb. (4/1), <i>Thelonectria olida</i> (Wollenw.) P. Chaverri & Salgado* (0/2), <i>Tolypocladium cylindrosporium</i> W. Gams (7/1), <i>T. inflatum</i> W. Gams (8/8), <i>T. tundrense</i> Bissett (0/1), <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (1/0), <i>Wardomyces ovalis</i> W. Gams (23/0)

Примечание. Звездочкой (*) отмечены таксоны, верифицированные с помощью молекулярных методов; подчеркнуты таксоны, впервые обнаруженные в арктических морях; в скобках за каждым видом — число колоний, суммарно выделенных на разные среды (MEA/DOA).

были *P. chrysogenum* и *P. brevicompactum*; в сообществах, выделявшихся на МЕА — *Pseudogymnoascus pannorum*, *Penicillium chrysogenum* и *Acremonium fuci*. Индексы разнообразия Шеннона (табл. 1) для сообществ, выделявшихся на DOA, варьировали от 0 до 3.1 (среднее — 1.2); для МЕА — от 0.7 до 2.6 (среднее — 1.9). За исключением одной точки в Белом море, во всех остальных локациях индекс Шеннона был выше для сообществ, выделявшихся на МЕА, по сравнению с сообществами, выделяемыми на DOA. В целом мы можем констатировать, что сообщество грибов, выделяемое на среду с дизелем, можно рассматривать как обеднённое и реструктурированное сообщество грибов, выделяемых на среду МЕА. Анализ с помощью nMDS и проверка уровня значимости фактора использованной для выделения среды по ANOSIM, показала, что он чрезвычайно высоко значим (0.1%).

Связь структуры микобиоты с параметрами среды. Итак, исходно мы предполагали наличие 7 возможных группировок сообществ грибов в соответствии с влиянием семи различных факторов среды (локация, тип грунта, уровень солёности, содержание АУВ, ПАУ, $C_{орг}$ и доля УВ от $C_{орг}$). Проведенные анализы показали, что для сообществ грибов, выделявшихся на DOA, единственным значимым фактором была доля УВ от $C_{орг}$, а для сообществ грибов, выделявшихся на МЕА — локация; все остальные предполагаемые группировки были не достоверны (табл. 3).

Интересно, что, кроме доли УВ от $C_{орг}$ в случае DOA, другие факторы, связанные с нефтяным загрязнением (содержание АУВ и ПАУ), имеют очень слабое влияние на структуру микобиоты. Мы предполагаем, что это может быть обусловлено тем, что имеющиеся в наших образцах концентрации этих веществ не настолько высоки, чтобы оказывать существенное ингибирующее действие

Таблица 3. Уровень значимости объединения по ANOSIM для сообществ грибов, выделенных на разных средах

Фактор среды	Уровень значимости по ANOSIM, %	
	DOA*	МЕА
Локация	34	2.5**
Тип грунта	12.5	6.6
Солёность, psu	91.5	16
АУВ, мкг/г	33.8	87.3
ПАУ, нг/г	46.5	56.4
$C_{орг}$, %	39.2	32.1
Доля УВ от $C_{орг}$, %	0.3**	34.9
“Антропоген”	2.3**	0.1**

* DOA — для сообществ, выделенных на среде с дизелем; МЕА — для сообществ, выделенных на сусло-агаре.

** Ячейки с уровнем значимости ниже 5%.

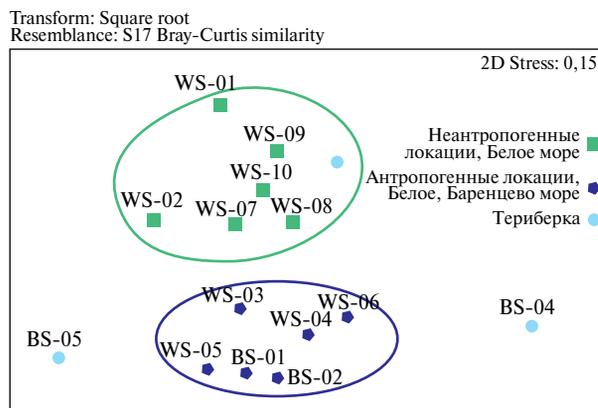


Рис. 1. Диаграмма многомерного шкалирования (nMDS) для объединенных сообществ грибов по признаку общего антропогенного воздействия (фактор “Антропоген”). WS — образцы с побережья Белого, BS — с побережья Баренцева моря.

на рост грибов, а с другой стороны, — их пищевая доступность для грибов также может не быть связана с их концентрацией в имеющихся пределах. Можно предположить, что они являются фоном, на котором сообщества грибов литорали исследованных локаций существуют постоянно. Возможно, более высокие концентрации, например, при катастрофических разливах смогут заметно повлиять на структуру микобиоты (Sadaba, Sarinas, 2010; Vik et al., 2012) за счет подавления роста одних грибов и селективного стимулирования развития других, способных к утилизации этих соединений.

В ходе проведения первичного анализа соответствия мы предположили существование еще одной группировки, отличной от исходных. Это предположение было основано на формировании на различных вариантах ординационных диаграмм двух групп точек: 1) почти все беломорские точки за пределами города Кандалакша (WS-01 и WS-02 — в окрестностях города и все точки около ББС) и одна точка в Териберке (BS-03); 2) все точки в пределах городов Мурманск (BS-01 и BS-02) и Кандалакша (точки WS-03, WS-04 и WS-06), а также одна точка за пределами Кандалакши (WS-05). При этом две точки, расположенные в Териберке на пляже (BS-04 и BS-05), везде располагаются отдельно, в разных случаях формируя или не формируя общую группу (рис. 1).

Последнее, видимо, связано с тем, что грунт в этом случае песчаный, с заметно отличающейся от остальных локаций существенно обедненной микобиотой. Мы проверили также и данную группировку с помощью nMDS и ANOSIM, предположив существование групп “антропогенные локация”, “неантропогенные локация”, “Териберка пляж”, а фактор, отвечающий за существование данных групп, мы назвали “Антропоген” (рис. 1, табл. 3). Этот фактор оказался значимым для обеих

использованных сред. На наш взгляд, объяснить существование этих двух групп и отделение двух последних локаций можно с точки зрения существования комплекса условий, состоящего из общего антропогенного воздействия крупного населенного пункта (города) и преобладающего влияния типа грунта в последнем случае. Мы не можем количественно оценить данный фактор, но его наличие свидетельствует о том, что на формирование микобиоты в исследованных нами условиях влияет не только уровень УВ загрязнения, но и какие-то неучтенные факторы. Эти факторы, скорее всего, связаны с антропогенным воздействием, загрязнением не только нефтепродуктами, а также, например, тяжелыми металлами, бытовыми и промышленными стоками. Тем не менее уровень нефтяного загрязнения, очевидно, также влияет на формирование сообществ углеводородоокисляющих грибов в исследованных условиях. Последнее подтверждается тем фактом, что средние значения индекса разнообразия для сообществ, выделяемых на среде MEA, выше для неантропогенных локаций, а на среде DOA — для антропогенных (табл. 1). Т.е., в исследованных нами антропогенных локациях возрастает разнообразие сообщества УВ-окисляющих грибов, а в неантропогенных локациях — сообществ сахароразрушающих грибов. Интересно, что ранее сообщалось о несколько другом эффекте: увеличении общего разнообразия сообществ сахаролитических и углеводородоокисляющих грибов в урбанизированных и антропогенно загрязненных районах Кольского полуострова (Исакова и соавт., 2023).

После проведенных анализов, выявления важности комплексного антропогенного воздействия и обнаружения группировки образцов по этому признаку, мы провели сравнительный анализ структуры микобиоты этих групп. С помощью процедуры SIMPER были выявлены виды грибов, определяющие объединение образцов в эти группы: “антропогенные локации” — *A. fuci*, *P. chrysogenum*, *P. arenaria*, *C. fastigiata*, *P. pannorum*, *C. malorum* и *N. ramularia*; “неантропогенные локации” — *P. chrysogenum*, *P. aurantiogriseum*, *T. inflatum*, *P. pannorum*, *A. fuci*, *P. brevicompactum*, *P. lanosum*, *A. luteoalbus*, *W. ovalis* и *A. rutilum*; “Териберка пляж” — *P. chrysogenum* и *P. brevicompactum*. Интересно, что в комплекс определяющих видов антропогенных локаций входят морские виды *A. fuci* и *P. arenaria*, а также виды рода *Cadophora*. В то время как в комплекс определяющих видов для неантропогенных локаций — *T. inflatum* и *P. pannorum* и представители рода *Penicillium* — все обильно спороносящие грибы, обычные в морях, но широко распространенные в самых разных экосистемах. Интересный и пока необъяснимый факт тяготения морских видов к антропогенным локациям. По данным для наземных почв (Марфенина, 2005), можно было ожидать обратной картины, но в данном случае, видимо, мы имеем дело с относительно

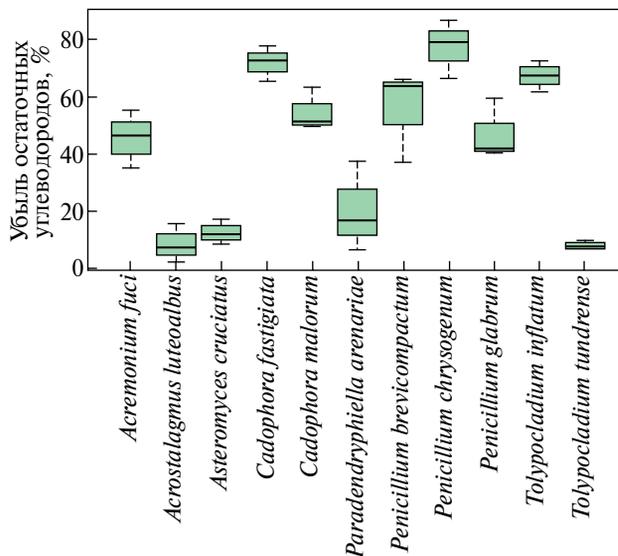


Рис. 2. Убыль остаточных углеводов при росте исследованных изолятов грибов.

невысоким уровнем загрязнения, которое оказывает скорее стимулирующее воздействие на микобиоту, чем угнетающее.

Углеводородоокисляющая способность выделенных грибов. При культивировании всех 11 изолятов, принимавших участие в данном эксперименте, была отмечена убыль УВ, хотя и выраженная в разной степени. Наиболее заметную убыль остаточных углеводов показали изоляты *Penicillium chrysogenum*, *Cadophora fastigiata* и *Tolypocladium inflatum*, у которых она составила в среднем 77.4, 72 и 67.2% УВ соответственно (рис. 2).

Согласно стандартам РФ, использованное нами дизельное топливо зимнее, представляет собой депарафинированное (то есть с уменьшенным содержанием алканов длиной $C > 18$) топливо, в котором ароматические углеводороды составляют не более 11% (ГОСТ Р 55475-2013). Исходя из этого, можно предположить, что протестированные нами изоляты обеспечивают убыль в первую очередь короткоцепочечных алифатических УВ. Для представителей рода *Penicillium* во многих работах ранее была показана высокая УВ-окисляющая активность, в том числе и преимущественно по отношению к короткоцепочечным алканам (Davies, Westlake, 1979; Barnes et al., 2018). В литературе есть сведения и о *P. chrysogenum* (Elshafie et al., 2007), и *P. brevicompactum* (Chaîneau et al., 1999). В отношении *T. inflatum*, показавшем высокую активность в нашем эксперименте, ранее было отмечено полное разложение алканов при достаточно низком общем разложении сырой нефти (Davies, Westlake, 1979). Что касается представителей рода *Cadophora*, сведений об их УВ-окисляющей способности нет, так же как и для морских грибов в нашем

эксперименте — *Acremonium fuci*, *Paradenryphiella arenariae* и *Asteromyces cruciatus*. В целом, можно отметить, что более высокую убыль углеводов показали изоляты видов, более обильно представленные в посевах на DOA, чем на MEA.

Итак, мы предприняли попытку исследования влияния углеводородного загрязнения на состав и структуру сообществ углеводородокисляющих и сахароразлагающих грибов литорали Белого и Баренцева морей. Для обеспечения последующего сравнительного анализа мы отбирали образцы в предполагаемо загрязненных локациях (портовые зоны крупных городов на Белом — Кандалакша, и Баренцевом — Мурманск, морях), и в предполагаемо чистых локациях (природный заказник ББС на Белом и окрестности поселка Териберка — на Баренцевом море). Но проведенные анализы содержания УВ показали, что абсолютно чистых локаций среди исследованных нами нет: во всех грунтах в той или иной степени содержатся углеводороды выше фоновых значений. Разница между предполагаемо чистыми и загрязненными локациями заключается только в их концентрации и составляет в большинстве случаев всего 2–4 раза. Таким образом, в исследованных районах Белого и Баренцева морей микобиота находится под влиянием относительно невысокого, но постоянного загрязнения нефтепродуктами. Более высокое содержание УВ в грунтах более загрязненных локаций, видимо, не служит заметным стрессом для грибов и не стимулирует массовое развитие УВ-разрушающей микобиоты в грунтах литорали, о чем также свидетельствует пересекающийся видовой состав грибов, при выделении на среды с дизелем и без него. Из всех рассмотренных нами параметров углеводородного загрязнения единственным значимым оказалась доля УВ в общем органическом углеводе. Из других факторов наиболее значимым был территориальный. Но на микобиоту исследованных грунтов влияют и изначально неучтенные нами параметры, которые удалось выявить статистическими методами, но не удалось идентифицировать. Исходя из полученных нами результатов, стало очевидно, что для определения пределов стрессового воздействия нефтяного загрязнения на микобиоту исследование стабильных природных и антропогенных экосистем Белого и Баренцева моря не подходит. Эти пределы можно будет определить или при катастрофических событиях (например, при авариях и разливах, как было в Онежском заливе Белого моря в 2003 году и в Мексиканском заливе в 2010 году, а также при крупной утечке, которая случилась в порте Витино в Кандалакшском заливе в 2010 году), или же в экспериментальных условиях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам аналитической лаборатории отдела современных и древних осадков и взвеси Мирового океана Института океанологии им. П. П. Ширшова РАН и руководителю лаборатории д.г.-м.н. И. А. Немировской за проведение анализов содержания углеводов в образцах и обсуждение их результатов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 20-04-00882а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреанов В. В., Лебедев А. А., Неверова Н. В., Лукин Л. Р., Воробьева Т. Я., Собко Е. И., Кобелев Е. А., Лисицына Т. Ю., Самохина Л. А., Климов С. И. Долговременные последствия аварийного разлива нефтепродуктов в южной части Онежского залива Белого моря // Биология моря. 2016. Т. 42. № 3. С. 169–178.
- Артемчук Н. Я. Микрофлора морей СССР. М.: Наука, 1981. 192 с.
- Бубнова Е. Н., Коновалова О. П. Разнообразие мицелиальных грибов в грунтах литорали и сублиторали Баренцева моря (окрестности поселка Дальние Зеленцы) // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. № 5. С. 319–327.
- Исакова Е. А., Корнейкова М. В., Мязина В. А. Численность и видовое разнообразие культивируемых микроскопических грибов побережья Баренцева моря // Микология и фитопатология. 2023. Т. 57. № 4. С. 231–246.
- Марфенина О. Е. Антропогенная экология почвенных грибов. М.: Медицина для всех, 2005. 196 с.
- Немировская И. А. Нефть в океане (загрязнение и природные потоки). М.: Научный мир, 2013. 432 с.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
- Barnes N. M., Khodse V. B., Lotlikar N. P., Meena R. M., Damare S. R. Bioremediation potential of hydrocarbon-utilizing fungi from select marine niches of India // 3Biotech. 2018. V. 8. P. 1–10.
- Batista-García R. A., Kumar V. V., Ariste A., Tovar-Herrera O. E., Savary O., Peidro-Guzman H., Gonzales-Abradelo D., Jackson S. A., Dobson A. D. W., Sanchez-Carbente M. D. R., Folch-Mallol J. L., Leduc R., Cabana H. Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents // J. Environ. Manage. 2017. V. 198. P. 1–11.
- Benson D. A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E. W. GenBank // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. Iss. D1. P. D67–D72.
- Bik H. M., Halanych K. M., Sharma J., Thomas W. K. Dramatic shifts in benthic microbial eukaryote communities following the Deepwater Horizon oil spill // PloS One. 2012. V. 7. № 6. e38550.

- Bovio E., Gnani G., Prigione V., Spina F., Denaro R., Yakimov M., Calogero R., Crisafi F., Varese G. C. The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 576. P. 310–318.
- Bubnova E. N. Fungal diversity in bottom sediments of the Kara Sea // *Botanica Marina.* V. 53. P. 595–600.
- Bubnova E. N., Grum-Grzhimailo O.A., Kozlovsky V. V. Composition and structure of the community of mycelial fungi in the bottom sediments of the White sea // *Moscow University Biol. Sci. Bull.* 2020. V. 75. № 3. P. 153–158.
- Chaineau C. H., Morel J., Dupont J., Oudot J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil // *Sci. Total Environ.* 1999. V. 227. № 2–3. P. 237–247.
- Clarke K. R., Warwick R. M. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edn. Plymouth. UK: PRIMER-E, 2001. 172 p.
- Davies J. S., Westlake D. W.S. Crude oil utilization by fungi // *Can. J. Microbiol.* 1979. V. 25. P. 146–156.
- Elshafie A., AlKindi A.Y., Al-Busaidi S., Bakheit C., Al-bahry S. N. Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman // *Marine Pollut. Bull.* 2007. V. 54. P. 1692–1696.
- Jongman R. H.G., Ter Braak C. J.F., van Tongeren O. F.R. Data analysis in community and landscape ecology. Cambridge University Press, 1995. 324 p.
- Khusnullina A. I., Bilanenko E. N., Kurakov A. V. Microscopic fungi of White Sea sediments // *Contemp. Probl. Ecol.* 2018. V. 11. P. 503–513.
- Luo Y., Luo Z. H., Pang K. L. Diversity and temperature adaptability of cultivable fungi in marine sediments from the Chukchi Sea // *Bot. Marina.* 2020. V. 63. P. 197–207.
- Maamar A., Lucchesi M. E., Debaets S., van Long N. N., Quemener M., Cotton E., Bouderbala M., Burgaud G., Matallah-Boutiba A. Highlighting the crude oil bioremediation potential of marine fungi isolated from the Port of Oran (Algeria) // *Diversity.* 2020. V. 12. P. 196–214.
- Magurran A. E. Ecological diversity and its measurement. Springer-Science and Business Media B. V., 1988. 192 p.
- Rämä T., Hassett B. T., Bubnova E. Arctic marine fungi: from filaments and flagella to operational taxonomic units and beyond // *Bot. Marina.* 2017. V. 60. P. 433–452.
- Sadaba R. B., Sarinas B. G.S. Fungal communities in bunker C oil-impacted sites off southern Guimaras, Philippines: a post-spill assessment of Solar 1 oil spill // *Bot. Marina.* 2010. V. 53. P. 565–575.
- Simister R. L., Poutasse C. M., Thurston A. M., Reeve J. L., Baker M. C., White H. K. Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches // *Mar. Pollut. Bull.* 2015. V. 100. P. 327–333.
- Velez P., Gasca-Pineda J., Riquelme M. Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons // *Mar. Environ. Res.* 2020. V. 153. P. 104816.

Effect of Hydrocarbon Pollution on the Fungal Communities of the White and Barents Sea Littoral Sediments

A. Yu. Fadeev¹, L. A. Gavirova¹, M. L. Georgieva^{1, 2}, V. V. Kozlovsky³, U. V. Simakova⁴,
A. I. Shestakov¹, and E. N. Bubnova^{1, *}

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

²Gause Institute for New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

³Marine Research Center, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

⁴Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

Received July 15, 2023; revised September 20, 2023; accepted October 21, 2023

Abstract—The effect of hydrocarbon pollution on the fungal communities of littoral sediments of the cold-water White and Barents seas was investigated. The samples were collected at locations with different levels of pollution with oil products, from ports to relatively undisturbed areas. Using the diesel fuel-containing medium resulted in detection of hydrocarbon-degrading fungi in almost all studied samples, although in all cases they were less diverse than sugar-degrading fungi. In this relatively small group, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium brevicompactum* were the most common organisms. Fungal communities isolated on a sugar-containing medium exhibited higher diversity and abundance, with being the most common sugar degraders. The major factors affecting the structure of the fungal communities were the percentage of hydrocarbons in the total mass of organic carbon in the samples in the case of hydrocarbon-degrading fungi and location, for sugar degraders. In the experiment, the highest hydrocarbon-degrading activity was shown for *Penicillium chrysogenum* (the loss of residual hydrocarbons was 77.4%), *Cadophora fastigiata* (72%), and *Tolypocladium inflatum* (67.2%).

Keywords: marine fungi, hydrocarbon pollution, Arctic seas, hydrocarbon-degrading fungi

УДК 579.22+579.266

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. Ключкина^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): $\text{NaCl} - 18.9$; $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O} - 3.7$; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} - 4.8$; $\text{CaCl}_2 - 0.8$; $\text{KCl} - 0.5$; $\text{NaHCO}_3 - 0.1$; микроэлементы — 5 мл. Раствор микроэлементов имеет следующий состав (г/5 мл): $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} - 0.148$; $\text{ZnSO}_4 - 0.011$; $\text{MnSO}_4 - 0.0014$; $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O} - 0.0148$; $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O} - 0.0064$; $\text{NiCl}_2 \times \text{H}_2\text{O} - 0.0015$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O} - 0.0016$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0.00128$; $\text{EDTA} - 0.2$;

(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. Виноградского). 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 РСоА (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.

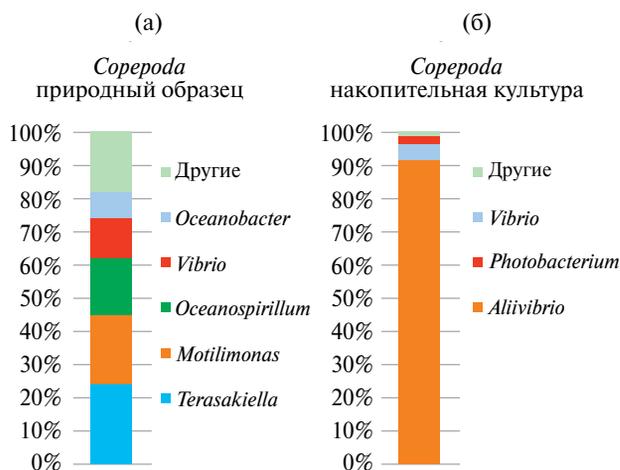


Рис. 1. Состав микробного сообщества, ассоциированного с *Copepoda* sp. CN (а) и полученной из него накопительной культуры SE, использующей хитин как единственный источник углерода и энергии (б).

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 *Pediococcus* (11%), *Pseudoxanthomonas* (6%), *Desulfovibrio* (6%). По 5% составляли бактерии, родственные некультивируемому представителю *Bacillota* BRH-c20a, а также бактерии родов *Tyzzellerella* 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	+	-	-
Наилкок (270 м)	Море	Мультикорер	Ж	+	-	-
Вода над наилком (270 м)	Море	Мультикорер	Ж	+	-	-
Прибрежная морская вода	Море	Стеклопосуда	Т	+	+	Накопительная и чистая культуры

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

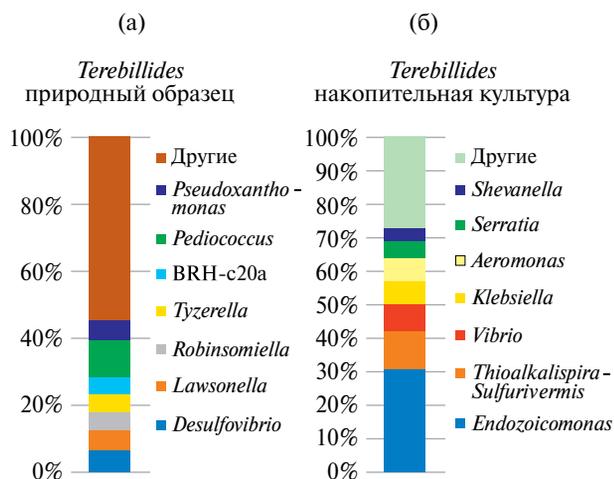


Рис. 2. Состав микробного сообщества, ассоциированного с *Terebellides* sp. TN (а), и полученной из него накопительной культуры ТЕ, использующей хитин как единственный источник углерода и энергии (б).

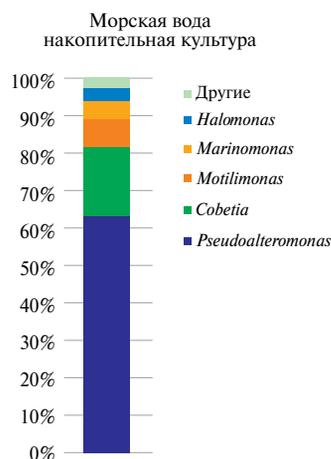


Рис. 3. Состав микробного сообщества накопительной культуры МЕ, полученной из образца воды Кандалакшского залива и использующей хитин как единственный источник углерода и энергии.

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 *Phyllococe 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 (Нуд,

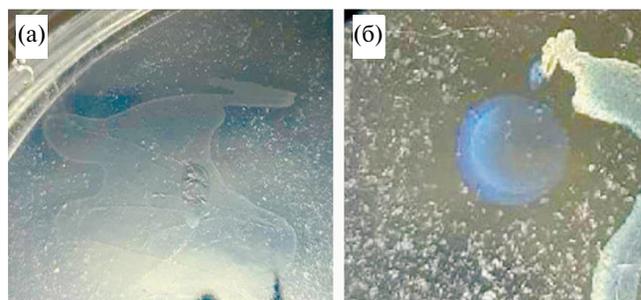


Рис. 4. Зоны гидролиза хитина на чашках Петри с чистыми культурами *Pseudoalteromonas undina* P1 (а) и *Vibrio alginolyticus* C1 (б).

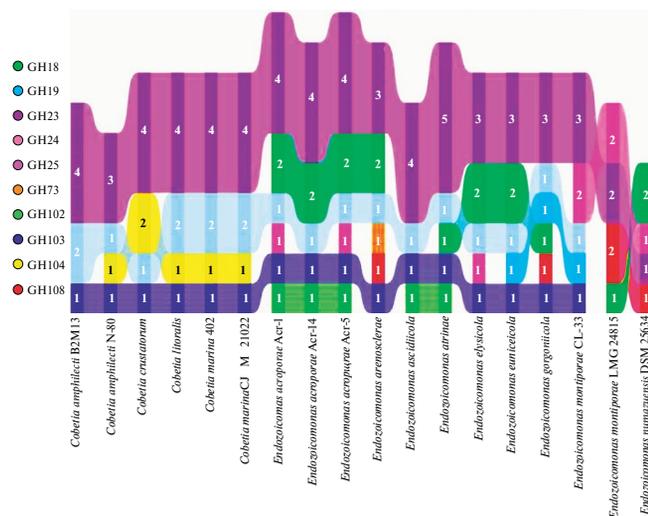


Рис. 5. Наборы предполагаемых хитиназ и пептидогликан-гидролизующих ферментов, закодированных в геномах представителей *Cobetia* и *Endozoicomonas*.

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 предположить, 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 n-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* (Нур, 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 SE, 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), *Tyzzarella* (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* содержится 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 указывает на 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 salexigenis</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}	
		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 salexigenis</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}	
	<i>Cobetia marina</i>	JCM 21022	AOM00677.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<i>Bacillus subtilis</i> 168	O31608	39.80	2.8×10^{-9}
		AOM02757.1	GH23	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	<i>Chromohalobacter salexigenis</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}	
402		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}	
		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 salexigenis</i> ATCC BAA-138	Q1QZB1	61.30	0	
<i>Cobetia littoralis</i>			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 salexigenis</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 salexigenis</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 phage T4</i> 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 phage T4</i> 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 phage T4</i> 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 phage T4</i> 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 phage T4</i> 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	Q9TIT5	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>Enterobacteria</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 CwIQ	<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>Enterobacteria</i> phage T4 Bacteriophage T4	P00720	32.30	7.4×10^{-20}
		WP_241693397.1	GH23	Bifunctional muramidase/lytic transglycosylase CwIQ	<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}
<i>Endozoicomonas euniceicola</i>		MCW7553889.1	GH19+CBM73	Endochitinase 2	<i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	P52404	34.50	1.1×10^{-31}
	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}
<i>Endozoicomonas arenosclerae</i>		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}
	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>Photobacterium laumondii</i> subsp. <i>laumondii</i> DSM 15139	Q7N7I2	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 ascidiicola</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}	
	<i>Endozoicomonas atrinae</i>	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> UCBCPP-PA14	Q02111	31	6.8×10^{-47}
			WP_066016521.1	GH18	Chitodextrinase	<i>Vibrio furnissii</i>	P96156	50	0
		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 CwIQ	<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* WPAGA1 // 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 O1 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., Choisnard 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., Vallenet 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., Aprill 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., Sonnenschein 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

УДК 579.26: 579.8.06+ 579.63

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОМИЦЕТОВ ВОЗДУШНОЙ СРЕДЫ БИБЛИОТЕК РОССИИ

© 2024 г. Т. Д. Великова^а, Е. А. Попихина^{а, *}, Е. С. Трепова^а, С. С. Хазова^а^аФедеральный центр консервации библиотечных фондов,
Российская национальная библиотека, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: fcc@nir.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 02.10.2023 г.

Принята к публикации 03.10.2023 г.

В 57 городах России, расположенных в семи федеральных округах (Северо-Западном, Центральном, Южном, Приволжском, Уральском, Сибирском, Дальневосточном), исследованы структуры сообществ микромицетов воздушной среды библиотек. Выделено и идентифицировано 107 видов микромицетов из 41 рода. Экосистема воздуха внутреннего пространства хранилищ библиотек за счет сходных в большинстве случаев условий хранения достаточно стабильна, с умеренным разнообразием и высоким уровнем выровненности видов, что подтверждается соответствующими индексами: индекс Шеннона варьировал от 2.7 до 3.4, индекс разнообразия Макинтоша — от 22.7 до 140.8, индекс Менхиника — от 2.1 до 3.0. Индекс доминирования Симпсона не превышал 0.11, а индекс Бергера-Паркера — 0.24. Значения индексов выровненности Макинтоша составили 0.71–0.78, Пие-лоу — 0.79–0.85. Установлена высокая степень сходства таксономических структур, получаемых независимо от климатических условий обследуемых регионов, что подтверждается значениями коэффициентов Стургена-Радулеску (0.08–0.77) и Мориситы-Хорна (0.04–0.47). Выявлены типичные представители изучаемой микобиоты: *Aspergillus versicolor* (7.5–14.3), *Cladosporium cladosporioides* (17.5–40.5), *S. herbarum* (0.8–53.6) и *Penicillium aurantiogriseum* (6.5–32.4). Большинство остальных видов малочисленны, с частотой встречаемости, не превышающей 7.1%.

Ключевые слова: грибы, микромицеты, аэромикота, биоразнообразие, библиотеки, письменное наследие

DOI: 10.31857/S0026365624010079

Споры плесневых грибов — одна из основных составляющих биоаэрозоля атмосферного воздуха. Присутствие значительного количества микромицетов в воздухе библиотек может представлять опасность, с одной стороны, для здоровья хранителей и читателей, а с другой — для документов, так как многие виды обладают целлюлазной и протеолитической активностью и способны повреждать библиотечные материалы.

Грибы встречаются во всех хранилищах в странах с самыми разными климатическими условиями, а их источником является наружный воздух. Условия в помещениях библиотек, архивов, музеев в целом однотипны, однако системы вентиляции и кондиционирования в здании влияют на концентрацию микроорганизмов, находящихся в воздухе.

Самый масштабный анализ аэромикоты был проведен по результатам исследований в 27 разных странах: идентифицировано 580 видов грибов, принадлежащих к 207 родам. Наиболее часто в архивах и библиотеках встречались грибы родов *Alternaria*,

Aspergillus, *Penicillium*; у *Chaetomium*, *Fusarium* и *Geotrichum* отмечена более высокая, чем обычно, частота встречаемости (Pinheiro et al., 2019). Многие грибы, выделенные из воздуха, способны разлагать целлюлозу (García et al., 2014). Представители родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotris*, *Stemphylium*, *Trichoderma* встречаются повсеместно (Zyska, 1997; García et al., 2014). Наиболее часто встречаются *Paecilomyces* (Maggi et al., 2000; Богомолова, 2012; Caicedo et al., 2023), *Candida* и *Rhodotorula* (Borrego, Perdomo, 2014), *Aureobasidium* (Попихина и соавт., 2018; Chuenko et al., 2020), *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Phoma* (Zielińska-Jankiewicz et al., 2008; Попихина и соавт., 2018), *Cephalosporium*, *Humicola*, *Phoma* (Rojas et al., 2012; Zerek, 2014; Ghosh et al., 2014), *Ulocladium* (Трепова и соавт., 2011; Великова и соавт., 2012; Лебедева, Мамаева, 2012). Наиболее распространены в воздухе и на поверхности объектов являются грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Cladosporium* (Borrego, Perdomo, 2016; Pyrri et al.,

2020), причем *Aspergillus* является доминирующим видом в тропических регионах.

В составе микробиоты, кроме повсеместно встречающихся десяти родов грибов, упомянутых выше, в воздухе также присутствуют характерные для каждой библиотеки микромицеты с высокой частотой встречаемости. Так, в мичиганских библиотеках в значительном количестве присутствовали *Arthrimum*, *Epicoccum* (Burge et al., 1978), в Колумбии — *Chrysonilia*, *Curvularia* (Caicedo et al., 2023), в индийских библиотеках, где влажность летом достигает 90%, — *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Helminthosporium*, *Sirosporium* (Ghosh et al., 2014), в библиотеке Львовского университета — *Eidamella*, *Fusidium*, *Mortierella*, *Muxotrichum* (Yavorska et al., 2016), в кубинском Национальном музее музыки — *Alternaria*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Chrysonilia* (García et al., 2014), в библиотеке Технического университета в Румынии значительно преобладали *Alternaria* и *Cladosporium* (Apetrei et al., 2009). В варшавских архивах чаще всего обнаруживали микромицеты, относящиеся к родам *Epicoccum*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*, а в библиотеке Варшавского университета — другие: *Gliomastix*, *Rhizoctonia*, *Rhodotorula*, *Stysanus* (Zielińska-Jankiewicz et al., 2008). Наряду с грибами, встречающимися в других библиотеках, из воздуха семи исторических зданий Гаваны, предназначенных для хранения документов, книг, картин, фотографий и предметов доколумбовой культуры, были выделены редкие виды, принадлежащие к родам *Bipolaris*, *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Cunninghamella*, *Monocillium*, *Pithomyces*, *Periconia*, *Staphylotrichum* (Rojas et al., 2012), а в воздухе Национального архива Кубы — другие редкие: *Beltraniella*, *Chrysosporium*, *Harposporium*, *Neurospora*, *Nigrospora*, *Scolecobasidium* (Borrego et al., 2022). В Национальной библиотеке Греции обнаружены грибы родов, не встречающихся в других библиотеках: *Acrodontium*, *Arthrimum*, *Chalastospora*, *Dichobotrys*, *Myrothecium*, *Spiniger* (Pyrgi et al., 2020), в медицинской библиотеке Ирана — рода *Syncephalastrum* (Chadeganipour et al., 2013).

Из воздуха Научной библиотеки Санкт-Петербургского университета изолированы микромицеты родов *Exophiala*, *Gilmaniella*, *Oidiodendron*, *Phaeococcomyces*, *Sphaerostilbella*, *Phialemonium**, *Pseudogymnoascus** (*таксоны даются в современной номенклатуре) (Богомолова, 2014). Большое количество родов идентифицировано в воздухе хранилищ Российской национальной библиотеки, причем некоторые были обнаружены во всех фондах: *Acremonium*, *Chrysonilia*, *Microascus*, *Oospora*, *Scopulariopsis*, *Sporotrichum*, *Torula*. Другие присутствовали только в отдельных книгохранилищах: *Chloridium*, *Hormodendrum*, *Monocillium*, *Phialophora*, *Rhinochloadium*, *Tubercularia*, *Verticillium* (Трепова и соавт., 2011; Попихина и соавт., 2018), *Aureobasidium*, *Pseudocosmospora**, *Sphaerostilbella*,

Stachylidium, *Talaromyces* (Богомолова, 2014; Великова и соавт., 2012), *Ascochyta*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Trichosporiella* (Лебедева, Мамаева, 2012). В библиотеках Польши выделены грибы родов *Acrothecium*, *Chloridium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Helminthosporium*, *Pellicularia*, *Pullularia*, *Rhizoctonia*, *Sepedonium*, *Thielavia*, *Trichocladium*, *Verticillium* (Zerek, 2014), в библиотеках институтов Киева — *Arthrotrichum*, *Chrysonilia*, *Dendryphium*, *Exophiala*, *Hormiscum*, *Mortierella* (Chuenko et al., 2020).

Пыль, являясь одним из носителей спор грибов, не только оказывает физическое воздействие на материалы документов, но также создает специфическую микросреду и трофический ресурс для самих микроорганизмов. В пыли Государственного архива в Риме в плохо проветриваемом помещении обнаружены грибы родов *Acremonium*, *Alternaria*, *Arthrimum*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Penicillium*, *Periconia*, *Pithomyces*, *Torula*, *Trichoderma* (Maggi et al., 2000), в Национальном архиве Кубы *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* (Borrego et al., 2022); в пыли около компьютеров в библиотеке технического университета в Румынии — *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Chaetomium* (Apetrei et al., 2009).

В количественном отношении преобладают грибы родов *Aspergillus* (11–48%), *Penicillium* (23–89%), *Cladosporium* и *Fusarium* (10–18%), *Rhizopus* (6%) и, в меньшем количестве, — *Alternaria* и *Trichoderma* (Rojas et al., 2012; Caicedo et al., 2023).

Среди представителей рода *Aspergillus* присутствовал всюду и часто доминировал *A. niger*. Кроме него, чаще всего встречались следующие виды: в библиотеке Мадридского музея — *A. flavus* (Rodrigo, 1974), в Национальной библиотеке Греции — *A. caespitosus*, *A. sydowii*, *A. versicolor* (Pyrgi et al., 2020), в библиотеке Мичиганского университета — *A. fumigatus* и *A. versicolor* (Burge et al., 1978), в индийских библиотеках — *A. caespitosus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* (Ghosh et al., 2014). В воздухе Российской национальной библиотеки, кроме перечисленных выше, выделены *A. clavatus*, *A. flavipes*, *A. terreus*, *A. repens* (Лебедева, Мамаева, 2012). В воздухе ереванских библиотек изолировано 16 видов из рода *Aspergillus*, в том числе *A. awamori*, *A. candidus*, *A. carbonarius*, *A. kambarensis*, *A. nidulans*, *A. restrictus*, *A. recurvatus*, *A. sulphureus*, *A. terricola* (Элоян и соавт., 2016), в итальянских архивах — *A. sydowii*, *A. japonicus*, *A. versicolor* (Maggi et al., 2000). В украинских библиотеках преобладал *A. tenuissima*, а *A. flavus* и *A. fumigatus* были редкими видами (Chuenko et al., 2020). На Кубе был обнаружен новый вид, зарегистрированный в помещениях музея, — *Aspergillus carneus* (García et al., 2014).

Род *Penicillium* чаще всего был представлен следующими видами: *P. herquei* (Ghosh et al., 2014), *P. notatum* и *P. lanosum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum* (Богомолова, 2014), *P. chermesinum*,

P. citreonigrum, *P. citrinum*, *P. coprophylum*, *P. corylophilum*, *P. digitatum*, *P. griseofulvum*, *P. italicum*, *P. lividum*, *P. miczynskii*, *P. oxalicum*, *P. puberulum*, *P. restrictum*, *P. rugulosum*, *P. viridicatum*, *P. waksmani* (Maggi et al., 2000), в Российской национальной библиотеке (РНБ) — *P. camemberti*, *P. commune*, *P. notatum*, *P. variotii*, *P. coryniferum*, *P. ochlochloron*, *P. oxalicum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. glabrum*, *P. commune* (Трепова и соавт., 2011; Великова и соавт., 2012; Попихина и соавт., 2018), доминирующим видом был *P.aurantiogriseum*, хотя в воздухе других библиотек его наличие упоминалось редко.

При микологическом анализе воздуха в библиотеках очень важно выделение грибов-продуцентов целлюлозолитических и протеолитических ферментов, так как они являются потенциальными агентами биоповреждения библиотечных материалов (Ghosh et al., 2014; Yavorska et al., 2016). В случае обнаружения грибов родов *Chaetomium*, *Trichoderma* и *Stachybotrys* необходим контроль состояния документов для предотвращения колонизации их на бумаге. Присутствие в воздухе помещений в высоких концентрациях грибов *Stachybotrys atra*, *Trichoderma viride* и *Stachybotrys chartarum* (Pinheiro et al., 2019; Pyrgi et al., 2020) неприемлемо, так как они опасны не только для ценных экспонатов, но представляют угрозу для библиотекарей, реставраторов и читателей. В качестве потенциальных возбудителей аспергиллезов и микозов, имеющих различные клинические проявления, являются виды *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. restrictus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, которые постоянно обнаруживаются в воздухе библиотек; наиболее опасными являются первые три вида.

Целью данной работы была оценка видового богатства и таксономической структуры микромицетов, изолированных из воздуха библиотек различных регионов России, и выявление комплекса микромицетов, характерных для воздуха книгохранилищ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы в воздухе книгохранилищ отбирали аспирационным методом при помощи пробоотборника MAS-100 Eco (“Merck Millipore”, Германия). Пробы воздуха отбирали на питательную среду Чапека–Докса на разных этажах библиотеки, при ярусном расположении книгохранилищ — на разных ярусах по принципу конверта: одна проба в центре, четыре — по углам помещения. Чашки Петри выдерживали в течение 5–14 сут при температуре $(29 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Выделенные из воздуха микромицеты изолировали, морфологию клеток определяли при помощи световой микроскопии и общепринятой техники микроскопирования на микроскопах Olympus VX

53 M (“Olympus Corp.”, Япония) и Leica DM 2000 (“Leica Microsystems”, Германия). Микромицеты идентифицировали на основании культурально-морфологических признаков, используя определители отечественных и зарубежных авторов (Raper et al., 1968; Raper et al., 1977; Sutton et al., 1997; Domsch et al., 2007). Наименования таксонов представлены в соответствии с электронной базой данных в области микологической номенклатуры Index Fungorum.

Наличие видов грибов в воздухе характеризовали показателем частоты встречаемости (ЧВ).

Для анализа иерархии микобиоты использованы следующие пропорции таксономических рангов: видов в семействе (В/С), родов в семействе (Р/С), видов в роде (В/Р) и видов в классе (В/К).

Микобиоты исследуемых сообществ анализировали при помощи индекса видового разнообразия Шеннона, индексов выровненности Пилоу и Макинтоша (D_{Mc}), индексов доминирования Симпсона (D) и Бергера–Паркера и разнообразия Макинтоша (U) и Менхиника.

Для анализа сходства микобиоты воздуха разных регионов между собой использовали бинарные коэффициенты видового отличия Стургена–Радулеску (p_s) и сходства Мориситы–Хорна (C_{MH}) (Леонтьев, 2008; Magurran, 2013).

В работе представлены данные по микологическому состоянию воздуха областных и региональных библиотек России 57 городов, расположенных в семи Федеральных округах (ФО):

- из восьми городов Северо-Западного (Nw);
- из 11 городов Центрального (С);
- из шести городов Южного (St);
- из 11 городов Приволжского (V);
- из Челябинска и Ханты-Мансийска, принадлежащих к Уральскому (Ur);
- из девяти городов Сибирского (Sb);
- из семи городов Дальневосточного (FE).

Состав аэромикоты в различных ФО России сравнивали с видовым составом микромицетов, выделенных из воздуха шести библиотек Санкт-Петербурга (SPb).

Статистическая обработка результатов выполнена методами многомерной статистики в программах Microsoft Excel и Statistica Ultimate Academic 13.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество проб, отобранных из воздуха хранилищ во всех регионах, составило 1409, а общее количество идентифицированных изолятов — 2221; всего выделено 107 видов микромицетов из 41 рода (табл. 1).

Таблица 1. Видовой состав микромицетов, выделенных из воздуха хранилищ России

Виды микромицетов	SPb	Nw	C	St	V	Ur	Sb	FE
<i>Acremonium charticola</i> (Lindau) W. Gams		+	+					
<i>Acremonium rutilum</i> W. Gams			+					
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.		+	+	+	+	+	+	+
<i>Alternaria consortialis</i> (Thüm.) J. W. Groves et S. Hughes		+	+	+	+		+	+
<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	+			+				
<i>Ascospirella lutea</i> (Zukal) Houbraken, Frisvad et Samson					+			
<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom et Church								+
<i>Aspergillus candidus</i> Link								+
<i>Aspergillus elegans</i> Gasperini	+							
<i>Aspergillus fischeri</i> Wehmer	+							
<i>Aspergillus flavipes</i> (Bainier et R. Sartory) Thom et Church				+				
<i>Aspergillus flavus</i> Link	+	+	+	+	+		+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.		+	+	+	+		+	
<i>Aspergillus neoniveus</i> Samson, S. W. Peterson, Frisvad et Varga			+					
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) G. Winter			+					
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.		+	+		+		+	+
<i>Aspergillus repens</i> (Corda) Sacc.		+				+		+
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> G. A. Huber			+					
<i>Aspergillus silvaticus</i> Fennell et Raper			+					
<i>Aspergillus sulphureus</i> (Fresen.) Thom et Church				+	+			
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier et Sartory) Thom et Church	+	+	+	+	+			+
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	+							
<i>Aspergillus terricola</i> Marchal et É. J. Marchal				+				
<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom et Church		+	+	+	+		+	+
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.		+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer								+
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary et Löwenthal) G. Arnaud			+		+		+	
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.			+					
<i>Bisifusarium dimerum</i> (Penz.) L. Lombard et. Crous			+					
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze		+	+	+	+	+		
<i>Cladosporium brevicompactum</i> Pidopl. et Deniak		+			+			
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link		+	+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.		+	+	+		+		+
<i>Cordyceps farinosa</i> (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha et Spatafora		+	+	+				
<i>Cosmospora butyri</i> (J.F.H. Beyma) Gräfenhan, Seifert et Schroers				+				+
<i>Didymella glomerata</i> (Corda) Qian Chen et L. Cai				+			+	
<i>Fusarium anguioides</i> Sherb.		+						
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.			+					
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.			+					+

Виды микромицетов	SPb	Nw	C	St	V	Ur	Sb	FE
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.								+
<i>Geotrichum candidum</i> Link			+	+		+	+	
<i>Hypomyces chrysospermus</i> Tul.						+		
<i>Ilyonectria radicola</i> (Gerlach et. L. Nilsson) P. Chaverri et Salgado						+		
<i>Microascus brevicaulis</i> S. P. Abbott			+		+			
<i>Monilia pruinosa</i> Cooke et Masee			+					
<i>Mucor circinelloides</i> Tiegh.				+				
<i>Mucor plumbeus</i> Bonord.		+	+	+	+		+	+
<i>Mycelia sterilia</i> c/o			+	+	+	+	+	+
<i>Mycelia sterilia</i> т/о			+	+		+		+
<i>Neurospora sitophila</i> Shear et B. O. Dodge		+	+	+	+			
<i>Oospora lutea</i> Kamyschko		+	+	+	+			+
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	+		+	+	+		+	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx		+	+	+	+	+		+
<i>Penicillium camemberti</i> Thom		+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium canescens</i> Sopp	+	+	+					
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom		+	+	+				+
<i>Penicillium commune</i> Thom		+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx		+	+					
<i>Penicillium decumbens</i> Thom			+		+			+
<i>Penicillium elegans</i> Sopp					+		+	
<i>Penicillium expansum</i> Link							+	
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling		+	+	+	+			+
<i>Penicillium granulatum</i> Bainier	+	+	+		+			
<i>Penicillium herquei</i> Bainier et Sartory			+		+			
<i>Penicillium hirsutum</i> Dierckx			+				+	
<i>Penicillium implicatum</i> Biourge			+		+			+
<i>Penicillium janczewskii</i> K. W. Zaleski					+			
<i>Penicillium jensenii</i> K. W. Zalesky	+	+		+		+		+
<i>Penicillium lanosum</i> Westling	+		+		+		+	+
<i>Penicillium miczynskii</i> K. W. Zalesky		+						+
<i>Penicillium multicolor</i> Grig.-Man. et Porad.	+							
<i>Penicillium nalgiovense</i> Laxa	+			+				
<i>Penicillium ochrochloron</i> Biourge	+	+	+		+		+	
<i>Penicillium purpureescens</i> (Sopp) Biourge		+						
<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudem.) Thom		+	+		+			+
<i>Penicillium solitum</i> Westling			+		+		+	+
<i>Penicillium spinulosum</i> Thom	+							
<i>Penicillium thomii</i> Maire			+					+
<i>Ramichloridium apiculatum</i> (J. H. Mill., Giddens et A. A. Foster) de Hoog						+		
<i>Rectifusarium ventricosum</i> (Appel et Wollenw.) L. Lombard et Crous			+					

Виды микромицетов	SPb	Nw	C	St	V	Ur	Sb	FE
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	+	+	+	+	+			+
<i>Phoma herbarum</i> Westend.			+			+		
<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb.		+	+			+		+
<i>Scopulariopsis brumptii</i> Salv.-Duval			+					
<i>Sporothrix schenckii</i> Hektoen et C. F. Perkins								+
<i>Sporotrichum verticillatum</i> Spreng.			+	+	+			+
<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb.) S. Hughes		+	+					
<i>Stemphylium botryosum</i> Wallr.			+					
<i>Taeniolella stilbospora</i> (Corda) S. Hughes			+					
<i>Talaromyces duclauxii</i> (Delacr.) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert			+					
<i>Talaromyces funiculosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert	+			+	+			
<i>Talaromyces purpleogenus</i> Samson, N. Yilmaz, Houbraken, Spierenb., Seifert, Peterson, Varga et Frisvad	+		+		+			+
<i>Talaromyces ruber</i> (Stoll) N. Yilmaz, Houbraken, Frisvad et Samson						+		
<i>Talaromyces rugulosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert	+							
<i>Talaromyces variabilis</i> (Sopp) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert	+	+	+					+
<i>Torula expansa</i> (Kunze) Pers.					+			+
<i>Torula herbarum</i> (Pers.) Link		+	+	+	+	+	+	+
<i>Torula lucifuga</i> Oudem.	+	+	+	+		+	+	
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.			+					
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai			+					
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai	+							
<i>Trichoderma viride</i> Pers.		+	+	+	+		+	+
<i>Trichosporum macrosporum</i> Kamyschko				+				
<i>Tritirachium roseum</i> J.F.H. Beyma								+
<i>Verticillium terrestre</i> (Pers.) Sacc.			+					

Состояние воздуха книгохранилищ всегда было удовлетворительным, и количество колониеобразующих единиц не превышало нормативных значений, рекомендуемых Всемирной организацией здравоохранения (500 КОЕ/м³) (WHO, 1990).

Со времен Р. Уиттекера, заложившего основу понятий разнообразия, строгих методов его количественной оценки, а также списка характерных видов до настоящего времени не выработано. Лучшим вариантом оценки биоразнообразия по-прежнему считается вычисление и обсуждение мультифрактальных спектров видовой структуры сообществ (Розенберг, 2013).

Во всех ФО отмечено умеренное видовое разнообразие: от 26 до 72 видов, индекс Шеннона варьировал от 2.7 до 3.4. Наибольшее количество видов (72) выделено из воздуха хранилищ Центрального ФО, где индекс Шеннона имел максимальное значение (3.4). Основным недостатком индекса Шеннона является то, что по сравнению с другими

индексами он придает большее значение редким видам (Одум, 1986). Полученные значения индекса разнообразия Макинтоша (U), зависящего от количества видов и образцов в выборке, подтвердили это положение и свидетельствовали о наибольшем богатстве видов в комплексе грибов, выделенных из воздуха Центрального ФО (140.8), тогда как наименьшее видовое богатство было в сообществах грибов воздуха библиотек Уральского ФО и Санкт-Петербурга: значения индекса U22.7 и 22.8 соответственно. В аэромикоте других округов видовое богатство находилось в пределах от 72.6 до 107.9.

Для нивелирования влияния различий объема выборок использовали индекс Менхиника, рассчитав который мы получили значительно меньший разброс видового богатства по сравнению с индексом разнообразия Макинтоша: от наибольшего (3.0) в воздухе библиотек Санкт-Петербурга и Уральского ФО до наименьшего

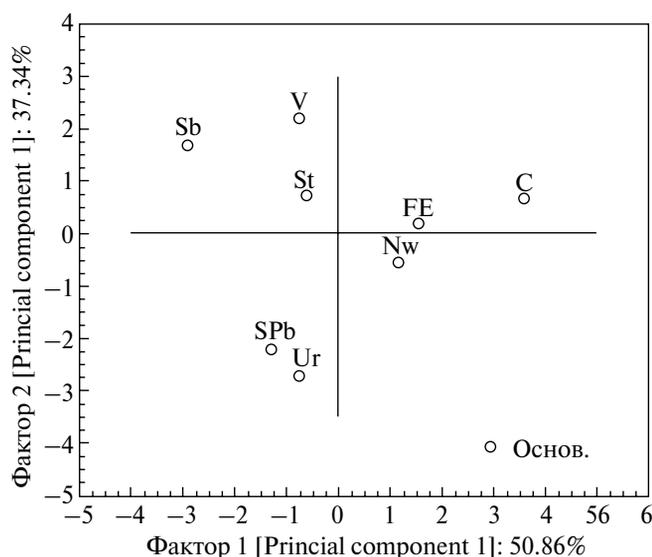


Рис. 1. Распределение разнообразия микобиот воздуха библиотек России в пространстве главных компонент.

(2.1) — в Сибирском ФО, что свидетельствует о высоком видовом богатстве в аэромикоте хранилищ во всех регионах.

В каждой выборке уровень доминирования микромицетов в воздухе хранилищ невысок, что подтверждается низкими значениями индекса доминирования Симпсона (D), не превышающими 0.1 ни в одном из округов, кроме Сибирского ФО, в котором индекс был несколько выше — 0.11. Альтернативный индекс Бергера-Паркера, который показывает степень доминирования самого обильного вида, также имел низкие значения: минимальное (0.16) в Дальневосточном ФО и максимальное (0.24) в Южном и Приволжском ФО.

Выровненность видов в воздухе хранилищ библиотек рассчитывали при помощи двух индексов, в разной степени зависящих от объема выборки. Во всех регионах она находилась на стабильно высоком уровне, о чем свидетельствуют как индекс

Пиелоу (0.79–0.85), так и индекс Макинтоша (0.71–0.78), на значения которых в значительной степени не оказали влияния ни объем выборки, ни количество выделенных видов. Таким образом, можно говорить об отсутствии конкуренции видов, выделенных из воздушной среды библиотек, в каждом комплексе микромицетов.

Ввиду множества использованных индексов разнообразия, в определенной степени ограниченности и чувствительности каждого из них, сложно комплексно оценить полученные результаты. Для того чтобы учесть влияние каждого индекса, был использован факторный анализ методом ординации главных компонент (РСА), который позволил увидеть распределение в пространстве комплексов микромицетов, изолированных из воздуха книгохранилищ в различных округах (рис. 1).

Матрица различия составлена из количества видов, индексов видового богатства, доминирования, выровненности и разнообразия (табл. 2).

Расхождение по первой оси описывает 50.9% варьирования, а по второй оси — 37.3%. На долю остальных факторов пришлось 11.8% общей дисперсии, их в анализ не включили. Аэромикоты округов четко расходятся в пространстве главных компонент и формируют три кластера. Южный и Приволжский регионы, обладающие умеренно континентальным климатом, образовали одну группу; но в то же время далеко расположены относительно регионов со схожим климатом (Центральный и Уральский ФО). Аналогично, в кластер к Дальневосточному и Северо-Западному ФО, на климат которых сильное влияние оказывают морские воздушные массы, не попали микромицеты воздуха библиотек Санкт-Петербурга. Третий кластер сформирован аэромикотами библиотек из тех регионов, климат которых сильно отличается друг от друга: Уральский ФО и СПб. Таким образом, подтверждается гипотеза о том, что географическое положение и климат региона слабо влияют на экологическое разнообразие аэромикоты внутри

Таблица 2. Экологическое разнообразие микромицетов в воздушной среде хранилищ библиотечных документов в регионах России

Параметр	SPb	St	V	C	FE	Sb	Nw	U
Общее количество изолятов (N)	73	237	347	551	388	228	323	74
Всего проб	37	146	243	372	213	155	217	26
Всего видов	26	43	45	72	50	31	43	26
Индекс разнообразия Шеннона (H)	2.70	2.98	2.89	3.40	3.12	2.76	3.08	2.77
Индекс разнообразия Макинтоша (U)	22.8	72.6	107.9	140.4	103.9	75.8	86.7	22.7
Индекс доминирования Симпсона (D)	0.09	0.09	0.09	0.06	0.07	0.11	0.07	0.08
Индекс доминирования Бергера-Паркера	0.21	0.24	0.24	0.19	0.17	0.26	0.16	0.20
Индекс видового богатства Менхиника	3.0	2.8	2.4	3.1	2.5	2.1	2.4	3.0
Индекс выровненности Макинтоша (D _{Mc})	0.78	0.74	0.73	0.78	0.77	0.71	0.77	0.78
Индекс выровненности Пиелоу (E)	0.83	0.79	0.76	0.79	0.80	0.80	0.82	0.85

хранилищ библиотек, тем более не все виды грибов, неизбежно попадающие с потоками уличного воздуха в хранилища, могут адаптироваться к достаточно специфическим условиям внутри хранилищ библиотек и сохранить свою жизнеспособность.

Индексы разнообразия характеризуют достаточно стабильную экосистему видов в воздухе внутреннего пространства хранилищ библиотек за счет сходных в большинстве случаев условий хранения: во время обследований, проводимых в летне-осенний период, температура воздуха находилась в диапазоне 20–25°C, а относительная влажность не превышала 50% (Трепова, 2011). В большинстве обследованных библиотек климатическое оборудование отсутствовало, и нормализация температурно-влажностного режима осуществлялась путем проветривания.

Отделы. Таксономическую структуру аэромикоты хранилищ документов представляют три отдела: *Ascomycota*, который занимает более 90% видового богатства и присутствует во всех регионах, *Micoromycota*, насчитывающий от 2 до 7% видового богатства и отсутствующий в Уральском ФО, и самый малочисленный отдел *Basidiomycota* — 1–4%, виды которого отсутствуют в Сибирском и Северо-Западном ФО.

При сравнении соотношения рангов иерархии микобиоты воздуха хранилищ разных ФО России (в среднем) с микобиотой библиотек СПб выявлены следующие пропорции: видов в семействе (В/С) 2.8 и 3.7, соответственно, родов в семействе (Р/С) — 1.3 и 1.4, видов в роде (В/Р) — 2.3 и 2.6, видов в классе (В/К) — 6.9 и 5.2. Соотношения таксономических рангов относительно стабильны и не меняются в зависимости от удаленности друг от друга (табл. 3).

Классы. Наиболее богатые по числу видов во всех округах России следующие классы: *Eurotiomycetes*, *Sordariomycetes* и *Dothideomycetes*. Доли видов от общего числа варьировали в широких диапазонах: в классе *Eurotiomycetes* — от 36.0 до 80.0%, *Dothideomycetes* — 12.0–36.0% и *Sordariomycetes* — 4.0–28.0%; в остальных классах видовое богатство составляло менее 7.1%. Представители большинства классов встречались повсеместно, но микромицеты из класса *Tritirachiomycetes* выделены только в Дальневосточном ФО.

При сравнении видового богатства классов в разных округах отмечены следующие особенности: наибольшее количество видов класса *Eurotiomycetes* (60.0% от общего числа видов) выделено в Приволжском и Дальневосточном ФО; *Sordariomycetes* — 28.0 и 25.4% соответственно в Уральском и Центральном ФО; класс *Dothideomycetes* — 36.0 и 25.8% соответственно в Уральском и Сибирском ФО. Видовое богатство грибов, принадлежащих к классу *Leotiomycetes*, которые встречались во всех ФО, было максимальным в Южном ФО и составляло 7.1%.

Среди микромицетов, выделенных их воздуха хранилищ Санкт-Петербурга, на класс *Eurotiomycetes* приходилось наибольшее количество видов (80.0%), причем их количество было больше, чем количество видов этого класса, выделенных в любом из округов России. В то же время виды классов *Agaricomycetes*, *Saccharomycetes* и *Tritirachiomycetes* не обнаружены в воздухе хранилищ СПб, хотя встречались в библиотеках многих регионов.

Семейства. Анализ таксономических групп воздуха хранилищ выявил четыре ведущих семейства, которые обнаружены во всех регионах России и в библиотеках Санкт-Петербурга. Подавляющим в спектре видового богатства являлось семейство *Aspergillaceae*, которое в зависимости от региона насчитывало от 36.0 до 80.0% всего видового богатства, остальные семейства были не столь многочисленны. На втором месте, но с большим отрывом, находится семейство *Cladosporiaceae*, насчитывающее от 4.0–16.0% от общего количества видов в каждом из регионов, на третьем месте — *Pleosporaceae* — 4.0–12.0%, четвертое место занимает семейство *Torulaceae*, включающее 4.0–6.5% видов, и на пятом месте — *Hypocreaceae*, которое насчитывает от 2.0 до 4.0% всего видового богатства. Все перечисленные семейства в период обследования библиотек встречались повсеместно на территории России.

Следует отметить семейства, представители которых обнаружены в воздухе хранилищ библиотек только в одном из регионов: *Mytilinidiaceae* исключительно в Центральном ФО (1.4% от общего числа видов), *Trichocomaceae* — в Приволжском ФО (2.2%).

Таблица 3. Соотношения таксономических рангов в иерархиях микобиоты воздуха хранилищ ФО России и в библиотеках СПб

Соотношение рангов	Значения таксономических пропорций в регионах							
	SPб	Nw	С	St	V	Ur	Sb	FE
Вид/Семейство	3.7	2.9	3.2	2.4	2.9	1.9	3.0	3.4
Род/Семейство	1.4	1.2	1.5	1.2	1.2	1.2	1.2	1.3
Вид/Род	2.6	2.4	2.2	2.1	2.4	1.6	2.5	2.6
Вид/Класс	5.2	8.6	10.0	5.9	7.3	4.6	5.0	6.7

Роды. За период исследования из воздуха хранилищ выявили грибы из 41 рода, в зависимости от экологической ниши их количество варьировало от 10 до 32. Максимальное количество родов зафиксировано в воздухе библиотек Центрального ФО (табл. 2).

В родовых спектрах преобладал *Penicillium*, который включал в себя 18.6–33.3% от общего числа видов, вторым ведущим родом с незначительным отставанием значений видового богатства был род *Aspergillus* — 11.5–23.5%, видовое богатство остальных родов варьировало от 0.3 до 15.4% от общего числа видов. Следует отметить, что в воздухе хранилищ библиотек Уральского ФО богатство видов рода *Cladosporium* незначительно превосходило богатство видов из рода *Aspergillus*. Отличительная особенность воздушной среды библиотек Южного ФО как по количеству видов, так и по количеству изолятов проявилась в преобладающем количестве грибов рода *Aspergillus* по сравнению с родом *Penicillium*. Это согласуется с данными о положительном действии температуры на грибы рода *Aspergillus* (Apetrei, 2009). Родовой состав аэромикоты библиотек Санкт-Петербурга имеет схожий с остальными регионами состав. Во многих библиотеках мира часто встречаются *Stachybotris* и *Stemphylium* (Великова, 2012; Garcia, 2014; Zerek, 2014; Попихина, 2018), однако в наших исследованиях редко обнаруживаются потенциально патогенные грибы *Stachybotris* (только в Центральном и Северо-Западном ФО) и *Stemphylium* (только в Центральном ФО).

Виды. Анализ видового состава микромицетов, выделенных из воздушной среды библиотек округов России и Санкт-Петербурга, путем расчета бинарного коэффициента Стугрена-Радулеску, коэффициента Мориситы-Хорна и проведения кластерного анализа позволил, с одной стороны, выявить особенности биологического разнообразия каждого отдельного исследуемого региона

и, с другой стороны, установить их сходство между собой.

Значения коэффициентов подтверждают различие видового состава микромицетов в семи исследуемых федеральных округах. Особенно высокие значения бинарного коэффициента Стугрена-Радулеску отмечены при сравнении воздуха хранилищ библиотек Санкт-Петербурга с регионами России и библиотек Уральского ФО с остальными округами (табл. 4).

Максимальное различие отмечено для двух сравниваемых пар аэромикоты книгохранилищ: Уральского ФО и Санкт-Петербурга, а также Уральского и Южного ФО, что подтверждается достаточно низкими значениями коэффициента сходства Мориситы-Хорна, который основывается не только на первичных данных о количестве видов, но также учитывает как общее количество изолятов, так и количество изолятов каждого вида в отдельности.

Во всех округах в воздухе хранилищ документов обнаружены следующие 10 видов микромицетов: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Aspergillus niger* Tiegh., *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab., *Botrytis cinerea* Pers., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.), *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, *Penicillium camemberti* Thom, *Penicillium commune* Thom и *Torula herbarum* (Pers.) Link., а во всех округах, включая библиотеки Санкт-Петербурга, — четыре вида: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides* и *Penicillium aurantiogriseum*.

Методом кластерного анализа на основании частоты встречаемости и равномерности распределения видов грибов для каждого округа сформирован комплекс, состоящий из характерных для него видов, — ядро аэромикоты (в табл. 5 эти ячейки выделены жирным шрифтом).

Таблица 4. Параметры сходства микромицетов воздуха в библиотеках России

Регионы России	SPb	St	V	C	FE	Sb	Nw	Ur	Коэффициент Стугрена-Радулеску (The Stugrena-Radulesku coefficient)
SPb		0.77	0.59	0.67	0.59	0.63	0.54	0.69	
St	0.63		0.21	0.26	0.18	0.49	0.08	0.77	
V	0.78	0.86		0.08	0.08	0.08	0.25	0.55	
C	0.73	0.87	0.88		0.17	0.32	0.13	0.52	
FE	0.47	0.28	0.61	0.61		0.39	0.14	0.47	
Sb	0.66	0.79	0.82	0.78	0.54		0.31	0.41	
Nw	0.41	0.69	0.87	0.78	0.55	0.58		0.38	
Ur	0.26	0.04	0.17	0.47	0.52	0.40	0.37		
Коэффициент Мориситы-Хорна (The Morisita-Horn coefficient)									

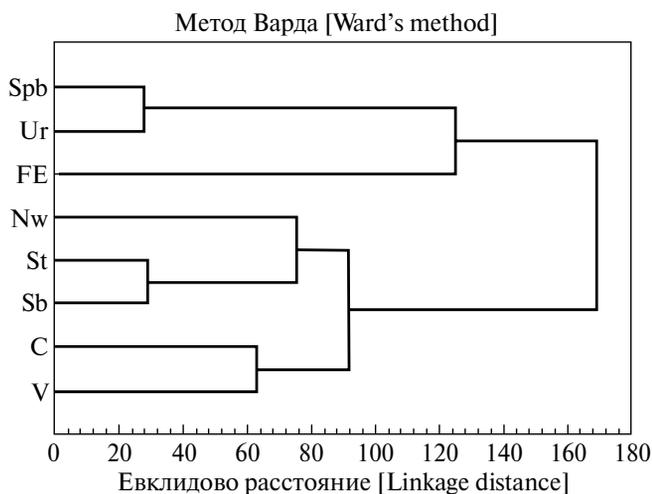


Рис. 2. Кластерный анализ сходства видового состава микромицетов, выделенных из воздуха хранилищ библиотек России.

Во всех выборках лидировали микромицеты рода *Cladosporium*: в подавляющем большинстве округов преобладал вид *C. cladosporioides*, за исключением Уральского ФО, где чаще всего встречался *C. herbarum*, являющийся редким или случайным для воздушной среды библиотек остальных округов России. Кроме микромицетов рода *Cladosporium*, в состав комплексов характерных видов регулярно входили *A. versicolor* и *P. aurantiogriseum*, причем последний имеет высокую частоту встречаемости, тогда как в аэромикоте библиотек, анализ которой представлен во

введении, *P. aurantiogriseum* упоминался только в архивах Кубы (Borrego, 2014; Borrego, 2022).

Большинство же видов в описываемых комплексах малочисленны: частота встречаемости видов, не вошедших в характерные для округов комплексы, варьировали от 1.2 до 7.1%, и в таком случае их относили к редким или, если частота встречаемости не превышала 1.2%, их рассматривали как случайные. Представители 43 видов встречались только в одном из регионов и также относились к случайным.

Таким образом, визуализация состава аэромикоты хранилищ библиотек в разных округах методом кластерного анализа показала, что даже в географически отдаленных районах видовой состав лидирующих по частоте встречаемости микромицетов однотипен и различается в основном за счет редких и случайных видов.

Распределение округов на группы по составу аэромикоты книгохранилищ, полученное методом кластерного анализа, как и распределение по ее разнообразию, полученное методом главных компонент, показывает, что климат не влияет на формирование кластеров. В данном случае получено два крупных кластера: первый — Санкт-Петербург, Уральский ФО и Дальневосточный ФО и второй — Северо-Западный ФО, Южный ФО, Сибирский ФО, Центральный ФО и Приволжский ФО (рис. 2).

Таким образом, в настоящей работе нами проведено масштабное исследование аэромикоты воздуха в библиотеках; охвачены почти все российские регионы, для каждого из которых определено ядро

Таблица 5. Представители микобиоты воздушной среды хранилищ библиотек России

Виды микромицетов	Федеральные округа России							
	SPb	NW	C	St	V	Ur	Sb	FE
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	0	2.8	10.5	19.9	4.5	10.2	7.7	4.2
<i>Aspergillus flavus</i> Link	18.9	0.9	4.6	2.7	9.1	0	5.2	2.8
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	10.8	6.5	1.6	9.6	5.3	3.6	7.7	8.5
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	0	11.1	9.4		11.9	14.3	11.0	8.5
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	2.7	5.1	4.6	2.7	0.4	10.7	1.9	3.3
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	40.5	17.5	28.5	39.9	34.2	25.0	38.1	24.4
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	0	1.4	1.3	1.4	0.8	53.6	2.6	6.6
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	0	0.46	0.81	6.2	0	7.1	0	4.7
<i>Geotrichum candidum</i> Link	0	0	6.7	0.7	0	3.6	1.9	0
<i>Neurospora sitophila</i> Shear et B. O. Dodge	0	0.5	0.8	8.2	2.1	0	0	0
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	2.7	0	0.3	2.7	3.7	0	3.2	4.2
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	32.4	23.5	11.3	9.6	13.6	3.6	6.5	6.6
<i>Penicillium camemberti</i> Thom	0	4.6	4.3	2.7	4.1	3.6	3.9	0.5
<i>Penicillium commune</i> Thom	0	18.4	8.3	10.3	10.7	14.3	3.2	12.2
<i>Talaromyces funiculosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad et Seifert	16.2	0	0	0.7	0.4	0	0	0
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	0	2.8	2.4	0.7	12.3	0	3.9	1.4
<i>Torula herbarum</i> (Pers.) Link	0	2.3	3.0	3.4	1.2	3.6	1.9	0.9

аэромикоты. Вид *C. cladosporioides* входил в ядро аэромикоты повсеместно, независимо от климатических условий, в которых находилась та или иная библиотека.

Анализ экологического разнообразия микобиоты воздушной среды замкнутых пространств, обладающих однотипными микроклиматическими условиями, на примере хранилищ библиотек позволил продемонстрировать умеренное видовое разнообразие и достаточную стабильность описываемых комплексов, установить высокую степень сходства таксономических структур и списков характерных видов, получаемых независимо от климатических условий обследуемых регионов. Микроклиматические условия, сложившиеся в книгохранилищах, и отсутствие аварийных ситуаций в активной фазе объясняют стабильность экосистемы и, как следствие, отсутствие истинно доминирующих и присутствие большой доли сопутствующих и редких видов, способных к выживанию в сложившихся условиях.

Аэромикота книгохранилищ, безусловно, оказывает влияние и в значительной мере определяет виды грибов, которые находятся на поверхности документов и являются их потенциальными биоповреждающими агентами. Микромицеты, развивающиеся на бумаге документов, в большинстве обладают целлюлазной активностью (Vorrego et al., 2008) и в дальнейшем могут представлять интерес в качестве продуцентов целлюлозолитических ферментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа по анализу аэромикоты библиотек Санкт-Петербурга выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075–15–2021–1053), работа по анализу микобиоты воздуха регионов выполнена в рамках плановой темы ФЦКБФ “Исследования документов и реставрационных материалов для решения задач разработки и совершенствования методов консервации и реставрации” (номер госрегистрации 122041800046–2). Обследования библиотек регионов России выполнены в рамках Национальной программы сохранения библиотечных фондов Российской Федерации и Основных направлений развития деятельности по сохранению библиотечных фондов в Российской Федерации на 2011–2020 годы.

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

- Богомолова Е. В.* Аэромикологическое исследование помещений Научной библиотеки им. М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета // Микроскопические грибы в воздушной среде Санкт-Петербурга. СПб.: Химиздат, 2012. С. 79–87.
- Великова Т. Д., Горяева А. Г., Попихина Е. А., Трепова Е. С.* Микромицеты воздушной среды хранилищ Российской национальной библиотеки в здании на набережной р. Фонтанки // Микроскопические грибы в воздушной среде Санкт-Петербурга. СПб.: Химиздат, 2012. С. 88–101.
- Лебедева Е. В., Мамаева Н. Ю.* Микромицеты воздушной среды книгохранилищ Главного и Нового зданий Российской национальной библиотеки // Микроскопические грибы в воздушной среде Санкт-Петербурга. СПб.: Химиздат, 2012. С. 102–115.
- Леонтьев Д. В.* Флористический анализ в микологии. Харьков, 2008. 108 с.
- Одум Ю.* Экология. М.: Мир, 1986. Т. 2. 376 с.
- Попихина Е. А., Трепова Е. С., Горяева А. Г., Хазова С. С., Мамаева Н. Ю.* Микобиота воздушной среды библиотек и документов // Успехи медицинской микологии. 2018. Т. 19. С. 47–53.
- Розенберг Г. С.* О Роберте Макинтоше, индексе разнообразия и “AMERICAN MIDLAND NATURALIST” (заметки переводчика) // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2013. Т. 2. С. 128–144.
- Трепова Е. С., Мамаева Н. Ю., Шуленкова Е. И., Горяева А. Г.* Мониторинг условий хранения документов в Российской национальной библиотеке // Труды Лаборатории консервации и реставрации документов СПФ АРАН. СПб.: Реликвия (реставрация, консервация, музеи), 2011. № 2. С. 65–72.
- Элоян И. М., Шахазизян И. В., Погосян А. В., Оганесян Е. Х., Нанаголян С. Г.* Грибы рода *Aspergillus* в воздухе различных помещений г. Еревана (Армения) // Биология, систематика и экология грибов и лишайников в природных экосистемах и агрофитоценозах: II Межд. научная конф., г. Минск — д. Каменюки, 20–23 сентября 2016 г./ Национальная академия наук Беларуси, ГНУ Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, ГПУ Национальный парк “Беловежская пуца”. Минск: Колорград, 2016. С. 310–314.
- Apetrei I. C., Drăgănescu G. E., Popescu I. T., Carp-Cărare C., Guguianu E., Mihăescu T., Ștefanache A., Crețu C., Patraș X.* Possible cause of allergy for the librarians: books manipulation and ventilation as sources of fungus spores spreading // *Aerobiologia*. 2009. V. 25. P. 159–166.
- Borrego S., Perdomo I.* Caracterización de la micobiota aérea en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba // *Rev. Iberoam. Micol.* 2014. V. 31. P. 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.004>
- Borrego S., Pons V., Perdomo I.* La contaminación microbiana del aire en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba // *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 2008. V. 39, P. 63–69.
- Borrego S., Vivar I., Molina A.* Affiliations Air- and dustborne fungi in repositories of the National Archive of the Republic of Cuba // *Microbial Cell*. 2022. V. 9. P. 103–122. <https://doi.org/10.15698/mic2022.05.776>
- Burge H. P., Boise J. R., Solomon W. R., Bandera E.* Fungi in libraries: an aerometric survey // *Mycopathologia*. 1978. V. 64. № 2. P. 67–72.
- Caicedo Y. C., Pérez H. B., Fuentes M. M., Vergara-Vásquez E., Vélez-Pereira A. M.* Assessment of fungal aerosols in a public library with natural ventilation // *Aerobiologia*. 2023. V. 39. P. 37–50. <https://doi.org/10.1007/s10453-022-09772-5>

- Chadeganipour M., Ojaghi R., Rafiei H., Afshar M., Hashemi S. T. Bio-deterioration of library materials: study of fungi threatening printed materials of libraries in Isfahan university of medical sciences in 2011 // *Jundishapur J. Microbiol.* 2013. V. 6. P. 127–131.
https://doi.org/10.5812/jjm.4751
- Chuenko A. I., Pysmenna Yu. B., Savchu Ya. I., Zatoka L. P., Kuyava L. M., Latina N. O. Microscopic fungi in the air of libraries of scientific institutions of Kyiv // *Mikrobiologichnyi Zhurnal.* 2020. V. 82. № 4. P. 63–70.
https://doi.org/10.15407/microbiolj82.04.063
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi. IHV-Verlag Echingn, 2007. 672 p.
- García J. C. R., Rosales B. R., Alonso S. F. B. Evaluación de la calidad micológica ambiental para la conservación de los fondos documentales del Museo Nacional de la Música de Cuba en época de lluvia // *AUG-MDOMUS.* 2014. № 6. P. 123–146.
- Ghosh D., Dhar P., Chakraborty T., Uddin N., Das A. K. Study of aeromycoflora in indoor and outdoor environment of National Library, Kolkata // *Int. J. Plant Anim. Environ. Sci.* 2014. V. 4. P. 663–672.
- Maggi O., Persiani A. M., Gallo F., Valenti P., Pasquariello G., Sclocchi M.-C., Scorrano M. Airborne fungal spores in dust present in archives: proposal for a detection method, new for archival materials // *Aerobiologia.* 2000. V. 16. P. 429–434.
https://doi.org/10.1023/A:1026522826477
- Magurran A. E. Measuring biological diversity. Hoboken: John Wiley et Sons, 2013. 272 p.
- Pinheiro A. C., Sequeira S. O., Macedo M. F. Fungi in archives, libraries, and museums: a review on paper conservation and human health // *Crit. Rev. Microbiol.* 2019. V. 45. P. 686–700.
https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1690420
- Pyrri I., Tripyla E., Zalachori A., Chrysopoulou M. Fungal contaminants of indoor air in the National Library of Greece // *Aerobiologia.* 2020. V. 36. P. 387–400.
https://doi.org/10.1007/s10453-020-09640-0
- Raper K. B., Fennel D. I. The genus *Aspergillus*. New York: Robert E. Krieger Publishing Company, 1977. 686 p.
- Raper K. B., Thom C. A manual of the Penicillia. New York: Hafner Publishing Company, 1968. 875 p.
- Rodrigo V. N. Contaminación microbiológica en museos, archivos y bibliotecas // *Revista de archivos, bibliotecas y museos,* 1974. V. 77. P. 747–761.
- Rojas T. I., Aira M. J., Batista A., Cruz I. L., González S. Fungal biodeterioration in historic buildings of Havana (Cuba) // *Grana.* 2012. V. 51. P. 44–51.
- Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M. Guide to clinically significant fungi. Baltimore: Williams et Wilkins, 1997. 471 p.
- WHO. Indoor air quality: biological contaminants. Report on a WHO meeting // Copenhagen: WHO Regional publications. 1990. № 31. P. 1–67.
- Zerek B. F. The Preservation and Protection of Library Collections. A practical guide to microbiological control. Chandos Publishing, 2014. 227 p.
- Zielińska-Jankiewicz K., Kozajda A., Piotrowska M., Szadkowska-Stańczyk I. Microbiological contamination with moulds in work environment in libraries and archive storage facilities // *Ann. Agric. Environ. Med.* 2008. V. 15. P. 71–78.
- Zyska B. Fungi isolated from library materials: a review of the literature // *Int. Biodeter. Biodegr.* 1997. V. 40. P. 43–51.
https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00061-9
- Yavorska G. V., Bilinska I. S., Hnatush S. O., Os'mak G. S. Microbiological expertise of indoor air and books of scientific library of Ivan Franko national university of Lviv // *Studia Biologica.* 2016. V. 10. P. 75–88.
https://doi.org/10.30970/sbi.1001.447

Ecological Diversity of Micromycetes in Aerial Environments of Russian Libraries

T. D. Velikova^{1, *}, E. A. Popikhina¹, E. S. Trepova^{1, **}, and S. S. Khazova¹

¹Federal Center for Library Stock Preservation, National Library of Russia, St.-Petersburg, 191069 Russia

*e-mail: fcc@nir.ru

**e-mail: k.trepova@gmail.com

Received 07 July, 2023; revised 02 October 2024; accepted 03 October 2024

Abstract—The structure of micromycete communities in the library aerial environment was investigated in 57 Russian cities located in seven federal districts (Northwestern, Central, Southern, Volga, Ural, Siberian, and Far Eastern). A total of 107 micromycete species belonging to 41 genera were isolated and identified. Due to mostly similar conditions, the aerial ecosystem of internal spaces of the library storage facilities was relatively stable, with moderate diversity and high evenness, as was confirmed by the relevant indices: the Shannon index varied from 2.7 to 3.4, the McIntosh diversity index, from 22.7 to 140.8, and the Menhinick index, from 2.1 to 3.0. The Simpson's dominance index and the Berger–Parker index did not exceed 0.11 and 0.24, respectively. The McIntosh and Pielou's evenness indices were 0.71–0.78 and 0.79–0.85, respectively. High similarity of the taxonomic structures, independent of climatic conditions of the studied regions, was revealed, as was confirmed by the values of the Stugren–Radulescu and Morisita–Horn coefficients: 0.08–0.77 and 0.04–0.47, respectively. The typical members of the studied mycobiota were *Aspergillus versicolor* (7.5–14.3), *Cladosporium cladosporioides* (17.5–40.5), *C. herbarum* (0.8–53.6), and *Penicillium aurantiogriseum* (6.5–32.4). Most other species were scarce, with frequencies of occurrence not exceeding 7.1%.

Keywords: fungi, micromycetes, aeromycota, biodiversity, libraries, written heritage

УДК 579.22

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГЛИНИСТЫХ ОРГАНОГЕННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПЕЩЕРЫ МРАМОРНАЯ (ПРИМОРСКИЙ КРАЙ)

© 2024 г. Д. А. Русакова^{a, b}, М. Л. Сидоренко^{a, *}, А. В. Ким^{a, b}^aФНЦ Биоразнообразия наземной биоты восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, 690022, Россия^bДальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690922, Россия

*e-mail: sidorenko@biooil.ru

Поступила в редакцию 31.07.2023 г.

После доработки 30.09.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Исследовано культивируемое сообщество бактерий рода *Pseudomonas* в глинистых органогенных отложениях пещеры Мраморная (Приморский край). Выделенные в данной работе штаммы бактерий являются эвритермными и психротолерантными. Их таксономическая принадлежность установлена путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК. Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* представляют все экологические ниши Земли и, соответственно, обладают широким спектром адаптивных функций. Методами микроскопии установлена смена характера подвижности и устойчивость размера клеток при изменении температур культивирования бактерий. Исследуемые штаммы представляют научный и практический интерес, благодаря проявлению ферментативной активности к нескольким субстратам одновременно при разных температурах (25 и 4°C), а также способности выделять холодоактивную пектиназу, протеазу и липазу. Выделенные штаммы отличались высокой фосфат-солюбилизирующей активностью как при 4°C, так и при 25°C. Пещера Мраморная является карстовой и характеризуется карбонатным карстом, что обосновывает предпочтение для исследуемых штаммов в фосфате кальция. Анализ данных показывает, что в полученной нами коллекции культивируемых бактерий рода *Pseudomonas* представлены как типичные психротолерантные, проявляющие ферментативную активность в условиях оптимальной температуры роста, так и уникальные, способные синтезировать широкий спектр ферментов в условиях, отличных от температурного оптимума для роста.

Ключевые слова: пещера Мраморная, психротолерантные и эвритермные бактерии рода *Pseudomonas*, ферментативная активность

DOI: 10.31857/S0026365624010086

Пещеры являются специфической экосистемой: они обладают уникальным микроклиматом за счет отсутствия света, характеризуются постоянно низкой температурой (3–4°C), высокой влажностью (до 100%) и недостатком органического вещества. Чтобы преодолеть факторы, ограничивающие рост, микроорганизмы вынуждены адаптироваться, создавая сложные, мутуалистические сети или конкуренцию. По этой причине пещерные микроорганизмы обладают специфичными вторичными метаболитами, которые потенциально могут быть использованы в различных сферах человеческой жизни (Lopes da Silva et al., 2019). Исследования с применением различных (культуральных, молекулярных) методов показывают, что *Proteobacteria* составляют значительную часть общего микробного разнообразия в пещерах. На уровне рода наиболее многочисленными являются роды *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Caulobacter* и *Bosea*. Однако их

численность и биоразнообразие зависят от эволюционной зрелости микробного сообщества, текущего уровня поступления чужеродных органических веществ и притока аллохтонной микрофлоры (Кузьмина и соавт., 2012; Jaroszewicz et al., 2021; Zhu et al., 2021; Kosznik-Kwaanicka et al., 2022).

В Приморском крае описано около 90 доступных для человека пещер длиной более 20 м каждая. Наиболее многочисленными являются карстовые пещеры. Их образование, как следует из названия, связано с карстом — процессом растворения и выщелачивания горных пород водой. В Хасанском районе Приморского края в настоящее время известно более 10 пещер Барабашской свиты, приуроченных к выходам верхнепермских известняков. Одной из них является малоизученная пещера Мраморная, которая представляет интерес как пещерная экосистема, не испытывающая антропогенной нагрузки (Берсенева, 1990; 2017).

В последнее время наблюдается интерес к микробиому пещер, так как выделенные из этих мест обитания микроорганизмы обладают интересными свойствами, которые могут быть применимы в биотехнологической, медицинской и экологической отрасли (Ghosh et al., 2017; Jaroszewicz et al., 2021). Например, *Pseudomonas frederiksbergensis* RRC23 и *Rhodococcus* sp. RRC75, выделенные из пещеры Raspberry Rising (Канада), проявляли антимикробное действие против *Escherichia coli* 15–318 с множественной лекарственной устойчивостью (Ghosh et al., 2020). Штамм *Bacillus subtilis* CV16, выделенный из пещеры в восточной части Амазонки (Бразилия) имеет потенциал применения в цементирующих материалах, благодаря способности осаждать CaCO_3 в виде кристаллов кальцита (Nicole et al., 2022). *Pseudomonas* sp. IB-K 13–1A, выделенный из пещеры Киндерлинской (Россия), обладал высокой способностью растворять различные соединения фосфора и производить ростостимулирующие соединения — ауксины (Кузьмина и соавт., 2015).

В связи с этим целью работы стало изучение физиологических и биохимических свойств бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из образцов глинистых органогенных отложений карстовой пещеры Мраморная (Приморский край).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика объекта исследования. В качестве объекта исследования использовали штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, выделенные из образцов глинистых органогенных отложений карстовой пещеры Мраморная (Приморский край). Пещера Мраморная (Хасанский район, Приморский край) расположена в верховье реки Амба в 30 км к северо-западу от села Занадворовка (43.34456° N, 131.39599° E). Она находится у подножья сопки рядом с рекой Амба, имеет горизонтальный вход и вертикальный выход, обильно заполнена такими породами, как известняк и мрамор. Пещера является затапливаемой, за счет близкого расположения с рекой и вертикально расположенных отверстий в пещере, это подтверждает наличие костных останков лягушек и песчаного слоя в грунте.

Отбор проб проводили в весенний период времени (27.04.2021 г.) в стерильную герметичную емкость. Образцы почвы отбирали стерильными инструментами и помещали в стерильную посуду. Точечные пробы отбирали на пробной площадке из одного слоя методом конверта, с таким расчетом, чтобы каждая проба представляла собой часть почвы. Объединенную пробу составляли путем смешивания 5 точечных проб, отобранных на одной пробной площадке, массой от 200 до 250 г каждая, отобранных с глубины 5–10 см. До начала работы

образцы хранились в холодильнике при температуре от 4 до 5°C.

Для выделения и культивирования бактерий использовали питательную среду ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболонск). Почвы обрабатывали стандартным методом посева аликвот из серийных разведений суспензии на поверхность питательной среды. Чашки с посевным материалом инкубировали при температуре 4°C, близкой к климатическим условиям пещеры.

Микроскопирование. Морфологию клеток бактерий исследовали в мазках, окрашенных по Граму, с помощью микроскопа Carl Zeiss Axioskop 40 (Германия) на объективах 40× и 100× с применением иммерсионной системы в режиме фазового контраста. Подвижность бактерий наблюдали в препарате “раздавленная капля” (Нетрусов и соавт., 2005).

Определение температурного оптимума. Оптимальную температуру роста выделенных штаммов определяли при температурах культивирования 4, 10, 15, 25, 30 и 37°C на среде с ГРМ-бульоном (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболонск). Концентрацию бактериальной массы измеряли методом прямого подсчета клеток в камере Горяева, далее фиксировали изменение концентрации на 3, 6, 8 и 10-е сутки при помощи цифрового фотоэлектроколориметра APPL AP-101 (Япония). Концентрацию биомассы C (КОЕ/мл) высчитывали по формуле для построения кривых роста:

$$C = \left(a \frac{4000b}{c} \right) \times 1000 \quad (1)$$

где a — сумма клеток, подсчитанная в 5 (или 10) больших квадратах сетки; b — разведение исходного субстрата; c — число малых квадратов, в которых производился подсчет.

Удельную скорость роста штамма определяли по формуле:

$$\mu = 2.3 \frac{(\ln \frac{x}{x^0})}{t} \quad (2)$$

где μ — удельная скорость роста микроорганизмов (ч^{-1}); x^0 и x — начальная и конечная концентрация микробных клеток (КОЕ/см³); t — время культивирования микроорганизмов (ч) (Фирсова, 2019).

Выявление ферментативных свойств. Для детальной характеристики особенностей метаболизма исследуемых бактерий, выявления у них внеклеточных ферментов (протеазы, пектиназы и липазы) и способности растворять труднорастворимые соединения фосфора применяли диско-диффузионный метод. Бумажные диски диаметром 5 мм пропитывали бактериальной суспензией, накладывали на поверхности агаризованных сред, содержащих в качестве источника питания один из субстратов. Ферментативную активность оценивали по зоне гало вокруг колоний бактерий (зоны гидролиза для оценки протеолитической активности, зоны помутнения при определении липолитической

активности и зоны просветления при определении пектиназной активности). Результаты учитывали в мм. Скрининг ферментативной активности проводили при температуре инкубирования 4 и 25°C.

Для определения протеолитической активности применяли молочный агар Эйкмана (г/л): CaCO₃—1.0; K₂HPO₄—0.2; пептон — 5.0; дрожжевой экстракт — 5.0; агар — 30.0; молоко обезжиренное — 5.0 (Нетрусов и соавт., 2005).

Для определения пектиназной активности применяли питательную среду с содержанием пектина (г/л): пектин — 5.0; триптон — 5.0; дрожжевой экстракт — 5.0; NaCl — 5.0; агар — 15.0 (Roy K et al., 2018).

Для определения липазной активности применяли среду следующего состава (г/л): триптон — 10.0; дрожжевой экстракт — 5.0; агар — 20.0; отдельно добавляли стерильный липидный гомогенизат (теплая дистиллированная вода — 400 мл; оливковое масло — 100 мл; Твин 80—1 мл) в объеме 30 мл на 1 л среды (Нетрусов и соавт., 2005).

Тест на способность мобилизовать неорганический фосфат проводили на среде Пиковской (г/л): глюкоза — 20.0; NaCl — 0.2; CaPO₄—5.0; MgSO₄ · 7H₂O — 0.1; MnSO₄ · 7H₂O — следы; FeSO₄ · 7H₂O— следы; агар — 20.0 (Кадырова и соавт., 2022).

Определение гликолитической активности осуществляли на дифференциально-диагностических средах Гисса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболонск). В качестве углеводных субстратов использовали глюкозу, лактозу, сахарозу, манит, сорбит, дульцит, мальтозу, арабинозу, инозит, ксилозу, рамнозу и фруктозу. Результаты учитывали по способности бактерий утилизировать сахара с образованием кислоты, что приводит к изменению цвета среды.

Молекулярно-генетическая идентификация бактерий и филогенетический анализ. Геномную ДНК из культур бактерий выделяли с помощью коммерческого набора НК-сорбент Base (“Литех”, Россия), согласно протоколу производителя. Анализ фрагмента гена 16S рРНК проводили с использованием набора реагентов БиоМастер HS-*Taq* ПЦР-Color (2×) (“Биолабмикс”, Россия) и универсальных бактериальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3') и 1350R (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'). Амплификацию осуществляли на приборе T100 Thermal Cycler (“BioRad”, США) в следующем режиме: 94°C — 4 мин (1 цикл); 94°C — 60 с, 48°C — 60 с, 72°C — 90 с (5 циклов); 92°C — 60 с, 50°C — 110 с, 72°C — 90 с (10 циклов); 92°C — 60 с, 52°C — 60 с, 72°C — 60 с (10 циклов); 92°C — 60 с, 54°C — 60 с, 72°C — 110 с (10 циклов); 72°C — 10 мин (1 цикл). Продукты ПЦР разделяли в электрофорезной камере (при напряженности поля около 2 В/см) в 1% агарозном геле с добавлением этидиум бромид;

результаты учитывали на трансиллюминаторе под ультрафиолетовым излучением. Для очистки продуктов амплификации от остатков реакционной смеси использовали набор ExoSAP-IT Express (“Thermo FS”, США).

Полученные ПЦР-продукты секвенировали по методу Сэнгера, используя набор реактивов Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (“Thermo FS”, США) для подготовки нуклеотидных последовательностей к прочтению на генетическом анализаторе Нанофор 05 (“Синтол”, Россия). Секвенирование проводили на базе лаборатории морской микробиологии ИМО ДВФУ. Филогенетический анализ осуществляли путем поиска гомологичных последовательностей в международном банке данных (GenBank) с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование последовательностей выполнено в редакторе BioEdit; для выравнивания последовательностей использовали алгоритм программы CLUSTAL W (<http://www.genebee.msu.ru/clustal>). Филогенетическое дерево построено с использованием метода ближайших соседей (neighbor-joining) на основе алгоритма Kimura two-parameters в программе MEGA 11 (Kumar et al., 2016). Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании bootstrap — анализа 100 альтернативных деревьев.

В работе использовали научное оборудование Центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” на базе ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Статистическая обработка результатов. Выполняли не менее трех независимых экспериментов, как минимум в двух повторностях. Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) (при уровне значимости $p \leq 0.05$), вычисляли статистику центра (медиану) и статистику диапазона (квартиль). Выбранные значения изображали на диаграмме размаха с применением программы Statistica 13 и Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии рода *Pseudomonas* описаны давно (Palleroni et al., 1973). Как правило, они встречаются повсеместно в почве (Lujan et al., 2015), воде (Majorina et al., 2022) и ризосфере некоторых растений (Molina et al., 2020). Описано также их присутствие в карстовых пещерах разных регионов мира — Лешу (Румыния) (Bogdan et al., 2023), Каповой (Россия) (Галимзянова и соавт., 2020), Майорке (Испания) (Busquets et al., 2021) и в неэксплуатируемых пещерах природного заповедника Куанкуошуй, Цзуньюн, провинции Гуйчжоу (Китай) (Zhu et al., 2021). Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* широко используются в хозяйственной практике для производства антибиотиков, извлечения остаточной

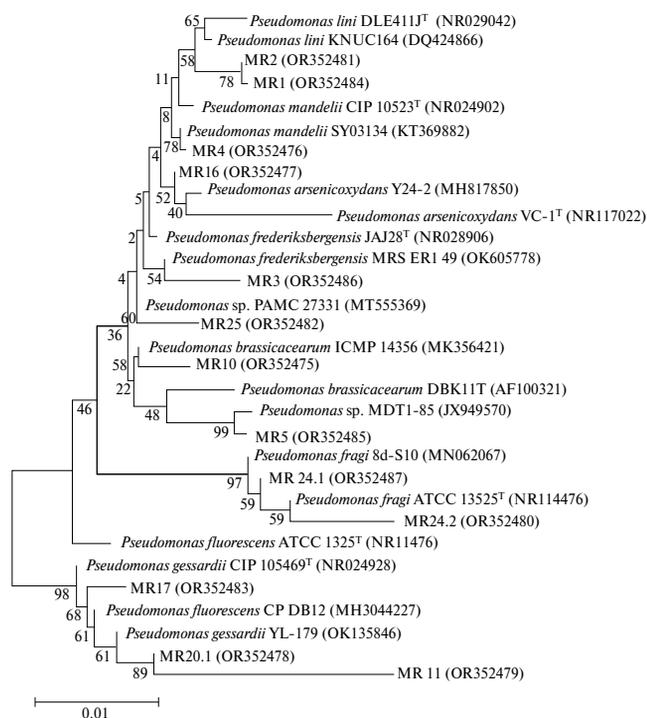


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК штаммов бактерий, выделенных из органических отложений пещеры Мраморная, показывающее их положение среди представителей рода *Pseudomonas*. Дендрограмма построена на основе алгоритма метода объединения ближайших соседей (NJ). Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 п.н. Представлены значения бутстреп поддержки выше 50%.

нефти из скважин, для борьбы с загрязнением окружающей среды, а также в качестве моделей для многочисленных теоретических исследований, среди них встречаются психрофильные формы (Щербаков и соавт., 2017; Глушакова и соавт., 2021; Сидоренко, Русакова, 2022).

Филогенетический анализ. В результате культивирования на ГРМ-агаре глинистых органических отложений карстовой пещеры Мраморная были выделены 13 штаммов бактерий. Для определения их таксономической принадлежности для каждого штамма были секвенированы последовательности гена 16S рРНК размером от 1100 до 1310 нуклеотидов и депонированы в NCBI (табл. 1).

Филогенетический анализ полученных последовательностей показал, что все они относятся к роду *Pseudomonas* (рис. 1).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей показал, что исследуемые гены штаммов MP5 и MP25 гомологичны на 99.77 и 98.52% последовательностям *Pseudomonas* sp. MDT1-85 и *Pseudomonas* sp. PAMC27331 соответственно. *Pseudomonas* sp. MDT1-85 ранее был выделен из

ледника, а *Pseudomonas* sp. PAMC27331 из Антарктической почвы.

Ближайшим родственником штамма MP3 является *P. frederiksbergensis* MRC ER1 49 (сходство 98.70%), выделенный из ризосферы оливкового дерева. Ферментативная активность бактерий этого вида хорошо изучена. Известно, что *P. frederiksbergensis* является эффективным биоинкулянтом для повышения устойчивости растений к холодовому стрессу (Chatterjee et al., 2017), а также способен расти при 4 и 30°C, но не при 37°C (Andersen et al., 2000).

Штаммы MP1 и MP2 близки *Pseudomonas lini* KNUC164, выделенному из ризопланы дикорастущих злаков. Данный вид мало изучен, отмечено несколько работ, посвященных его способности растворять фосфатные соединения и выделять ростостимулирующие вещества (Sandhya et al., 2017). *P. lini* растет при температуре от 4 до 36°C, но не при 41°C (Delorme et al., 2002).

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма MP16 гомологична на 99.88% последовательности штамма *P. arsenicoxydans* Y24-2, выделенного из образцов донных отложений долины Камаронес в пустыне Атакама и проявляющее способность окислять арсенит. Температурный диапазон роста *P. arsenicoxydans* – 4–37°C. (Campos et al., 2010).

Штамм MP4 близок *P. mandelii* SY03134 (сходство 99.61%), который был выделен из образцов почвы горы Цилян в Китае. Необходимо отметить, что в литературе *P. mandelii* характеризуется как психрофил, обладающий адаптированными к холоду глюкозо-6-фосфатдегидрогеназами, участвующими в пентозофосфатном пути (DangThu, et al., 2020).

Штаммы MP24.1 и MP24.2 кластеризуются в одну группу и близки *P. fragi* 8d-S10 со сходством 99.70 и 99.21% соответственно. Примечательно, что штамм *P. fragi* 8d-S10 является факультативным психрофилом, способным расти в диапазоне температур от 0 до 30°C (Bao et al., 2023).

Анализ последовательностей гена 16S рРНК штаммов MP11 и MP20.1 продемонстрировал их сходство с *P. gessardii* YL-179 на уровне 98.73 и 99.35% соответственно. Данный вид бактерий известен своей термоустойчивой протеолитической способностью. Так же термостабильную протеазу продуцируют бактерии вида *P. fluorescens*. Оптимальная температура роста для этих видов составляет выше 20°C, однако они могут расти в диапазоне температур 4–42°C. (Meng et al., 2017). Одному из штаммов этого вида бактерий, а именно: *P. fluorescens* CP DB12, на 99.48% близок штамм MP17 выделенный из органических отложений пещеры Мраморная.

Штамм MP10 является ближайшим родственником *P. brassicacearum* ICMP 14356 (сходство 99.48%), выделенного из некрозного участка стебля томата. Бактерии вида *P. brassicacearum*, содержащие 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазу, при взаимодействии с томатом могут проявлять как патогенные, так и ростостимулирующие свойства (Belimov et al., 2007). Диапазон роста для этого вида составляет от 5 до 37°C, при этом незначительный рост отмечен при 40°C на сложной среде Луриа–Бертани (Zachow et al., 2017).

Таким образом, представители рода *Pseudomonas* встречаются в большом количестве во всех основных природных средах (наземных, пресноводных и морских), а также образуют тесные связи с растениями и животными. Это универсальное распространение предполагает высокую степень физиологической и генетической приспособляемости, что может являться фактором проявления широкого спектра биохимических свойств.

Исходя из результатов определения сходства последовательностей генов 16S рРНК, а также из сравнения с типовыми штаммами *P. brassicacearum* DBK11, *P. arsenicoxydans* VC-1, *P. gessardii* CIP 105–469, *P. fragi* ATCC13525, *P. lini* DLE411J, *P. fluorescens* ATCC1325, *P. frederiksbergensis* JAJ28, *P. mandelii* CIP 10523, можно сделать вывод о принадлежности исследуемых бактерий к роду *Pseudomonas*.

Использование источников углерода. Для псевдомонад описаны различные свойства: способность фиксировать азот, растворять фосфаты (Sandhya et al., 2017), синтезировать протеазы, липазы и другие ферменты (Meng et al., 2017; Pabai et al., 1995; Ramani et al., 2010). Для рода *Pseudomonas* характерны следующие сахаролитические свойства

— большинство видов используют сахарозу, арабинозу, маннозу и маннит в качестве углеводного источника. (Определитель бактерий ..., 1997). В данной работе исследовали гликолитическую активность на ряд углеводов (расширенный ряд Гисса) при двух режимах культивирования при 4 и 25°C. В результате установлено, что для всех исследуемых штаммов характерна гликолитическая активность в отношении сорбита, сахарозы, лактозы, маннита, мальтозы, глюкозы и ксилозы при 25°C. При 4°C спектр субстратов, доступных для окисления, сужается до сорбита, сахарозы, лактозы, маннита, мальтозы и рамнозы. Отмечено отсутствие реакции у всех исследуемых штаммов при 25°C в присутствии дульцита, а при 4°C — вышеупомянутого, инозита и фруктозы. Для отдельных штаммов наблюдали изменение метаболической реакции в зависимости от температуры. Так, при 4°C отсутствует ферментация фруктозы у штаммов MP24, MP25, MP17, глюкозы и ксилозы — у штамма MP16, ксилозы и инозита — MP10 и инозита у MP20.1. При 25°C отмечена отрицательная реакция при культивировании на средах, содержащих рамнозу у штамма MP17. Таким образом, гликолитическая активность исследуемых бактерий зависит от температуры, однако на ферментативный аппарат, отвечающий за гликолиз штамма MP24.2, температура культивирования не оказывает влияния.

Морфологические, культуральные и биохимические свойства. Исследуемые бактерии рода *Pseudomonas* имели цвет колоний от прозрачного до бежевого и не образовывали пигмент при росте на ГРМ-агаре. Все штаммы отличались по своим культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам (табл. 2).

Таблица 1. Филогенетическая принадлежность бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из проб глинистых органогенных отложений пещеры Мраморная, на основе поиска ближайших родственников, полученных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК в базе данных GenBank

Штамм	Номер в NCBI	Длина фрагмента, п.н.	Процент гомологии	Гомолог
MP10	OR352475	1160	99.48	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> ICMP 14356 (MK356421)
MP16	OR352477	1120	99.88	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> Y24–2 (MH817850)
MP20.1	OR352478	1270	99.35	<i>Pseudomonas gessardii</i> YL-179 (OK135846)
MP11	OR352479	1190	98.73	<i>Pseudomonas gessardii</i> YL-179 (OK135846)
MP24.2	OR352480	1260	99.21	<i>Pseudomonas fragi</i> 8d-S10 (MN062067)
MP2	OR352481	1195	99.75	<i>Pseudomonas lini</i> KNUC164 (DQ424866)
MP25	OR352482	1310	98.52	<i>Pseudomonas</i> sp. PAMC27331 (MT555369)
MP17	OR352483	1300	99.69	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CP DB12 (MH304227)
MP1	OR352484	1100	99.64	<i>Pseudomonas lini</i> KNUC164 (DQ424866)
MP5	OR352485	1280	99.77	<i>Pseudomonas</i> sp. MDT1–85 (JX949570)
MP3	OR352486	1280	98.70	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> MRC ER1 49 (OK605778)
MP24.1	OR352487	1300	99.70	<i>Pseudomonas fragi</i> 8d-S10 (MN062067)
MP4	OR352476	1300	99.61	<i>Pseudomonas mandelii</i> SY03134 (KT369882)

Таблица 2. Культуральные и морфологические характеристики исследуемых штаммов

Штамм	Температурный оптимум, °С	Морфология колонии						Микроскопические характеристики (4°С)						Микроскопические характеристики (25°С)		
		Цвет	Диаметр, мм	Поперечного сечения	Поверхность	Край	Пигмент	Окраска по Граму (+/–)	Форма	Размер, мкм	Подвижность	Окраска по Граму (+/–)	Форма	Размер, мкм	Подвижность	
MP1	25	Белый	1–3	Плоская	Глянцевая	Ровный		–	Палочки	0.73–1.55	Слабо-подвижные	–	Палочки	0.73–1.55	Слабо-подвижные	
MP2	37	Прозрачно-бежевый	3–5	Плоская	Глянцевая	Ровный		–	Палочки	1.11–2.14	Слабо-подвижные	–	Палочки	1.12–2.13	Слабо-подвижные	
MP4	4	Прозрачно-серый	10–15	Плоская	Глянцевая	Неровный		–	Палочки	1.68–1.80	Подвижные	–	Палочки	1.84–5.60	Слабо-подвижные	
MP5	4	Бежевый	1–3	Плоская	Глянцевая	Ровный		–	Палочки	0.74–1.53	Подвижные	–	Палочки	0.74–1.51	Слабо-подвижные	
MP25	25	Серый	3–5	Кратерообразная	Глянцевая	Ровный		–	Палочки	0.74–1.53	Подвижные	–	Палочки	0.72–1.51	Подвижные	
MP16	37	Белый	2–4	Плоская	Глянцевая	Ровный	Отсутствует	–	Палочки	0.68–1.76	Подвижные	–	Палочки	0.70–1.75	Подвижные	
MP10	4	Прозрачно-белый	3–4	Плоская	Глянцевая	Ровный		–	Палочки	0.62–1.42	Подвижные	–	Палочки	0.62–1.44	Подвижные	
MP3	25	Белый	10–16	Плоская	Матовая	Неровный		–	Палочки	1.05–1.20	Подвижные	–	Палочки	1.35–5.60	Подвижные	
MP24.1	25	Светло-бежевый	14–16	Плоская	Матовая	Неровный		–	Палочки	0.54–0.78	Подвижные	–	Палочки	0.54–0.76	Подвижные	
MP24.2	25	Светло-бежевый	11–15	Плоская	Матовая	Ровный		–	Палочки	0.56–0.80	Подвижные	–	Палочки	0.30–0.81	Подвижные	
MP17	4	Серый	2–5	Выпуклая	Глянцевая	Ровный		–	Палочки	0.68–1.76	Подвижные	–	Палочки	0.66–1.77	Слабо-подвижные	
MP11	25	Прозрачно-белый	5–8	Выпуклая	Глянцевая	Ровный		–	Палочки	0.64–1.43	Подвижные	–	Палочки	0.66–1.44	Подвижные	
MP20.1	25	Белый	10–13	Плоская	Матовая	Ровный		–	Палочки	0.58–0.86	Слабо-подвижные	–	Палочки	0.59–0.85	Подвижные	

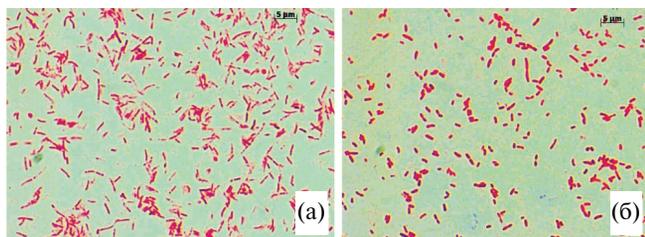


Рис. 2. Клеточная морфология штамма MR4 при 25°C (а) и 4°C (б). Масштабные метки — 5 мкм.

Известно, что температура может оказывать влияние на размер бактериальной клетки (Shehata, Marr, 1975). В наших исследованиях отмечено, что температура культивирования не оказывала влияния на размер бактериальных клеток большинства штаммов: их длина, независимо от температуры, варьировала от 0.54 до 2.14 мкм у разных изолятов (рис. 2). Исключение составили два штамма (MR3, MR4), у которых при изменении температуры с 4 на 25°C клетки увеличивались в размерах с 1.2–1.8 до 5.6 мкм.

Для бактерий, живущих в сложной и ограниченной по питательным веществам среде, способность мигрировать в благоприятную среду (хемотаксис) имеет большое значение для выживания (Воротников, 2011). Наши исследования показали изменение подвижности клеток штаммов в зависимости от температуры. Так, клетки штаммов MR4, MR5, MR3, MR17 при 4°C осуществляли плавательное направленное движение, при этом бактерии управляли своим движением, меняя направление вращения базального тела, а при 25°C активность заметно снижалась и приобретала характер движения твитчинг (дергающее). Штамм MR20.1, напротив, при 25°C осуществлял плавательное движение, а при 4°C — дергающее. Бактерии MR10 при 4°C осуществляли дергающее движение, а при 25°C — круговое. Согласно полученным данным и анализу

литературных сведений (McBride, 2001; Цыганов и соавт., 2021), полагаем, что у большинства исследуемых штаммов в условиях холода активируются защитные механизмы, позволяющие им активно двигаться в поиске нового источника энергии. В роли защитного механизма может выступать формирование нетрадиционных локомоторивных органов — изменение синтеза белков-рецепторов, ответственных за таксис; белков флагелина, способного самоорганизовываться в филаменты бактериальных жгутиков; трансформация количества жгутиков и формы их базального тела и др.

Одной из важнейших характеристик обитающих в пещере микроорганизмов является температурный диапазон роста. Температурный оптимум роста всех исследуемых бактерий находился в пределах 4–25°C. При 30 и 37°C увеличение концентрации бактериальных клеток для большинства штаммов не наблюдали. Исключение составили штаммы MR16 и MR2, темпы роста которых заметно увеличивались при 37°C на протяжении всего времени культивирования (рис. 3б). На рис. 3а представлены кривые роста штамма MR 17, демонстрирующие характер роста большинства штаммов при разных температурах.

Таким образом, в пещере Мраморная присутствуют как психротолерантные, так и эвритермные бактерии рода *Pseudomonas*. При этом психротолерантные бактерии являются преобладающими формами, среди исследуемых штаммов. Это подтверждается низким уровнем удельной скорости роста при 37°C в сравнении с удельной скоростью роста при 4 и 25°C (рис. 4а), где диапазон средних значений удельной скорости роста основного пула исследуемых штаммов составил от 0.0023 до 0.0098 ч⁻¹ (при 37°C) и от 0.0065 до 0.0125 ч⁻¹ (при 4 и 25°C).

При этом размах от минимального до максимального значения при 4°C имел широкий диапазон и составил от 0.0050 до 0.0150 ч⁻¹, что, вероятно,

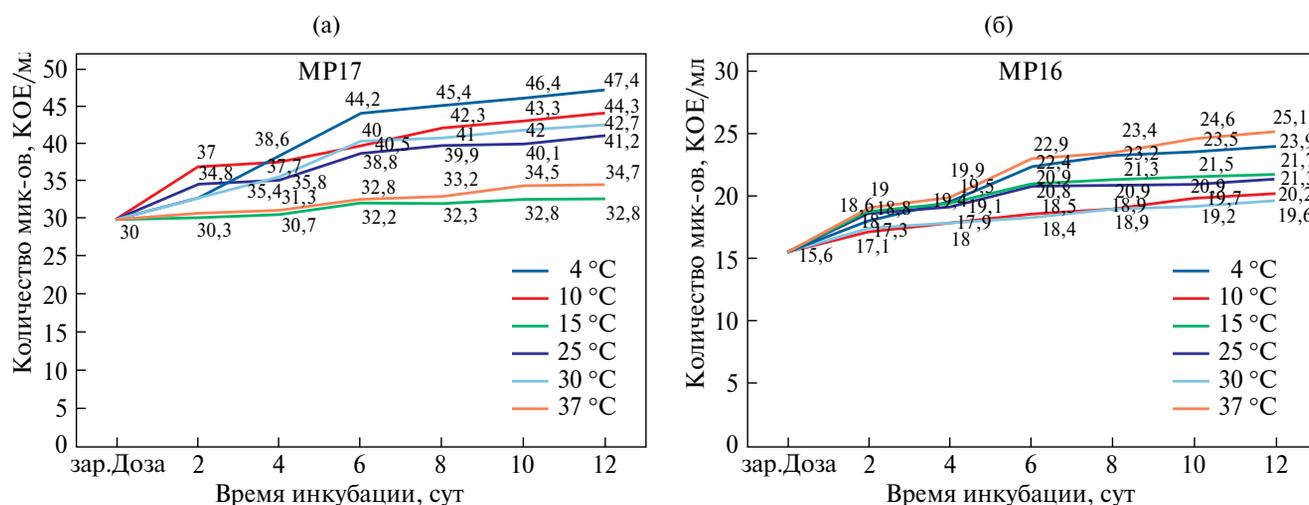


Рис. 3. Кривые роста представителей психротрофной культуры *Pseudomonas* sp. MR17 (а) и эвритермной культуры *Pseudomonas* sp. MR16 (б) при исследуемых температурах.

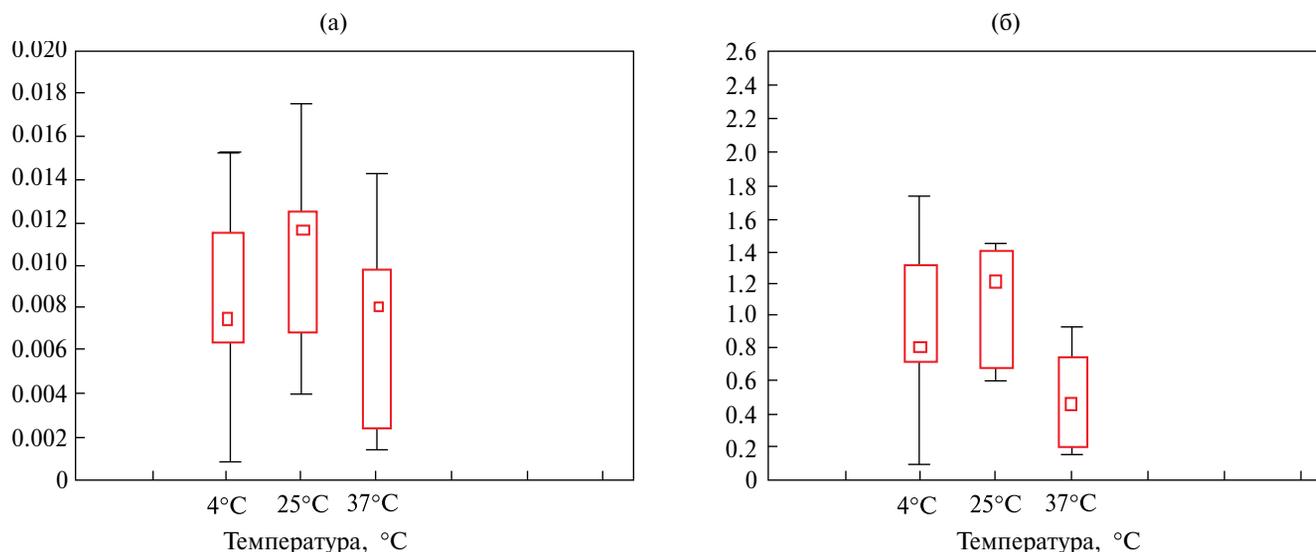


Рис. 4. Диапазон значений удельной скорости роста (а) и прироста биомассы клеток (б) для всех исследуемых штаммов при различных температурах.

связано с адаптированными к холодным условиям свойствами исследуемых штаммов. Вследствие чего прирост биомассы при 37°C имел наименьшие значения подавляющего большинства исследуемых штаммов, с концентрацией от 0.20 до 0.75 КОЕ/мл (рис. 4б). При 4 и 25°C диапазон значений основной массы исследуемых бактерий имел от 0.70 до 1.40 КОЕ/мл. Сопоставимые данные получены для карстовых пещер Средней Сибири, так как выделенные изоляты не были способны расти при температуре 29°C (Воробьева и соавт., 2012). В то же время работы других исследователей указывают на то, что независимо от температурного оптимума

роста, пещерные бактериальные изоляты способны хорошо расти при температурах от 13 до 45°C (Laiz et al., 2003). Противоречивые данные могут быть свидетельством индивидуальной особенности системы пещер, так как каждая пещера уникальна с точки зрения биологических, химических и физических характеристик. Доступность солнечного света, воды, питательных веществ, воздушный поток и взаимодействие с организмами, живущими вне пещер, различны в каждой пещерной зоне и влияют на микрофлору, которая может там развиваться и выживать (Ryan, Meiman, 2004).

Таблица 3. Ферментативная активность исследуемых штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из органогенных отложений пещеры Мраморная (Приморский рай)

Наименование штамма	Диаметр зоны активности штаммов, мм							
	Протеолитическая		Пектиназная		Липазная		Фосфат-солюбилизирующая	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
MP10	20	26	0	17	0	17	12	21
MP16	13	0	17	0	17	0	14	20
MP2	0	0	0	0	0	0	0	0
MP11	28	28	0	0	0	0	22	30
MP1	0	18	15	28	15	28	18	18
MP20.1	25	20	0	20	0	20	14	19
MP24.2	16	21	0	35	0	35	25	15
MP4	0	0	30	20	30	20	14	19
MP25	17	21	31	0	31	0	15	16
MP17	27	28	24	0	24	0	19	20
MP3	0	14	20	10	20	10	15	25
MP24.1	13	0	18	0	18	0	20	0
MP5	0	21	0	0	0	0	15	0

Все исследуемые штаммы являются грамотрицательными, оксидазо- и каталазоположительными палочками. Поскольку известно, что оксидаза служит катализатором окислительно-восстановительных реакций, а каталаза участвует в клеточной антиоксидантной защите бактерий, разлагая перекись водорода и осуществляя транспорт электронов (Рязанцева, 2011), мы предполагаем, что исследуемые штаммы способны участвовать в окислительно-восстановительных процессах, при этом обладают защитным свойством в отношении окислительного стресса.

Ферментативная активность. В результате исследования установили, что экспериментальные штаммы проявляли протеолитическую, липазную, пектиназную и фосфатсольюбилизирующую активности, зависящие от температурных режимов культивирования (табл. 3).

Так, повышенную протеолитическую активность культуры чаще проявляли при 25°C, однако некоторые штаммы (MP16, MP20.1, MP24.1) демонстрировали ее при 4°C. При снижении температуры у штаммов MP16 и MP24.1 проявлялась способность к деструкции белоксодержащих субстратов. Так, при культивировании этих штаммов в холодных условиях (4°C) выявили протеазную активность, тогда как при 25°C ее не наблюдали. Протеолитическая активность обнаружена у штаммов MP10, MP11, MP24.2, MP25, MP17, MP20.1 при 4 и 25°C, однако для большинства из этих штаммов зона гидролиза при 25°C превышала значения, выявленные при 4°C. Вероятно, протеаза, синтезируемая этими бактериями, более термостабильна, так как температурный диапазон ее проявления лежит в пределах от 4 до 25°C. Штаммы MP5, MP3, MP1 проявили протеолитическую активность только при 25°C. При этом температурный оптимум роста для MP3 и MP1 составил 25°C, а для штамма MP5 – 4°C.

Большинство исследуемых штаммов проявляли высокоспецифичную и зависящую от условий культивирования пектиназную активность. Так, холодоактивную пектиназу обнаружили у четырех штаммов (MP16, MP25, MP17, MP24.1), а у трех штаммов (MP10, MP20.1, MP24.2) — пектиназную активность с температурным оптимумом 25°C. Часть штаммов обладала термотолерантной пектиназой: ферментативная активность одновременно выявлена при 4 и 25°C у штаммов MP1, MP4, MP3.

Штаммы MP10, MP11, MP20.1, MP25, MP17, MP5 демонстрировали липолитическую активность при 4 и 25°C. Холодоактивную липолитическую активность в отношении оливкового масла и твина — 80 обнаружили у штаммов MP16, MP4. При 25°C липолитическую активность проявили штаммы MP1 и MP3. Наибольшей активностью обладает штамм MP25.

Фосфат-сольюбилизирующую активность при 4 и 25°C проявили все исследуемые штаммы. При

этом исключение составили: штаммы MP2 (при 4°C), MP24.1 и MP5 (при 25°C), которые свойства растворять фосфат кальция не проявили. Наибольшая зона просветления выявлена у штамма MP11 при 25°C и составила 30 мм. Высокий показатель способности исследуемых штаммов сольюбилизировать фосфат кальция, является еще одним показателем приспособляемости исследуемых штаммов к условиям пещеры, так как одной из характерных особенностей многих карстовых пещер является образование карбоната кальция в грунте.

Таким образом, среди бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из глинистых органогенных отложений пещеры Мраморная (Приморский край), выявлены психротолерантные и эвритермные формы. Большинство исследуемых штаммов при изменении температуры культивирования не изменяют размер клеток, но меняют характер движения. Скрининг ферментативной активности при температурах 4 и 25°C показал различную активность пектиназы, протеазы и липазы, в зависимости от температурного оптимума роста. Наибольшее количество штаммов проявило фосфат-сольюбилизирующую активность как при 4°C, так и при 25°C.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность доктору биологических наук, ведущему научному сотруднику лаборатории териологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН Михаилу Петровичу Тиуну, за предоставление образцов грунта пещеры Мраморная (Приморский край), Центру коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” на базе ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН и руководителю лаборатории морской микробиологии Института Мирового океана ДВФУ, кандидату биологических наук Елене Александровне Богатыренко за допуск к работе на приборах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031000134–6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берсенева Ю. И. Особо охраняемые природные территории Приморского края: существующие и проектируемые: монография. Владивосток: Изд-во Дальневост. федерал. ун-та. 2017. 202 с.
- Берсенева Ю. И. Пещеры Дальнего Востока и перспективы их использования // Пещеры. Проблемы изучения: Межвузовский сборник научных трудов / Перм. ун-т. Пермь. 1990. 156 с.
- Воробьева С. В., Хижняк С. В., Харламова Л. Т. Влияние температуры на рост психрофильных бактерий, выделенных из пещер Дальнего Востока, Средней Сибири и Западного Кавказа // Вестник КрасГАУ. 2012. № 9. С. 117–121.
- Воротников А. В. Хемотаксис: движение, направление, управление // Успехи биологической химии. 2011. Т. 51. С. 335–400.
- Vorotnikov A. V. Chemotaxis: movement, direction, control // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. № 13. P. 1528–1555. <https://doi.org/10.1134/S0006297911130104>
- Галимзянова Н. Ф., Гильванова Е. А., Рябова А. С., Гуватова З. Г., Кудрявцева А. В., Мелентьев А. И. Филогенетическое разнообразие прокариотов в микробных сообществах скальных поверхностей пещеры Шульган-Таш (Капова), Южный Урал // Экобиотех. 2020. Т. 3. С. 298–304. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-3-298-304>
- Глушакова А. М., Лысак Л. В., Качалкин А. В., Иванова А. Е., Умарова А. Б., Абрямян И. А., Ежелев З. С., Максимова И. А. Трансформация микробных комплексов в компонентах почвенных конструкций разного генезиса (почва, торф, песок) при процессах замораживания–оттаивания // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 166–178. <https://doi.org/10.31857/S002636562102004X>
- Glushakova A. M., Lysak L. V., Kachalkin A. V., Ivanova A. E., Umarova A. B., Abramyann I. A., Ezhelev Z. S., Maksimova I. A. Transformation of microbial complexes in components of soil constructions of different origin (soil, peat, sand) during freezing-thawing processes // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 176–186.
- Кадырова Г. Х., Садуллаева М. С., Атаджанова Ш. Ш., Закирьяева С. И. Фосфат-солюбилизирующая активность ризобактерий пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Universum: химия и биология: электрон. научн. журн. 2022. Т. 12. № 102. 6 с. <https://doi.org/10.32743/UniChem.2022.102.12.14609>
- Кондратьева Л. М., Полевская О. С., Голубева Е. М., Штатарева А. В., Коновалова Н. С. Элементный состав грунтовых вод и спелеотемы “лунное молоко” в карстовой пещере Прошальная (Дальний Восток) // Литосфера. 2018. Т. 18. С. 928–941. <https://doi.org/10.24930/1681-9004-2018-18-6-928-941>
- Кузьмина Л. Ю., Галимзянова Н. Ф., Абдуллин Ш. Р., Рябова А. С. Микробиота пещеры Киндерлинская (Южный Урал) // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 273–281.
- Kuzmina L. Y., Galimzianova N. F., Abdullin S. R., Ryabova A. S. Microbiota of the Kinderlinskaya cave (South Urals, Russia) // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 251–258.
- Кузьмина Л. Ю., Высоцкая Л. Б., Галимзянова Н. Ф., Гильванова Е. А., Рябова А. С., Мелентьев А. И. Новые штаммы фосфатомобилизующих бактерий, продуцирующие ауксин, перспективные для сельскохозяйственной биотехнологии // Известия УНЦ. 2015. № 1. С. 40–52.
- Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии. — М.: Издательский центр “Академия”, 2005. 608 с.
- Определитель бактерий Берджи в 2 томах. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир, 1997. 368 с.
- Рязанцева Л. Т. Ферменты-антиоксиданты: структурно-функциональные свойства и роль в регулировании метаболических процессов // Вестн. Воронежского гос. техн. ун-та. 2011. Т. 7. № 2. С. 126–129.
- Сидоренко М. Л., Русакова Д. А. Разнообразие психрофильных бактерий и их биотехнологический потенциал // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2022. № 58. С. 28–54. <https://doi.org/10.17223/19988591/58/2>
- Фирсова М. С., Евграфова В. А., Потехин А. В. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragallinarum* // Ветеринария сегодня. 2019. Т. 2. № 29. С. 12–16. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2019-2-29-12-16>
- Цыганов И. В., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Скольжение бактерий: способ пассивного распространения без использования жгутиков и пилей // Вестник ПГУ. Биология. 2021. № 4. С. 263–274.
- Щербаков А. В., Щербакова Е. Н., Мулина С. А., Роц П. Ю., Дарью Р. Ф., Кипрушкина Е. И., Гончар Л. Н., Чеботарь В. К. Психрофильные псевдомонады-эндофиты как потенциальные агенты в биоконтроле фитопатогенных и гнилостных микроорганизмов при холодильном хранении картофеля // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 1. С. 116–128. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.1.116rus>
- Andersen S. M., Johnsen K., Sorensen J., Nielsen P., Jacobsen C. S. *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1957–1964. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-1957>
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Belimov A. A., Dodd I. C., Safronova V. I., Hontzeas N., Davies W. J. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato // J. Exp. Botany. 2007. V. 58. P. 1485–1495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm010>
- Bogdan D. F., Baricz A. I., Chiciudean I., Bulzu P. A., Cristea A., Nastase-Bucur R., Levei E. A., Cadar O., Sitar C., Banciu H. L., Moldovan O. T. Diversity, distribution and organic substrates preferences of microbial communities of a low anthropic activity cave in North-Western Romania // Front. Microbiol. 2023. V. 14. P. 962452. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.962452>
- Bao C., Li M., Zhao X., Shi J., Liu Y., Zhang N., Zhou Y., Ma J., Chen G., Zhang S., Chen H. Mining of key genes for cold adaptation from *Pseudomonas fragi* D12 and analysis of its cold-adaptation mechanism // Front. Microbiol. 2023. V. 14. Art. 1215837. P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1215837>
- Busquets A., Mulet M., Gomila M., Garcia-Valdes E. *Pseudomonas lalucatii* sp. nov. isolated from Vallgornera, a karstic

- cave in Mallorca, Western Mediterranean // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. P. 126205.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126205>
- Campos V. L., Valenzuela C., Yarza P., Kampfer P., Vidal R., Zorror C., Mondaca M. A. Lopez-Lopez A., Rossello-Mora R. *Pseudomonas arsenicoxydans* sp nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert // Syst. Appl. Microbiol. 2010. V. 33. P. 193–197.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.02.007>
- Chatterjee P., Samaddar S., Anandham R., Kang Y., Kim K., Selvakumar G, Sa T. Beneficial soil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* OS261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. Art. 705.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00705>
- Hebraud M., Dubois E., Potier P., Labadie J. Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi* // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 4017–4024.
- DangThu Q., Jang S. H., Lee C. Biochemical comparison of two glucose 6-phosphate dehydrogenase isozymes from a cold-adapted *Pseudomonas mandelii* // Extremophiles: life under extreme conditions. 2020. V. 24. P. 501–509.
<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01171-3>
- Delorme S., Lemanceau P., Christen R. *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 513–523.
- Ghosh S., Kuisiene N., Cheeptham N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? // Biochem. Pharmacol. 2017. V. 134. P. 18–34.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>
- Ghosh S., Kam G., Nijjer M., Stenner C., Cheeptham N. Culture dependent analysis of bacterial diversity in Canada's Raspberry Rising Cave revealed antimicrobial properties // Int. J. Speleol. 2020. V. 49. P. 43–53.
<https://doi.org/10.5038/1827-806X.49.1.2291>
- Jaroszewicz W., Bielanska P., Lubomska D., Kosznik-Kwasnicka K., Golec P.; Grabowski L., Wiczerek E. Drozd W., Gaffke L., Pierzynowska K. Wegrzyn G., Wegrzyn A. Antibacterial, antifungal and anticancer activities of compounds produced by newly isolated *Streptomyces* strains from the Szczelina Chochołowska Cave (Tatra Mountains, Poland) // Antibiotics. 2021. V. 10. P. 1212.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10101212>
- Kosznik-Kwaanicka K., Golec P., Jaroszewicz W., Lubomska D., Piechowicz L. Into the unknown: microbial communities in caves, their role, and potential use // Microorganisms. 2022. V. 10. P. 222.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020222>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Laiz L., Gonzalez-Delvalle M., Hermosin B., Ortiz-Martinez A. Saiz-Jimenez C. Isolation of cave bacteria and substrate utilization at different temperatures // Geomicrobiol. J. 2003. V. 20. P. 479–489.
<https://doi.org/10.1080/713851125>
- Lopes da Silva T., Moniz P., Silva C., Reis A. The dark side of microalgae biotechnology: a heterotrophic biorefinery platform directed to ω -3 rich lipid production // Microorganisms. 2019. V. 7. P. 670.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7120670>
- Lujan A. M., Gomez P., Buckling A. Siderophore cooperation of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in soil // Biology Lett. 2015. V. 11. P. 20140934.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0934>
- Majorina M. A., Veselova V. R., Melnik B. S. The influence of *Pseudomonas syringae* on water freezing and ice melting // PLoS One. 2022. V. 17. P. e0265683.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265683>
- Meng L., Zhang Y., Liu H., Zhao S., Wang J., Zheng N. Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures // Front. Microbiol. 2017. P. 2158.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02158>
- McBride M. J. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces // Annu. Rev. Microbiol. 2001. V. 55. P. 49–75.
- Molina L., Segura A., Duque E., Ramos J. L. The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment // Adv. Appl. Microbiol. 2020. V. 110. P. 149–180.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.12.002>
- Nicole S. C., Lucca V. C., Leonardo P. M., Gustavo M. T., Ulisses B. A., Luis E. A. Marques L., Leopoldo S.M, Admilton G. O., Paulo R. C.S., Berenice M. T. Potential of cave isolated bacteria in self-healing of cement-based materials // J. Building Engin. 2022. V. 45. P. 103551.
<https://doi.org/10.1016/j.jobbe.2021.103551>
- Pabai F., Kermasha S., Morin A. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. V. 43. P. 42–51.
<https://doi.org/10.1007/BF00170621>
- Palleroni N. J., Kunisawa R., Contopoulou R., Doudoroff M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1973. V. 23. P. 333–339.
<https://doi.org/10.1099/00207713-23-4-333>
- Ramani K., Chockalingam E., Sekaran G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 37. P. 531–535.
<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0700-1>
- Roy K., Dey S., Uddin M. K., Barua R., Hossain M. T. Extracellular pectinase from a novel bacterium *Chryseobacterium indologenes* strain SD and its application in fruit juice clarification // Enzyme Res. 2018. V. 2018. P. 3859752.
<https://doi.org/10.1155/2018/3859752>
- Ryan M., Meiman J. An examination of short-term variations in water quality at a karst spring in Kentucky // Ground Water. 1996. V. 34. P. 23–30.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1996.tb01861.x>
- Sandhya V., Shrivastava M., Ali S. Z., Sai Shiva Krishna Prasad V. Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress // Russ. Agricult. Sci. 2017. V. 43. P. 22–34.
<https://doi.org/10.3103/S1068367417010165>
- Shehata T. E., Marr A. G. Effect of temperature on the size of *Escherichia coli* cells // J. Bacteriol. 1975. V. 124. P. 857–862.
<https://doi.org/10.1128/jb.124.2.857-862.1975>
- Zachow C., Müller H., Monk J., Berg G. Complete genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* strain L13–6–12, a biological control agent from the rhizosphere of potato // Stand. Genom. Sci. 2017. V. 12. № 6. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s40793-016-0215-1>
- Zhu H. Z., Zhang Z. F., Zhou N., Jiang C. Y., Wang B. J., Cai L., Wang H. M., Liu S. J. Bacteria and metabolic potential in karst caves revealed by intensive bacterial cultivation and genome assembly // Appl. Environ. Microbiol. 2021. V. 87. P. e02440–20.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02440-20>

Characteristics of Psychrotolerant Bacteria Isolated from Clay Organogenic Deposits of Mramorny Cave (Primorsky Territory)

D. A. Rusakova^{1, 2}, M. L. Sidorenko^{1, *}, A. V. Kim^{1, 2}

¹Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

²Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690922 Russia

*e-mail: sidorenko@biosoil.ru

Received July 31, 2023; revised September 30, 2023; accepted October 2, 2023

Abstract—A cultivated community of bacteria of the genus *Pseudomonas* was researched in clayey organogenic deposits of the Mramorny Cave (Primorsky Territory). The bacterial strains studied in this work are eurythermal and psychrotolerant. Their phylogenetic affiliation was found by high throughput sequencing of 16S rRNA gene fragments. It is known that bacteria of the genus *Pseudomonas* represent all the Earth ecological niches and, accordingly, have a wide range of adaptive functions. Using microscopy methods, a change in the nature of mobility and the cell size stability with changes in the temperatures of cultivating bacteria were established. The studied strains are of scientific and practical interest due to the enzymatic activity detection to several substrates simultaneously at different temperatures (25 and 4°C), as well as the ability to secrete cold active pectinase, protease and lipase. However, phosphate-solubilizing activity both at 4 and at 25°C became preferable for the strains. The Mramorny Cave is karst and is characterized by carbonate karst, which explains the preference for the studied strains in calcium phosphate. An analysis of the obtained data shows that the collection of cultivated bacteria obtained by us includes both typical psychrotolerant ones, which exhibit enzymatic activity under conditions of optimal growth temperature, and unique ones, capable of synthesizing a wide range of enzymes under conditions not characteristic of its optimum growth.

Keywords: Mramorny Cave, psychrotolerant and eurythermal bacteria of the genus *Pseudomonas*, enzymatic activity

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* НА НОСИТЕЛЯХ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

© 2024 г. М. А. Купряшина^{a, b, *}, Е. Г. Пономарева^a, Т. Е. Пылаев^{a, b}

^aИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»,
Саратов, 410049, Россия

^bСаратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Саратов, 410012, Россия

*e-mail: kupryashina_m@mail.ru

Поступила в редакцию 08.08.2023 г.

После исправления 19.09.2023 г.

Принята к опубликованию 20.09.2023 г.

Для экологизации агропромышленного производства значительная часть исследований направлена на получение иммобилизованных препаратов бактерий, которые сохраняют способность к активному росту без потери метаболической активности, как во время иммобилизации, так и после длительного хранения и биотехнологического использования. В данной работе исследована возможность иммобилизации клеток бактерий рода *Azospirillum* на натуральных и синтетических носителях. Проанализирована эффективность иммобилизации в альгинатный гидрогель и вермикулит клеток штамма *A. brasilense* SR80. Оценен уровень пролиферативной и метаболической активности полученных препаратов. Показана перспективность использования вермикулита и альгината кальция в качестве матрицы для иммобилизации азоспирилл.

Ключевые слова: *Azospirillum*, иммобилизация, вермикулит, альгинатный гидрогель, метаболическая активность

DOI: 10.31857/S0026365624010097

В последние годы особое внимание уделяется технологиям, основанным на использовании ферментативной активности микроорганизмов (Wang et al., 2011; Chen et al., 2017). Известно, что у бактериальных клеток в иммобилизованном состоянии повышаются адаптивный потенциал, устойчивость к действию неблагоприятных факторов внешней среды, проявляется высокая каталитическая активность (Ившина и соавт., 1995; Park, Chang, 2000; Tripathi et al., 2010; Rathoreet et al., 2013; Ruan et al., 2018). Биотехнологические процессы, основанные на использовании иммобилизованных бактерий, существенно упрощены по сравнению с применением суспензионных клеток и, помимо возможности повторного использования, позволяют получить высокий выход целевых продуктов. Одним из способов сохранения и интенсификации ферментативных реакций микроорганизмов в природных условиях является феномен естественной иммобилизации (Beshay et al., 2011). При этом матрицы для иммобилизации могут быть как органическими, так и неорганическими (John et al., 2011). Главными критериями выбора носителя являются его инертность (нетоксичность) в отношении иммобилизуемых организмов, большая площадь поверхности,

механическая стабильность, способность к регенерации; кроме того, носитель должен обеспечивать максимальную проницаемость системы и быть рентабельным (Vejan et al., 2019).

Бактерии рода *Azospirillum* являются ключевым звеном в трансформации биогенных и абиогенных элементов в почве и образуют с растениями симбиозы, играющие важную роль в минеральном питании, продуктивности и адаптации растений к среде обитания (Fendrihan et al., 2017). В наших предыдущих исследованиях удалось установить, что почвенные ассоциативные diaзотрофы рода *Azospirillum* способны к продукции фенолоксиляющих ферментов, участвующих в биodeградации модельных препаратов лигнина и синтетических красителей (Никитина и соавт., 2010; Купряшина и соавт., 2012, 2015, 2020). Однако биотехнологическое использование азоспирилл имеет ряд ограничений, связанных со слабой устойчивостью бактерий к действию солнечной радиации, низких значений pH, высоких концентраций солей и тяжелых металлов. Процесс объединения носителя (твёрдого, жидкого или геля) с бактериальным штаммом имеет решающее значение для повышения

устойчивости азоспирилл к лимитирующим факторам окружающей среды.

Целью данного исследования было изучение возможности иммобилизации азоспирилл на носителях различной природы с сохранением метаболической активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организмы и условия их культивирования. В качестве объекта исследования использован штамм *Azospirillum brasilense* SR80 из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>). Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера (250 мл) на жидкой малатно-солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 —0.1; K_2HPO_4 —0.4; NaCl — 0.1;



образующегося в результате выветривания магнезиально-железистых слюд. Известно, что вермикулит обеспечивает активную микробную колонизацию, быстрое образование биопленки и ее адаптацию к различным видам загрязнений и природным условиям (Кобзев и соавт., 2001). На первом этапе в стерильных условиях 1 г носителя смешивали с 20 мл клеточной суспензии ($\text{ОП}_{600} = 1.0$) в синтетической среде. Сорбцию осуществляли в статических условиях в течение 2 сут при температуре 28°C. Для интенсификации процесса колбы переносили в холодильник, дальнейшую сорбцию вели 1 сут при температуре -4°C. Процесс адсорбции бактериальных клеток контролировали нефелометрически (при длине волны 600 нм). Для дальнейшего исследования неадсорбированные клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 6.9). Взвесь осаждали центрифугированием, вермикулит с прикрепленными клетками азоспирилл хранили при температуре -4°C.

Иммобилизацию на активированном силикагеле проводили в плоскодонных колбах объемом 50 мл. К 2.5 г твердофазного носителя в стерильных условиях вносили 5 мл клеточной суспензии ($\text{ОП}_{600} = 1.0$) в синтетической среде, культивировали в течение 30 мин при комнатной температуре в статических условиях; неадсорбированные клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (рН 6.9) (Максимова, Максимов, 2018).

Иммобилизацию в альгинатный гидрогель проводили по следующей схеме: центрифугированием осаждали 2-сут бактериальную культуру, 1 г биомассы ресуспендировали в 5 мл фосфатно-солевого буфера (рН 6.9) и добавляли к 50 мл стерильного раствора 5% альгината натрия, перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Альгинатные шарики полимеризовали внесением получившейся суспензии в раствор 0.2 М CaCl_2 .

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.002; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.02; яблочная кислота — 5.0; NaOH — 1.7; NH_4Cl — 1.0; CaCl_2 —0.02; рН 6.8. Среду стерилизовали в течение 30 мин при 121°C. Посевным материалом служила 12-часовая культура, выращенная на среде того же состава. Бактерии для исследования культивировали в термостате при температуре 37°C.

Иммобилизация нативных клеток азоспирилл. В качестве матриц для иммобилизации были выбраны вермикулит, альгинат и силикагель.

Иммобилизацию азоспирилл на поверхность твердофазного носителя (вермикулит) проводили в плоскодонных колбах объемом 50 мл. Был выбран вермикулит фракцией 2 мм марки “Вермисил”, который производится на основе природного минерала, следующего состава:

Полученные препараты отмывали и хранили в условиях бытового холодильника при 4°C в чистом растворе 0.2 М CaCl_2 .

Оценка жизнеспособности бактериальных клеток, иммобилизованных на различных носителях. Качественно наличие жизнеспособных иммобилизованных на различных носителях клеток азоспирилл подтверждали высевом полученных образцов на плотную малатно-солевою среду.

Кроме того, жизнеспособность бактериальных клеток, иммобилизованных на различных носителях, оценивали стандартным резазурин-тестом с незначительными модификациями (Rampersad, 2012). Резазурин (входящий в состав коммерческого реагента AlamarBlue) восстанавливается ферментами живых бактериальных клеток с продукцией флуоресцирующего продукта — резорубина, выход которого коррелирует с метаболической активностью (Rampersad, 2012). Для построения калибровочной кривой в лунках 96-луночного планшета делали серию двойных разведений суспензии бактерий в фосфатно-солевом буфере начиная с $\text{ОП}_{600} = 0.5$, объемом по 50 мкл. Затем в лунки добавляли 100 мкл рабочего раствора AlamarBlue (“Sigma”, США) с концентрацией 0.01 г/л, приготовленного на фосфатно-солевом буфере. Образцы инкубировали при температуре 28°C в течение 24 ч. Мониторинг дыхательной активности иммобилизованных бактерий проводили в 24-луночных культуральных полистироловых планшетах. Для этого в отдельные лунки вносили по 1 и 2 мг носителей с бактериями (опытные образцы) и без бактерий (отрицательный контроль). Флуориметрический анализ проводили на спектрофлуориметре Saгу Eclipse (“Agilent”, США). Значения интенсивности флуоресценции экспериментальных и контрольных образцов нормировались на бланк (раствор резазурина в фосфатно-солевом буфере, рН 6.9).

Анализ эффективности иммобилизации. С использованием метода серийных разведений проводили учет клеток до и после иммобилизации на носители. Количество выросших колоний выражали общим числом колониеобразующих единиц (КОЕ) (Максимова, Максимов, 2018).

Степень адсорбции бактериальных клеток вычисляли по формуле:

$$S = (S_{\text{исх}} - S_{\text{равн}}) \times 100\% / S_{\text{исх}},$$

где S — степень адсорбции, %; $S_{\text{исх}}$ — оптическая плотность суспензии до иммобилизации; $S_{\text{равн}}$ — оптическая плотность после иммобилизации.

Степень инкапсуляции бактериальных клеток в гранулах вычисляли по формуле:

$$A = (m_1 / (m_2 + m_3)) \times 100\%,$$

где A — степень инкапсуляции, %; m_1 — масса альгинатных шариков после иммобилизации; m_2 — масса бактериальных клеток, использованных при иммобилизации, m_3 — масса альгината.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Исследования поверхностной морфологии носителей, иммобилизованных на них бактерий, а также отдельных бактериальных клеток, осуществляли на базе лаборатории диагностики наноматериалов и структур ОНИ НС и БС Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского с использованием растрового электронного микроскопа (ЭМ) высокого разрешения Mira\LMU (“Тескан”, Чехия). Пробоподготовку осуществляли следующим образом. Образцы фиксировали 1.5% глутаровым альдегидом (ГА), приготовленным на 10 мМ фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) в течение 12 ч при температуре -4°C . Затем трижды промывали от ГА буфером с выдержкой по 10–15 мин и проводили постфиксацию 1% OsO_4 в течение 2 ч при температуре -4°C . Далее проводили дегидратацию образцов этанолом: 30% — 2-кратно с выдержкой по 10 мин, в 50% — 2-кратно с выдержкой по 10 мин, в 70% — 2-кратно с выдержкой по 10 мин, в 90% — 2-кратно с выдержкой по 10 мин, в 100% — однократно с выдержкой 10 мин; на последнем этапе сушили в 100% ацетоне. Затем образцы наносили на кремниевую липкую ленту. Непосредственно перед измерением образцы напыляли золотом на установке Emitech K450X (“Quorum Technologies Ltd”, Великобритания), съемку ЭМ-изображений производили с ускоряющим напряжением 20 кВ.

Определение полифенолоксидазной активности. Ферментативную активность детектировали спектрофотометрически по скорости окисления 2,6-диметоксифенола (“Acros Organics”, США; $\varepsilon = 30.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) при длине волны 468 нм ($\varepsilon = 30.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) (Paszczynski, Crawford, 1988).

Состав реакционной смеси (2 мл): 50 мМ Na-тарtratный буфер (рН 4.5), 1 мМ 2,6-диметоксифенол, образец (500 мкл). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка. О содержании белка судили по количественной реакции с реактивом Бредфорд (Bradford, 1976).

Для сравнительного анализа уровня активности иммобилизованных на вермикулите азоспирилл со свободными клетками в экспериментальные колбы с малатно-солевой средой и фосфатно-солевым буфером вносили клетки в эквивалентных концентрациях (3×10^7 кл./мл). Измерения проводили в одинаковых условиях инкубации, уровень активности выражали в единицах на 1 мл инкубационной смеси.

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили минимум в трех повторностях в трех независимых экспериментах. При оценке полученных результатов использовали метод расчета стандартного отклонения среднего арифметического с использованием программы Microsoft Office Excel 2010; данные имеют соответствующие доверительные интервалы при уровне доверительной вероятности 0.95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение иммобилизованных клеток азоспирилл. В данной работе нами была проанализирована возможность иммобилизации бактерий рода *Azospirillum* на примере штамма *A. brasilense* SR80 на 3 матрицах: силикагель, вермикулит и альгинатный гель.

При иммобилизации живых бактериальных клеток часто используют метод адсорбции, то есть иммобилизации клеток на поверхности носителя при отсутствии диффузионного барьера (Ившина и соавт., 1995). Если в биотехнологии используют растущие культуры, то в этом случае адсорбция является первым этапом образования биопленки и происходит на стадии инокуляции твердого субстрата (Максимов и соавт., 2007). В качестве твердофазной подложки для иммобилизации клеток азоспирилл методом адсорбции нами был выбран вермикулитовый сорбент. Стандартная методика проведения иммобилизации, включающая инкубацию вермикулита с бактериальной суспензией,

Таблица 1. Степень адсорбции бактериальных клеток на вермикулите

Образец	Адсорбция, %	КОЕ элюата, кл./мл
1 этап иммобилизации	55.28 ± 2.3	$(3.5 \pm 0.6) \times 10^5$
2 этап иммобилизации, интенсификация, -4°C	82.19 ± 1.7	$(2.3 \pm 0.35) \times 10^5$

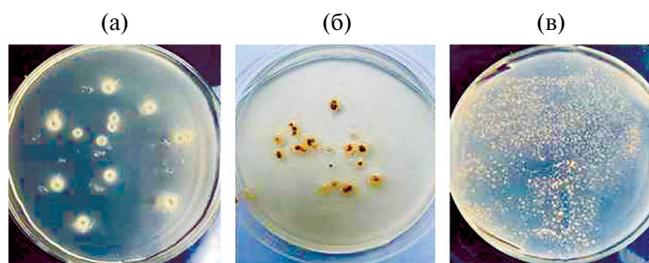


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеток азоспирилл, иммобилизованных на различные носители при высеве на плотную питательную среду: а — Са-альгинатные шарики; б — вермикулит; в — силикагель.

показала низкие значения адсорбции клеток (табл. 1), хотя количество клеток в исходной суспензии составляло 3×10^8 кл./мл. Основываясь на данных литературы (Лейкин и соавт., 2009), была проведена интенсификация первого этапа иммобилизации, включающая инкубацию при -4°C , что позволило повысить степень адсорбции в 1.5 раза.

Из табл. 1 видно, что вермикулит, используемый в качестве матрицы, характеризуется высокой степенью адгезии по отношению к клеткам азоспирилл. При этом стоит отметить, что в присутствии сорбента не отмечалось резкого снижения роста бактериальной культуры, даже в элюате (неадсорбированные клетки) титр бактериальных клеток был достаточно высок, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия сорбента на размножение бактерий.

Мы использовали метод “мягкой” иммобилизации, основанный на включении микробных клеток в альгинатный гель. Альгинат — это наиболее часто используемая матрица, для инкапсуляции ризосферных бактерий, поскольку он биоразлагаем,

Таблица 2. Характеристика Са-альгинатных шариков с иммобилизованными азоспириллами

Размер шариков, мм	Степень инкапсуляции, %	КОЕ, кл./шарик	КОЕ элюата, кл./мл
2-4	82.19 ± 1.7	$(3 \pm 0.4) \times 10^7$	210

нетоксичен и биосовместим (Gombotz, Wee, 2012; He et al., 2019). В результате поэтапной иммобилизации были получены шарики Са-альгинатного гидрогеля с включенными в их структуру бактериальными клетками. Как видно из представленных данных, плотная структура геля (5%) позволила предотвратить естественное вымывание клеток из толщи шарика (о чем свидетельствуют низкие значения КОЕ элюата) и обеспечить высокую степень инкапсуляции (табл. 2).

При получении иммобилизованных клеток азоспирилл методом ковалентного связывания с активированным силикагелем, мы столкнулись с проблемой: титр клеток элюата после иммобилизации свидетельствовал, что эффективность иммобилизации крайне мала.

Для подтверждения того, что процесс иммобилизации прошел эффективно, и бактериальные клетки находятся на/в носителе, а также сохранили свою жизнеспособность, были проведены дальнейшие исследования.

Оценка жизнеспособности бактериальных клеток, иммобилизованных на различных носителях. Для выявления жизнеспособных клеток, носители с иммобилизованными азоспириллами раскладывали на поверхность агаризованной малатно-солевой среды в чашках Петри, проводили культивирование

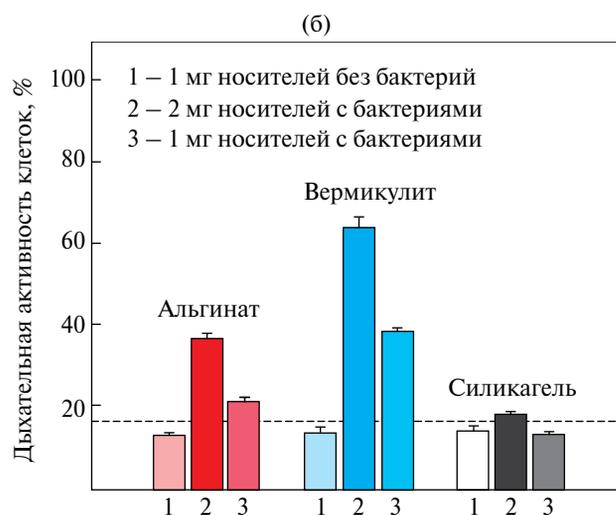
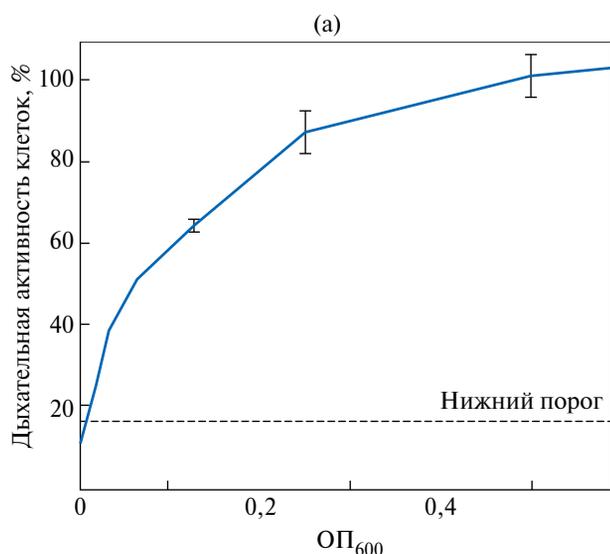


Рис. 2. Относительная дыхательная активность суспензии бактерий (а — калибровочная кривая) и иммобилизованных бактерий (б) на трех типах носителей: альгинатных шариках, вермикулите и силикагеле. Нижний порог определен по базовой линии (сигнал/шум). За 100% принята дыхательная активность суспензии бактерий с $\text{ОП}_{600} = 0$.

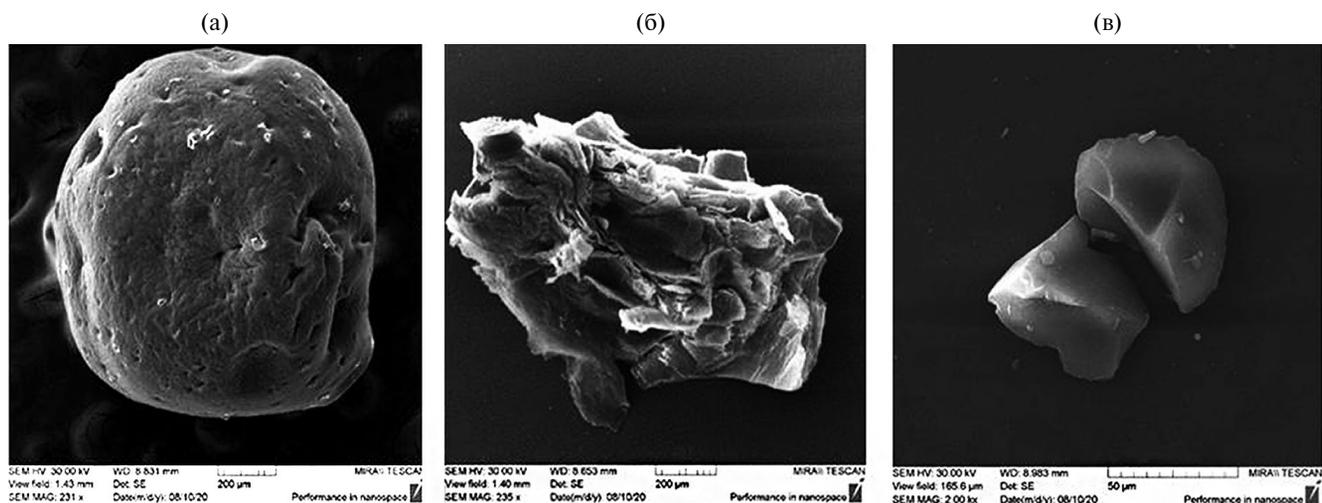


Рис. 3. СЭМ-изображения Са-альгинатных шариков (а), вермикулита (б) и силикагеля (в), иммобилизованных клетками азоспирилл.

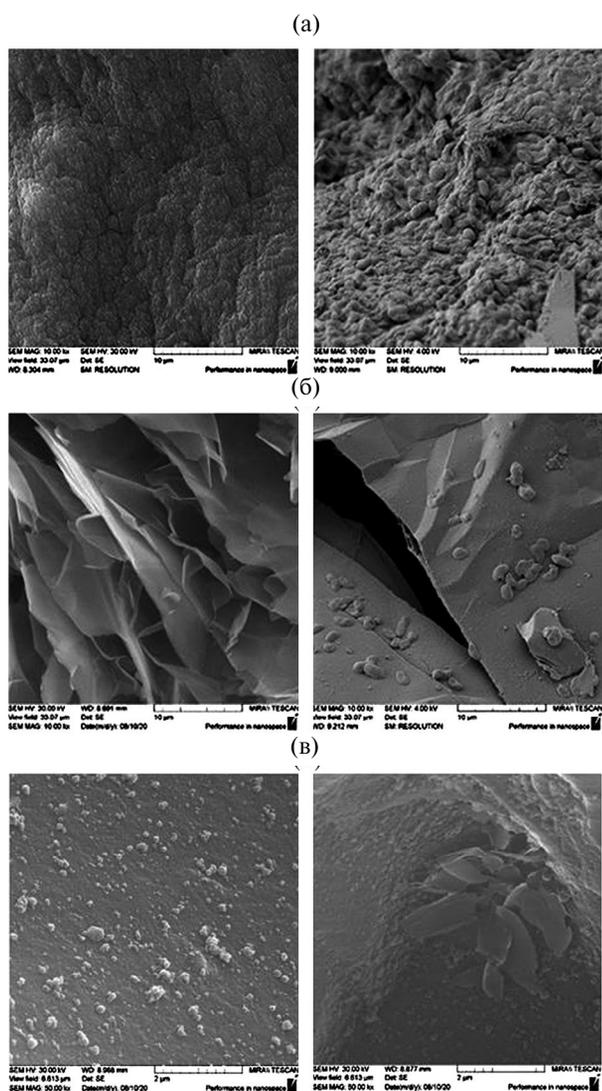


Рис. 4. СЭМ-изображения структуры Са-альгинатных шариков (а), вермикулита (б) и силикагеля (в), контрольных (1) и иммобилизованных клетками азоспирилл (2).

и отмечали образование бактериальных колоний рядом с препаратами (рис. 1).

С помощью резазурин-теста была оценена метаболическая активность азоспирилл, находящихся в суспензионном и иммобилизованном состоянии (рис. 2). Результаты измерения респираторной активности опытных образцов (иммобилизованных клеток) свидетельствуют о наличии жизнеспособных клеток на носителях альгинатных шариков и вермикулите и полном ее отсутствии на силикагеле.

Оценка морфофизиологического состояния клеток в иммобилизованном состоянии. Далее полученные препараты анализировали с применением сканирующей электронной микроскопии. Оценивали распределение клеток и их морфологию на поверхности сорбента и внутри матрицы. На рис. 3 представлен внешний вид используемых носителей.

Вермикулит и силикагель представляли собой образования неправильной формы. На поверхности силикагеля отмечалось незначительное присутствие мелких частиц. Поверхность вермикулита имела пористую, пластинчатую структуру. Как видно из СЭМ-изображений, Са-альгинатные шарики обладали сферической формой, имели компактную внешнюю структуру с относительно гладкой поверхностью без явных повреждений матрицы, диаметр гранул составлял около 1 мм (после дегидратации) (рис. 3а). Внутренняя структура иммобилизованных азоспириллами Са-альгинатных шариков, а также контрольных, без включения бактерий в их структуру, представлены на рис. 4а. На СЭМ-изображении отчетливо видны альвеолоподобные структуры, каналы и поры; подобная морфология увеличивает полезную площадь соприкосновения клеток с субстратом и оказывает положительное влияние на рост бактерий. В толще геля бактериальные клетки расположены однородно и имеют целостную структуру.

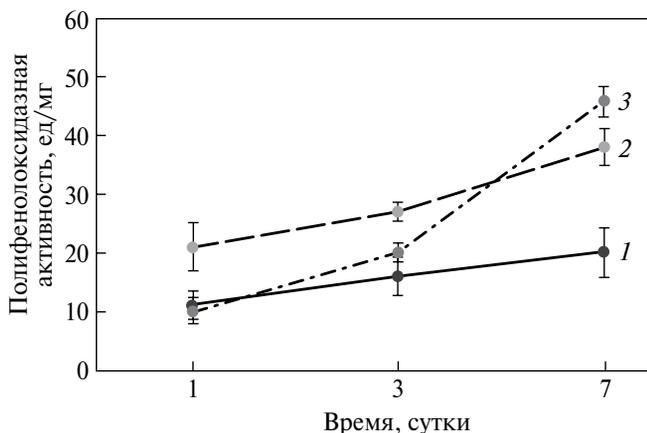


Рис. 5. Изменение удельной активности полифенолоксидазы суспензионных (1), иммобилизованных на вермикулите (2) и на альгинатных шариках (3) клеток *A. brasilense* SR80.

На СЭМ-изображениях иммобилизованных частиц вермикулита также детектировались бактерии. Нами был отмечен различный характер прикрепления азоспирилл к поверхности вермикулита: визуализировались как единичные клетки, так и их скопления, заключенные в общий матрикс. На микрофотографиях отчетливо видны жгутики и пилы.

На поверхности частиц силикагеля нам не удалось обнаружить присутствие прикрепленных бактериальных клеток (рис. 4в), что согласуется с данными резазурин-теста (рис. 2).

Полифенолоксидазная активность препаратов иммобилизованных азоспирилл. На следующем этапе исследования нами был проведен анализ метаболической эффективности иммобилизации азоспирилл, а именно исследован уровень полифенолоксидазной активности иммобилизованных клеток в сравнении с суспензионными. Как видно из представленного графика (рис. 5), были выявлены различия в удельной активности полифенолоксидазы свободными и иммобилизованными клетками.

С увеличением времени инкубации метаболическая активность иммобилизованных клеток возрастала. Так, активность полифенолоксидазы в среде с иммобилизованными на вермикулит клетками увеличилась в 3.5 раза, а инкапсулированных в альгинатный гидрогель — в 4.5 раза по сравнению с данными первых суток культивирования. Стоит отметить, что полифенолоксидазная активность суспензионных клеток на 7 сут выращивания была значительно ниже иммобилизованных (рис. 5). В ходе эксперимента отмечено “высвобождение” клеток с поверхности вермикулита и толщи Са-альгинатного гидрогеля, о чем свидетельствовало увеличение титра свободных клеток в среде. Хранение в течение 6 мес. при 4°C иммобилизованных на вермикулите клеток азоспирилл

снижало их ферментативную активность в сравнении с измеренной в начале эксперимента на $19 \pm 5\%$, а при использовании в качестве матрицы альгинатного геля — на $30 \pm 5\%$. Активность суспензионных клеток при аналогичных условиях хранения не обнаруживалась.

Таким образом, с использованием приемов, основанных на физическом и химическом связывании, проведены исследования по иммобилизации клеток бактерий рода *Azospirillum*. Показана возможность иммобилизации азоспирилл на носителях различной природы с сохранением метаболической активности. Установлено, что использование методик иммобилизации, предложенных в работе, позволяет получить клетки азоспирилл с увеличенной ферментативной активностью. Получены и частично охарактеризованы инкапсулированные в альгинатный гидрогель и иммобилизованные на вермикулите клетки *A. brasilense* SR80. Использование иммобилизованных ризобактерий активно внедряется в сельскохозяйственную практику, поскольку инкапсулированные клетки могут медленно высвобождаться в почву, обеспечивая более высокую эффективность инокулята в долгосрочной перспективе (John et al., 2011; Cesari et al., 2020). В связи с этим полученные данные представляются перспективными для дальнейшего использования в практических разработках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ государственной регистрации темы 121031100266–3).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность заведующему лабораторией диагностики наноматериалов и структур ОНИ НС и БС Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского Захаревичу А. М.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ившина И. Б., Бердичевская М. В., Зверева Л. В. Фенотипическая характеристика алканотрофных родококков

- из различных экосистем // Микробиология. 1995. Т. 64. С. 507–513.
- Кобзев Е. Н., Петрикевич С. Б., Шкидченко А. Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. С. 413–417.
- Kobzev E. N., Petrikevich S. B., Shkidchenko A. N. Investigation of the stability of an association of oil-degrading microorganisms in an open system // Appl. Biochem. Microbiol. 2001. V. 37. P. 416–417.
- Купряшина М. А., Петров С. В., Пономарева Е. Г., Никитина В. Е. Лигнинолитическая активность бактерий родов *Azospirillum* and *Niveispirillum* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 691–696.
- Kupryashina M. A., Petrov S. V., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 791–795.
- Купряшина М. А., Пономарева Е. Г., Никитина В. Е. Способность бактерий рода *Azospirillum* к деколоризации синтетических красителей // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 453–461.
- Kupryashina M. A., Ponomareva E. G., Nikitina V. E. Ability of bacteria of the genus *Azospirillum* to decolorize synthetic dyes // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 451–458.
- Купряшина М. А., Селиванов Н. Ю., Никитина В. Е. Выделение и очистка Mn-пероксидазы *Azospirillum brasilense* Sp245 // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. С. 23–26.
- Kupryashina M. A., Selivanov N. Yu., Nikitina V. E. Isolation and purification of Mn-peroxidase from *Azospirillum brasilense* Sp245 // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48. P. 17–20.
- Лейкин Ю. А., Черкасова Т. А., Смагина Н. А. Вермикулитовый сорбент для очистки воды от нефтяных углеводородов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 1. С. 104–117.
- Максимов А. Ю., Максимова Ю. Г., Кузнецова М. В., Олонцев В. Ф., Демаков В. А. Иммуобилизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 193–198.
- Maksimov A. Yu., Maksimova Yu. G., Kuznetsova M. V., Demakov V. A., Olontsev V. F. Immobilization of *Rhodococcus ruber* strain gt1, possessing nitrile hydratase activity, on carbon supports // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. P. 173–177.
- Максимова Ю. Г., Максимов А. Ю. Иммуобилизованные клетки и ферменты в биотехнологии / Учеб. пособие. — Пермь: Пермский гос. нац. исслед. ун-т, 2018. 88 с.
- Никитина В. Е., Ветчинкина Е. П., Пономарева Е. Г., Гоголева Ю. В. Фенолоксидазная активность бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 344–351.
- Nikitina V. E., Vetchinkina E. P., Ponomareva E. G., Gogoleva Yu. V. Phenol oxidase activity in bacteria of the genus *Azospirillum* // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 327–333.
- Beshay U., El-Enshasy H., Ismail I. M. K., Moawad H., ABD-El-Ghany S. β -Glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells in different matrices // Pol. J. Microbiol. 2011. V. 60. P. 133–138.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
- Cesari A. B., Paulucci N. S., Yslas E. I., Dardanelli M. S. Immobilization of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* in alginate matrix for long time of storage maintains cell viability and interaction with peanut // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 10145–10164.
- Chen Q., Li J., Liu M., Sun H., Bao M. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment // PLoS One. 2017. V. 12. e0174445.
- Fendrihan S., Constantinescu F., Siciua O., Dinu S. *Azospirillum* strains as biofertilizers and biocontrol agents — a practical review // J. Adv. Agricult. 2017. V. 7. P. 1096–1108.
- Gombotz W. R., Wee S. F. Protein release from alginate matrices // Adv. Drug Deliv. Rev. 2012. V. 64. P. 194–205.
- He Y., Wu Z., Ye B., Wang Y., Guan X., Zhang J. Viability evaluation of alginate-encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 under simulated salt-stress conditions and its effect on cotton growth // Eur. J. Soil. Biol. 2016. V. 75. P. 135–141.
- John R. P., Tyagi R. D., Brar S.K., Surampalli R. Y., Prevost D. Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery // Crit. Rev. Biotechnol. 2011. V. 31. P. 211–226.
- Park J. K., Chang H. N. Microencapsulation of microbial cells // Biotechnol. Adv. 2000. V. 18. P. 303–319.
- Paszczynski A., Crawford R. L., Huynh V.-B. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification // Methods Enzymol. 1988. V. 161. P. 264–270.
- Rampersad S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays // Sensors (Basel). 2012. V. 12. P. 12347–12360.
- Rathoreet S., Desai M. P., Liew V. C., Lai W. C., Paul W. S.H. Microencapsulation of microbial cells // J. Food Eng. 2013. P. 116. P. 369–381.
- Ruan B., Wu P., Chen M., Lai X., Chen L., Yu L., Gong B., Kang C., Dang Z., Shi Z., Liu Z. Immobilization of *Sphingomonas* sp. GY2B in polyvinyl alcohol-alginate-kaolin beads for efficient degradation of phenol against unfavorable environmental factors // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. V. 162. P. 103–111.
- Tripathi A., Sami H., Jain S. R., Vilorio-Cols M., Zhuravleva N., Nilsson G., Jungvid H., Kumar A. Improved bio-catalytic conversion by novel immobilization process using cryogel beads to increase solvent production // Enzyme Microb. Technol. 2010. V. 47. P. 44–51.
- Vejan P., Khadiran T., Abdullah R., Ismail S., Dadrasnia A. Encapsulation of plant growth promoting *Rhizobacteria* prospects and potential in agricultural sector: a review // J. Plant Nutr. 2019. V. 42. P. 2600–2623.
- Wang Q., Zhang S., Li Y., Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution // J. Environ. Protect. 2011. V. 2. P. 47–55.

Immobilization of *Azospirillum* Bacteria on Various Carriers

М.А. Купряшина^{1, 2, *}, Е.Г. Пonomарева¹, Т.Е. Пylaев^{1, 2}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049, Russia*

²*Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, 410012, Russia*

*e-mail: kupryashina_m@mail.ru

Received August 8, 2023; revised September 19, 2023; accepted September 20, 2023

Abstract—A significant part of research in environmentally friendly agroindustrial production is aimed at immobilized bacterial preparations with retained capacity for active growth without loss of metabolic activity both during immobilization and after long-term storage and biotechnological use. In the present work, immobilization of members of the genus *Azospirillum* on natural and synthetic carriers was investigated. Efficiency of immobilization of the cells of *A. brasilense* strain SR80 in alginate hydrogel and vermiculite was investigated. Proliferative and metabolic activities of immobilized preparations were investigated. The prospects of using vermiculite and calcium alginate as matrices for *Azospirillum* immobilization are shown.

Keywords: *Azospirillum*, immobilization, vermiculite, alginate hydrogel, metabolic activity