

ISSN 0026-3656

Том 93, Номер 3

Май – Июнь 2024



МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 93, номер 3, 2024

ОБЗОРЫ

- Гомологи тубулина бактерий и архей
Н. А. Румянцева, Д. М. Голофеева, А. А. Хасанова, А. Д. Ведяйкин 249
-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Современное представление о биоразнообразии аноксигенных фототрофных бактерий в реликтовом озере Могильное (остров Кильдин, Мурманская область)
В. М. Горленко, О. Н. Лунина, Д. С. Груздев, Е. Д. Краснова, Д. А. Воронов, В. В. Беленкова, В. В. Козяева, А. С. Саввичев 267
- Грибы арктических морей
Г. А. Кочкина, И. П. Пинчук, Н. Е. Иванушкина, А. Н. Автух, Н. В. Пименов 278
- Таксономический состав культивируемых Fe- и Mn-окисляющих бактерий и численность микроорганизмов в Fe-Mn ортштейнах разного размера
Я. О. Тимофеева, Е. С. Мартыненко, М. Л. Сидоренко, А. В. Ким, В. М. Казарин 290
- Родопин, встроенный в комплекс LH2 из *Allochromatium vinosum*, способен к генерации синглетного кислорода
З. К. Махнева, М. А. Большаков, А. А. Ашихмин, А. А. Москаленко 303
- Биодеградация n-алканов в нефтезагрязненных донных отложениях при биоэлектростимуляции
А. А. Самков, Н. Н. Волченко, Т. Н. Мусорина, М. Н. Круглова, С. М. Самкова, А. А. Худокормов 312
-

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Источник термофильных бактерий в холодных осадках озера Байкал – гидротермы на побережье озера или глубинные флюиды?
О. Н. Павлова, С. М. Черницына, С. В. Букин, А. В. Ломакина, О. В. Шубенкова, Д. К. Смирнова, Т. И. Земская 323
- Угледородокисляющие бактерии донных экотопов Баренцева и Печорского морей
В. О. Пыркин, Л. А. Гавирова, А. Р. Строева, А. Ю. Меркель, О. Н. Видищева, А. Г. Калмыков, Е. А. Бонч-Осмоловская 330
- Изучение трехмерной структуры вириона Stx-конвертирующего бактериофага ф24b методами криоэлектронной микроскопии
А. С. Кузнецов, А. В. Моисеенко, Е. Е. Куликов, А. В. Летаров 336

Сравнительный анализ геномов и оценка функциональных свойств штаммов <i>Streptococcus thermophilus</i> К. В. Моисеенко, О. А. Глазунова, О. С. Савинова, Т. В. Федорова	340
Введение “натриевой подписи” в субъединицы <i>a</i> и <i>c</i> протонной F-АТФазы <i>Bacillus</i> sp. PS3 не приводит к появлению натриевой специфичности С. М. Бруман, А. В. Литвин, А. С. Лапашина, Б. А. Фенюк	346
Мицелиальные грибы в грунтах морей Восточно-Сибирского и Лаптевых М. Л. Георгиева, Е. Н. Биланенко, А. А. Георгиев, Е. Н. Бубнова	351
Влияние замен аминокислотных остатков Ser-911 и Thr-912 В Н ⁺ -АТФазе плазматической мембраны дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> на ее активность и распределение полифосфатов А. А. Томашевский, В. В. Петров	356
Влияние бесклеточной культуральной жидкости <i>Staphylococcus aureus</i> на структуру и биохимический состав биопленок <i>Klebsiella pneumoniae</i> и <i>Pseudomonas aeruginosa</i> А. В. Миронова, М. С. Федорова, Н. Д. Закарова, А. Р. Салихова, Е. Ю. Тризна, А. Р. Каюмов	362
Генетическая идентификация микросимбионтов бобового <i>Hedysarum arcticum</i> В. Fedtsch, произрастающего на острове Самойловский в дельте реки Лены (Арктическая зона Якутии) Д. С. Карлов, П. В. Гуро, И. Г. Кузнецова, А. Л. Сазанова, И. А. Алехина, Н. Ю. Тихомирова, Н. Н. Лащинский, А. А. Белимов, В. И. Сафронова	368
Антимикробная активность терпенов и кислородсодержащих терпеноидов в отношении <i>Staphylococcus aureus</i> А. И. Колесникова, А. Р. Каюмов, И. Р. Гильфанов, Л. Л. Фролова, Л. Е. Никитина, Е. Ю. Тризна	374

ХРОНИКА

Памяти Михайлова Валерия Викторовича (20.01.1952–05.04.2024)	379
--------------------------------------------------------------	-----

УДК 579.238+576.3

ГОМОЛОГИ ТУБУЛИНА БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ

© 2024 г. Н. А. Румянцева^а, Д. М. Голофеева^а, А. А. Хасанова^а, А. Д. Ведяйкин^{а, *}^аСанкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,

Санкт-Петербург, 195251, Россия

*e-mail: vedyajkin_ad@spbstu.ru

Поступила в редакцию 25.10.2023 г.

После исправления 28.11.2023 г.

Принята к опубликованию 05.12.2023 г.

Долгое время считали, что белки цитоскелета отсутствуют у прокариот и имеются только у эукариот, однако за последние 30 лет у бактерий и архей обнаружены гомологи основных белков цитоскелета, в том числе тубулина. Свойства гомологов тубулина, в том числе цитоскелет-подобные структуры, формируемые ими в клетках прокариот, варьируют и значительно отличаются от соответствующих свойств тубулинов эукариот, поэтому представляется интересным сравнить между собой прокариотические гомологи тубулина, что и стало целью данной обзорной работы. Рассматриваются такие гомологи тубулина, имеющиеся у бактерий и архей, как FtsZ, TubZ, PhuZ, VtubA/VtubB, CetZ и другие. Кроме того, в работе обсуждается, что разнообразные гомологи тубулина прокариот могут являться мишенью для фармацевтических препаратов, подобно белку FtsZ, который уже является мишенью для перспективных антибиотиков.

Ключевые слова: FtsZ, тубулин, CetZ, TubZ, PhuZ, VtubA, VtubB, цитоскелет

DOI: 10.31857/S0026365624030015

ВВЕДЕНИЕ

Тубулины — хорошо известные белки цитоскелета эукариот. Они имеют размер около 50 кДа и полимеризуются с образованием микротрубочек. Микротрубочки вовлечены в ключевые клеточные процессы, такие как цитокинез, внутриклеточный транспорт и подвижность клетки, и являются мишенью для многих противораковых препаратов (Binarová, Tuszynski, 2019; Cheng et al., 2020). Среди тубулинов выделяют шесть основных типов, которые могут одновременно присутствовать в одном организме, главным образом это α -, β -, γ -, δ -, ϵ - и ζ -тубулины (Findeisen et al., 2014). Среди основных типов выделяют разновидности, например, тубулины $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$ (Janke, Magiera, 2020). Различные типы тубулина выполняют различные функции, например, α - и β -тубулины образуют гетеродимер и являются основой микротрубочек, γ -тубулин выполняет роль затравки при формировании микротрубочек, а δ -, ϵ - и ζ -тубулины участвуют в образовании центриолей (Findeisen et al., 2014).

Как уже было отмечено, ключевой структурой для тубулинов является микротрубочка, которая в основном состоит из α - и β -тубулинов (Weisenberg, 1972). Тубулины α - и β - взаимодействуют между собой, соединяясь по принципу “голова к хвосту” и образуя гетеродимер. В процессе

формирования микротрубочек димеры α - и β -тубулина связываются с гуанозинтрифосфатом (ГТФ) и способны соединяться с другими димерами (полимеризоваться) с образованием линейных филаментов, при этом на одном конце (“+” конец) находится β -тубулин, а на другом (“-” конец) — α -тубулин. Димеры тубулина преимущественно присоединяются к “+” концу филамента, хотя присоединение к “-” концу также происходит (Walker et al., 1988). Линейные филаменты тубулина, благодаря боковым (латеральным) связям, объединяются с образованием полой структуры — микротрубочки. Наиболее часто встречаются микротрубочки, состоящие из 13 филаментов, хотя возможны и другие варианты (Chrétien et al., 1992; Chaaban, Vrouhard, 2017). Молекула ГТФ, связанная с субъединицей β -тубулина, в конечном итоге гидролизует до гуанозиндифосфата (ГДФ). При этом молекула ГТФ, связанная с субъединицей α -тубулина, не гидролизует. Связывание β -тубулина в составе димера тубулина с ГТФ или ГДФ определяет стабильность димера в микротрубочках. Димеры, связанные с ГТФ, имеют тенденцию собираться в микротрубочки, тогда как димеры, связанные с ГДФ, имеют тенденцию распадаться; таким образом, цикл гидролиза ГТФ во многом определяет свойства микротрубочек и, в частности, крайне важен для динамической нестабильности

микротрубочек (Walker et al., 1988). Присоединение и отсоединение димеров тубулина всегда происходит только начиная с конца микротрубочки, поэтому состояние β -тубулинов на конце микротрубочки, а именно то, связаны ли они с ГТФ или ГДФ, определяет, будет ли происходить разборка микротрубочки, даже если остальные β -тубулины уже гидролизуют ГТФ. Это и обуславливает динамическую нестабильность. Кроме того, баланс между ростом и разборкой микротрубочки определяется текущей концентрацией димеров тубулина: если она превышает критическую концентрацию, происходит рост микротрубочки, если она меньше — происходит ее разборка.

Важнейшей функцией микротрубочек является транспортная, она выражается в перемещении отдельных частей клетки, таких как органеллы. Для выполнения этой функции либо используется собственная способность микротрубочек развивать силу за счет удлинения или укорочения, либо привлекаются моторные белки, такие как кинезины и динеины (Gudimchuk, Alexandrova, 2023).

Долгое время тубулины, как и цитоскелет в целом, считались эксклюзивной принадлежностью эукариотических клеток, однако на сегодняшний день данное мнение признано ошибочным. У бактерий и архей обнаружены гомологи всех белков цитоскелета эукариот, в том числе тубулина (Cabeen, Jacobs-Wagner, 2010; Busiek, Margolin, 2015).

Данный обзор посвящен только гомологам тубулина, которые встречаются у бактерий и архей (включая их вирусы).

РАЗНООБРАЗИЕ ГОМОЛОГОВ ТУБУЛИНА

Среди прокариотических гомологов тубулина наиболее изучен белок FtsZ — именно он в 1991 г. стал первым открытым белком цитоскелета бактерий (Bi, Lutkenhaus, 1991). Предполагают, что именно FtsZ является наиболее древним представителем среди всех гомологов тубулина: вероятно, FtsZ имелся у общего предка бактерий и архей, и именно от FtsZ произошли все его гомологи, включая тубулины эукариот (см. рис. 1) (Santana-Molina et al., 2022).

Несмотря на ограниченное сходство аминокислотной последовательности, FtsZ демонстрирует значительное сходство трехмерной структуры с тубулином (см. рис. 2).

Как и тубулин, FtsZ полимеризуется с образованием линейных полимеров (впрочем, эти полимеры состоят из мономеров только одного вида), однако не образует структур, напоминающих микротрубочки. В зависимости от условий среды, FtsZ способен формировать пучки. Хорошо известно, что FtsZ формирует Z-кольцо, которое в *Escherichia coli* и нескольких других изученных бактериях выступает динамичным и неоднородным (состоящим

из неких кластеров, точная структура которых до сих пор неизвестна) каркасом для целого комплекса белков деления — так называемой дивисомы (Du, Lutkenhaus, 2019). В настоящее время считают, что основная роль FtsZ — направлять процесс перестройки клеточной стенки, согласуя его в пространстве и во времени с другими процессами, в том числе с сегрегацией ДНК. FtsZ имеется у большинства бактерий и архей, а также в некоторых органеллах эукариот — в хлоропластах растений и в митохондриях некоторых видов простейших (Santana-Molina et al., 2022).

Еще один бактериальный родственник тубулинов и FtsZ, называемый TubZ, имеется у некоторых видов бактерий и вовлечен в сегрегацию ДНК внутри бактериальной клетки. Белки TubZ кодируются несколькими крупными плазмидами *Bacillus* spp., включая плазмиду pXO1 *Bacillus anthracis*, и образуют в клетках нитевидные структуры, которые вытягиваются вдоль клетки. TubZ необходим для правильного распределения малокопийных плазмид между дочерними клетками. Считается, что полимеры TubZ посредством тредмиллинга в сочетании с ДНК-связывающими белками действуют как своеобразное примитивное веретено деления для плазмиды (Larsen et al., 2007). Интригующим представляется происхождение TubZ: предполагается, что он происходит от архейного, а не бактериального FtsZ (см. рис. 1) (Santana-Molina et al., 2022).

Еще один гомолог тубулина — PhuZ — имеется не у бактерий, а у некоторых гигантских бактериофагов. Белок PhuZ полимеризуется с образованием трехпечочной нити, которая помогает позиционировать так называемое псевдодро посередине клетки, а также обеспечивает вращение псевдодро и транспорт прокапсидов от мембраны клетки к псевдодру (Chaikerasitak et al., 2021).

Интересные гомологи тубулинов обнаружены у представителей *Verrucomicrobia*, группы необычных бактерий, которые имеют некоторые общие характеристики с бактериями из филогенетических групп *Chlamydiae* и *Planctomycetes*, включая отсутствие FtsZ. *Verrucomicrobia*, такие как *Prostheco bacter*, содержат белки, называемые VtubA и VtubB, которые по аминокислотной последовательности более похожи на тубулин, чем на FtsZ. VtubA и VtubB образуют структуры, напоминающие микротрубочки эукариот и называемые “бактериальными микротрубочками”. Эти структуры имеют общие важные свойства со своими эукариотическими аналогами, такие как прямые протофиламенты и латеральные взаимодействия протофиламентов. Однако бактериальные микротрубочки состоят только из пяти протофиламентов вместо 13, типичных для эукариот (Pilhofer et al., 2011).

В археях также имеется несколько гомологов тубулинов. Наряду с FtsZ, у них имеются белки CetZ, FtsZ-подобные белки и другие, которые

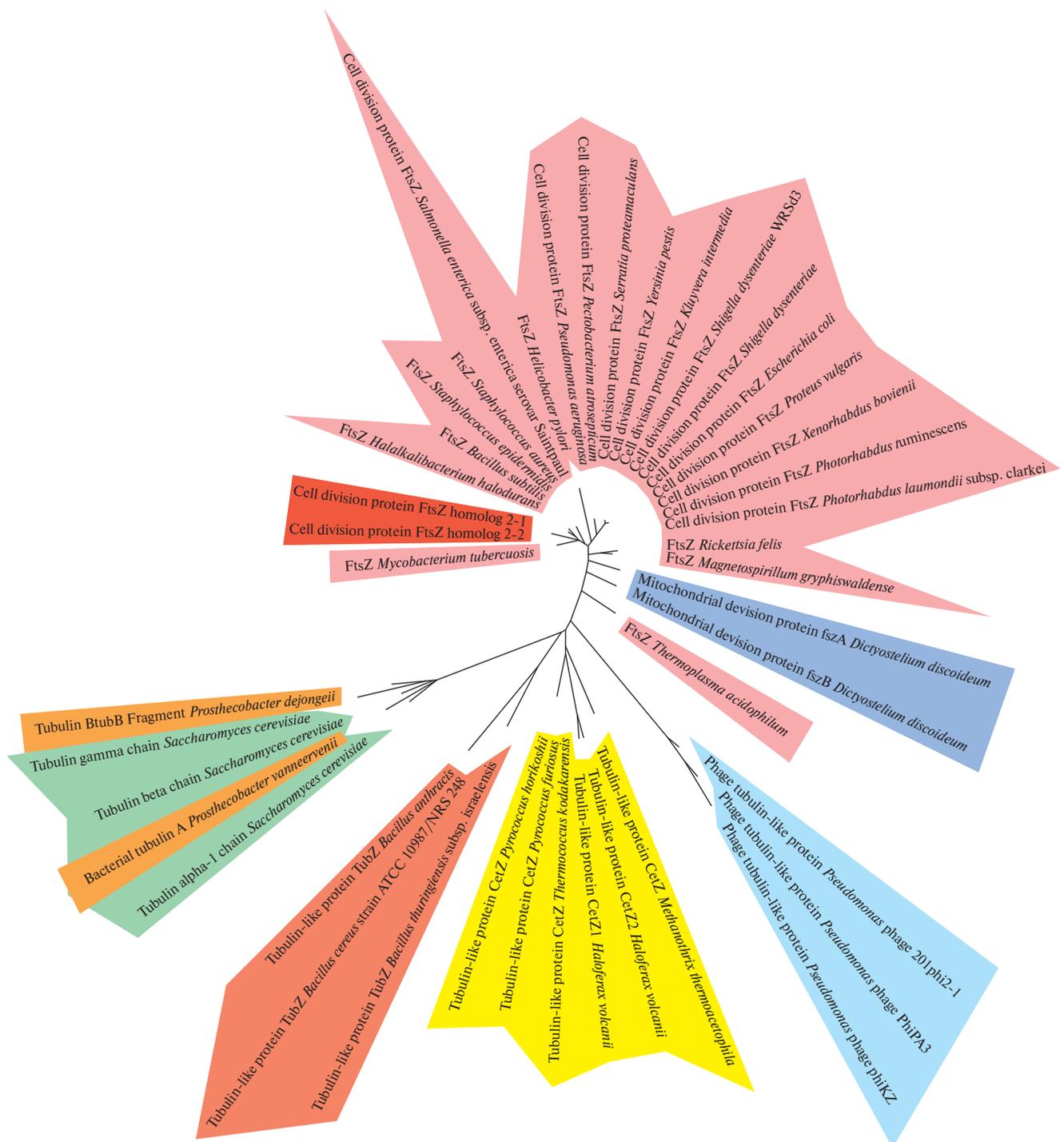


Рис. 1. Филогенетическое дерево бактериальных и архейных FtsZ (сиреневый цвет), FtsZ хлоропластов (темно-красный цвет,верху слева), митохондриальных FtsZ (синий цвет), архейных CetZ (желтый цвет, внизу слева), TubZ (светло-красный цвет), VtubA и VtubB (оранжевый цвет) и дрожжевых тубулинов (светло-зеленый цвет), PhuZ (голубой цвет). Филогенетическое дерево было построено с помощью программного обеспечения IQ-TREE методом максимального правдоподобия и визуализировано с помощью ITOL.

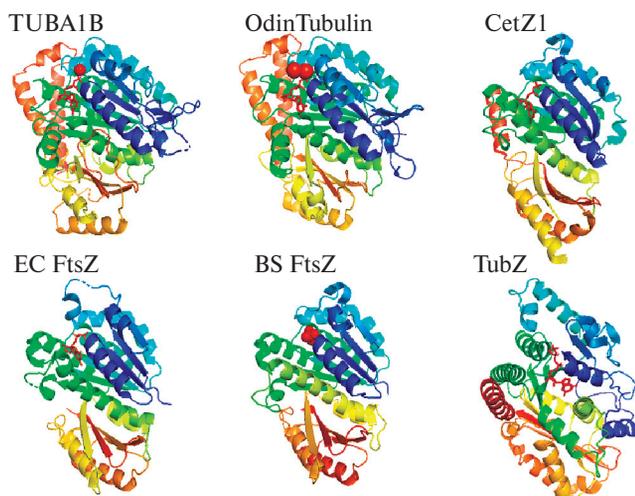


Рис. 2. Трехмерные структуры белков-гомологов тубулина в комплексе с нуклеотидом (ГТФ или ГДФ, обозначен красным). TUBA1B — α -тубулин человека типа 1B (идентификатор PDB: 7pjf); OdinTubulin — белок асгардархей OdinTubulin из *Candidatus Odinarchoaeum yellowstonii* (идентификатор PDB: 7EVV); CetZ1 — белок CetZ1 архей *Haloferax volcanii* (идентификатор PDB: 4b46); EC FtsZ — белок FtsZ *E. coli* (идентификатор PDB: 6UNX); BS FtsZ — белок FtsZ *B. subtilis* (идентификатор PDB: 2vam); TubZ — белок TubZ *Bacillus thuringiensis* (идентификатор PDB: 3m89). Цветовая кодировка соответствует положению в аминокислотной последовательности: синий цвет — N-конец, красный — C-конец.

демонстрируют довольно высокое сходство со структурами FtsZ и тубулинов (Duggin et al., 2015). Интересно отметить, что роль CetZ связана не с делением клеток, а с поддержанием формы клетки (Duggin et al., 2015).

В последующих главах белки-гомологи тубулина бактерий и архей рассматриваются более подробно.

FtsZ — ЯДРО АППАРАТА ДЕЛЕНИЯ ПРОКАРИОТ

FtsZ стал первым среди открытых белков цитоскелета прокариот. Задолго до этого в геноме *E. coli* был картирован локус, содержащий гены, мутации в которых приводили к температурной чувствительности бактерий: выше перmissive температуры клетки бактерий не делились, а удлинялись, превращаясь в так называемые филаменты (отсюда происходит название многих генов этого локуса, в том числе *ftsZ* — от англ. filamenting temperature sensitive Z) (Van De Putte et al., 1964; de Boer, 2016). В 1991 году при помощи иммуноэлектронной микроскопии было показано, что белок FtsZ формирует кольцевую структуру посередине клеток *E. coli* — то есть в плоскости деления клетки (Vi, Lutkenhaus, 1991). Вскоре наличие этой структуры было подтверждено при помощи флуоресцентной

микроскопии в *E. coli* и *Bacillus subtilis* (Harry et al., 1995; Addinall et al., 1996). Было показано, что FtsZ является ГТФазой и способен формировать полимеры в условиях *in vitro* (de Boer et al., 1992; Bramhill, Thompson, 1994). Свойства FtsZ явно указывали на сходство его с тубулином, что и было подтверждено после получения его кристаллической структуры.

Кристаллическая структура FtsZ

В 1998 году была впервые опубликована кристаллическая структура FtsZ из архей *Methanocaldococcus jannaschii* (далее MjFtsZ), включающая два основных домена белка, в частности, N-концевой ГТФ-связывающий домен и C-концевой домен, что показало высокое сходство трехмерной структуры FtsZ с эукариотическим белком цитоскелета тубулином (Löwe, 1998). Как в тубулине, так и в FtsZ N-концевой домен состоит из шести β -листов, расположенных параллельно и окруженных α -спиралями H1–H6. На рис. 2 представлена структура α -тубулина, а также 2 структуры белков FtsZ *E. coli* и *B. subtilis*; структура MjFtsZ не показана на рисунке, однако она имеет высокое сходство со структурами указанных белков FtsZ, за исключением нескольких отличий. В частности, MjFtsZ несет дополнительную α -спираль H0 на N-конце, которая отсутствует в тубулине и белках FtsZ других описанных организмов. Кроме спирали H0, MjFtsZ дополнительно имеет длинный (около 30 аминокислот) N-концевой фрагмент, выступающий за пределы глобулы. Данный фрагмент значительно короче у других бактерий, таких как *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium tuberculosis* (Silber et al., 2020). C-концевой домен FtsZ состоит из четырех параллельно расположенных β -листов (S7–S10), которые окружены α -спиралями H8–H10; он соединен с N-концевым доменом через центральную α -спираль H7, при этом между двумя доменами имеется так называемая междоменная щель (англ. interdomain cleft). Тубулин по сравнению с FtsZ несет две дополнительные длинные α -спирали на C-конце (H11 + H12), в то время как FtsZ имеет структуру в виде двух β -листов (S11 + S12) в этом положении.

Сравнивая структуру различных гомологов тубулина (см. рис. 2), можно сделать вывод о том, что N-концевой домен намного более консервативен, чем C-концевой, что справедливо как среди ортологов одного типа белка (например, FtsZ), так и среди различных типов белков. Например, в 2020 году при сравнении трехмерных структур белков FtsZ у 20 микобактерий выявили, что N-концевой домен высоко консервативен во всех микобактериях, в то время как C-концевой домен вариативен, в особенности на участке 340–380 аминокислот (Hong et al., 2013).

Полимеры FtsZ и Z-кольцо

Все известные функции FtsZ выполняются в его полимерной форме (например, в Z-кольце). Как тубулин и все его гомологи, FtsZ может гидролизовать ГТФ только в полимерной форме, поскольку каталитический карман образуется на границе раздела между двумя соседними мономерами FtsZ (Oliva et al., 2004). Основные каталитические остатки входят в состав петли T7 и спирали H8 субъединицы FtsZ над поверхностью раздела между двумя мономерами. После того как мономер FtsZ гидролизует связанный ГТФ, он сохраняет ГДФ до тех пор, пока не отделится от протофиламента и не сможет обменять ГДФ на ГТФ. Гидролиз ГТФ каждой молекулой FtsZ не зависит от гидролиза в других субъединицах протофиламента. Протофиламенты содержат смесь субъединиц, связанных с ГДФ и ГТФ. Поскольку присоединение происходит преимущественно с одного конца протофиламента (Du et al., 2018), этот случайный процесс создает градиент, состоящий в основном из субъединиц, связанных с ГТФ, на одном конце протофиламента, и в основном из субъединиц, связанных с ГДФ, на другом конце протофиламента (Corbin, Erickson, 2020). По-видимому,

именно это свойство протофиламентов FtsZ является основой для тредмиллинга (см. ниже).

Основная роль белка FtsZ связана с клеточным делением (Haeusser, Margolin, 2016; Du, Lutkenhaus, 2019; Vedyaykin et al., 2019). В отличие от тубулина, FtsZ не формирует микротрубочки; при этом боковые (или латеральные) взаимодействия между протофиламентами FtsZ способствуют образованию пучков и других структур, таких как спирали. Кроме того, взаимодействующие между собой протофиламенты FtsZ формируют Z-кольцо — главную структуру, формируемую в клетке белком FtsZ (McQuillen, Xiao, 2020).

Структуры полимеров FtsZ в составе Z-кольца в клетках были исследованы несколькими способами. Традиционная флуоресцентная микроскопия и иммуноэлектронная микроскопия не позволяют в деталях визуализировать Z-кольцо, поэтому долгое время предполагали, что Z-кольцо может быть однородной и даже замкнутой структурой (Erickson et al., 2010). Действительно, при визуализации методом криоэлектронной томографии *in vivo* в нескольких работах было показано, что нити FtsZ в клетке имеют ширину приблизительно 5.7 нм, соответствующую ширине одиночного мономера,

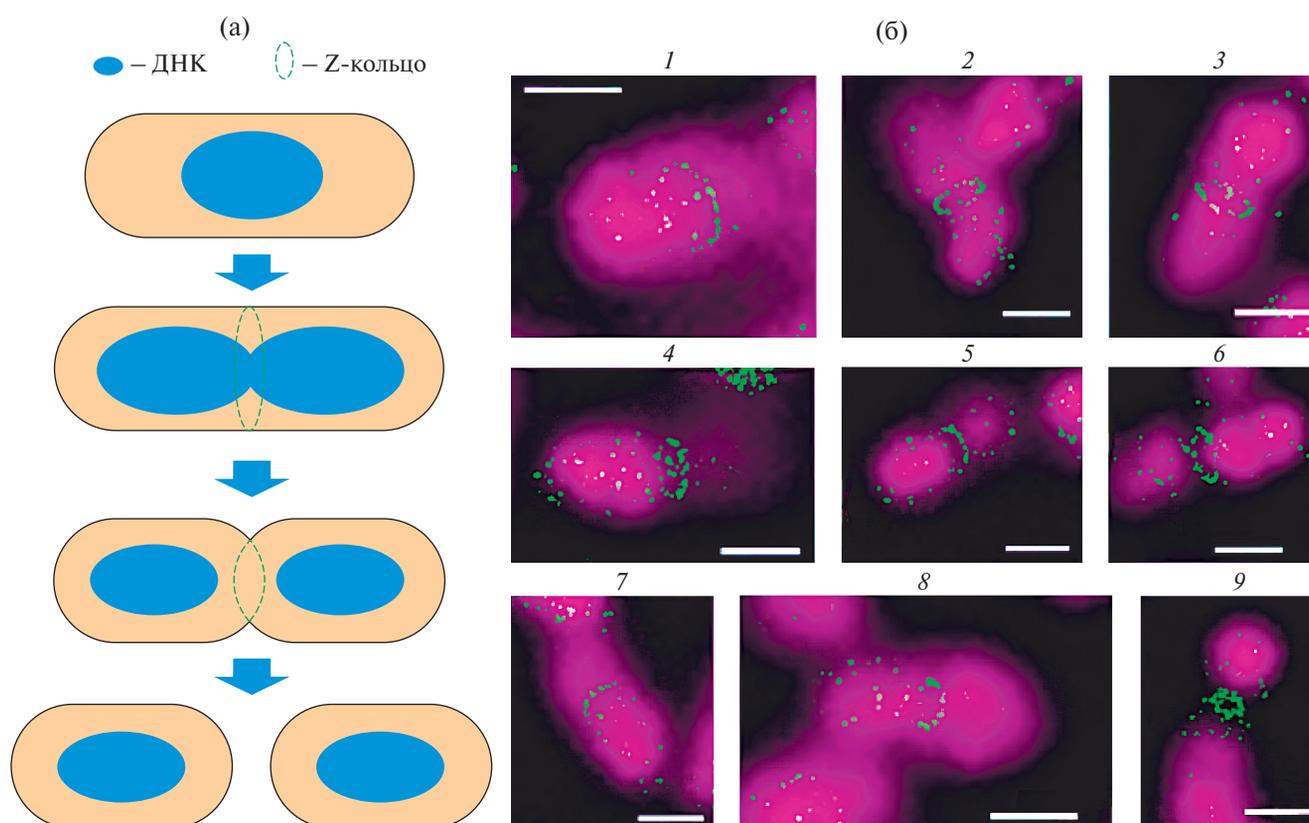


Рис. 3. Роль белка FtsZ в делении бактериальной клетки. Слева — схема бинарного деления бактерий: после репликации ДНК (синие овалы) посередине клетки образуется Z-кольцо (зеленая линия), которое в процессе деления постепенно сужается. Справа — визуализация Z-кольца во время цитокинеза при помощи сверхразрешающей микроскопии; микрофотографии, обозначенные цифрами от 1 до 9, упорядочены приблизительно в порядке сокращения Z-кольца. Фиолетовым отмечена ДНК, зеленым — FtsZ (цитировано по Vedyaykin et al., 2016).

длину ~100 нм и находятся на расстоянии ≈ 16 нм от мембраны, которое обеспечивают мембранные белки FtsA и ZipA (Szwedziak et al., 2014; Yao et al., 2017), при этом Z-кольцо представляет собой относительно однородную структуру, хотя в одной из работ была продемонстрирована менее однородная структура Z-кольца (Li et al., 2007). Визуализация Z-колец при помощи сверхразрешающей световой микроскопии (см. рис. 3), напротив, свидетельствует о том, что Z-кольцо является прерывистой структурой, которая состоит из характерных кластеров размерами 50–100 нм и простирается радиально вглубь клетки примерно на 50–100 нм (Fu et al., 2010; Holden et al., 2014; Vedyaykin et al., 2016; Mahone, Goley, 2020). В настоящее время больше склоняются к тому, что Z-кольцо является неоднородной структурой (Mahone, Goley, 2020). Тем не менее, несмотря на активное изучение, точная структура Z-кольца пока не выяснена.

Основная роль Z-кольца — это формирование каркаса для других белков дивисомы (комплекса белков деления). FtsZ направляет активность других белков деления (в особенности, вовлеченных в перестройку клеточной стенки). Тем не менее имеются аргументы в пользу существования дополнительной функции у белка FtsZ — сократительной (т.е. способности деформировать мембрану). На основании данных, полученных в экспериментах *in vitro* с искусственными мембранными пузырьками (липосомами), предполагают, что белок FtsZ оказывает достаточную по величине силу для деформации цитоплазматической мембраны как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (Osawa, Erickson, 2018). Однако продемонстрированная способность FtsZ деформировать мембрану не является достаточным аргументом для вывода о том, что данное свойство важно в процессе деления, в том числе потому, что, кроме мембраны, оболочка бактерий, как правило, содержит клеточную стенку, деформировать которую FtsZ не в состоянии. Кроме того, на основании экспериментов по длительному наблюдению за дивисомой в клетке при помощи современных методов световой микроскопии известно, что FtsZ диссоциирует из сайта деления, прежде чем окончательно сформируется перегородка между дочерними клетками. Следовательно, как минимум на последнем этапе формирования септы FtsZ не генерирует сократительную силу (Soderstrom et al., 2014). Несмотря на сомнения в значимости сократительной функции белка FtsZ, данный вопрос пока не закрыт и требует дополнительного изучения. Можно предположить, что сократительная функция FtsZ более важна для бактерий, не имеющих клеточной стенки, например, для молликут (часто собираемых называемых микоплазмами), так как единственной оболочкой таких бактерий является цитоплазматическая мембрана, которая может быть деформирована полимерами FtsZ (Vedyaykin et al., 2019).

За последние 5 лет было выяснено, что важным свойством белка FtsZ (и его гомологов среди бактерий и архей, что обсуждается в последующих главах) является тредмиллинг, который характерен и для тубулина (Margolis, Wilson, 1998; Corbin, Erickson, 2020). Тредмиллинг — это направленное движение полимера путем непрерывной полимеризации на одном конце полимера одновременно с деполимеризацией на противоположном конце, в то время как отдельные мономеры в полимере остаются неподвижными. Как у *E. coli*, так и у *B. subtilis* было обнаружено, что кластеры FtsZ в Z-кольце демонстрируют направленное движение со скоростью приблизительно 25–30 нм/с вдоль окружности Z-кольца. Это направленное движение не зависит от активности синтеза клеточной стенки, регуляторов сборки Z-кольца и его стабилизаторов, но тесно связано с ГТФазной активностью FtsZ (McQuillen, Xiao, 2020).

Роль тредмиллинга в процессе деления до сих пор до конца неизвестна. Тем не менее исследования динамики FtsZ в процессе цитокинеза позволили сделать вывод, что тредмиллинг, вероятно, выполняет две функции: во-первых, тредмиллинг, вместе с латеральными взаимодействиями протофиламентов, обеспечивает упаковку отдельных полимеров FtsZ в более плотную структуру Z-кольца, инициируя процесс сборки зрелой дивисомы, во-вторых, тредмиллинг перемещает другие компоненты дивисомы, управляя, таким образом, работой других белков деления, в том числе обеспечивающих ремоделирование клеточной стенки (Bisson-Filho et al., 2017; McCausland et al., 2021; Whitley et al., 2021).

Связь FtsZ с другими белками деления

Для осуществления клеточного деления в состав дивисомы привлекается множество других белков, которые взаимодействуют с FtsZ, прикрепляя Z-кольцо к мембране, и выполняют другие функции. Идентифицировано в общей сложности более 35 белков, участвующих в клеточном делении *E. coli* (Du, Lutkenhaus, 2017). Как показано для двух модельных организмов, *B. subtilis* и *E. coli*, сборка дивисомы может быть разделена на две последовательные стадии. На первой стадии с участием ранних белков клеточного деления на внутренней стороне цитоплазматической мембраны образуется Z-кольцо. Эти белки важны для связывания полимеров FtsZ с мембраной или выполняют другие регуляторные функции во время созревания Z-кольца. Ранние белки включают гомолог тубулина FtsZ и его мембранные якоря FtsA и ZipA, которые образуют так называемое прото-кольцо вместе с несколькими белками, ассоциированными с Z-кольцом (ZapA-G). На второй стадии поздние белки клеточного деления, включая ферменты, вовлеченные в синтез пептидогликана, привлекаются в место будущего деления, что обеспечивает синтез

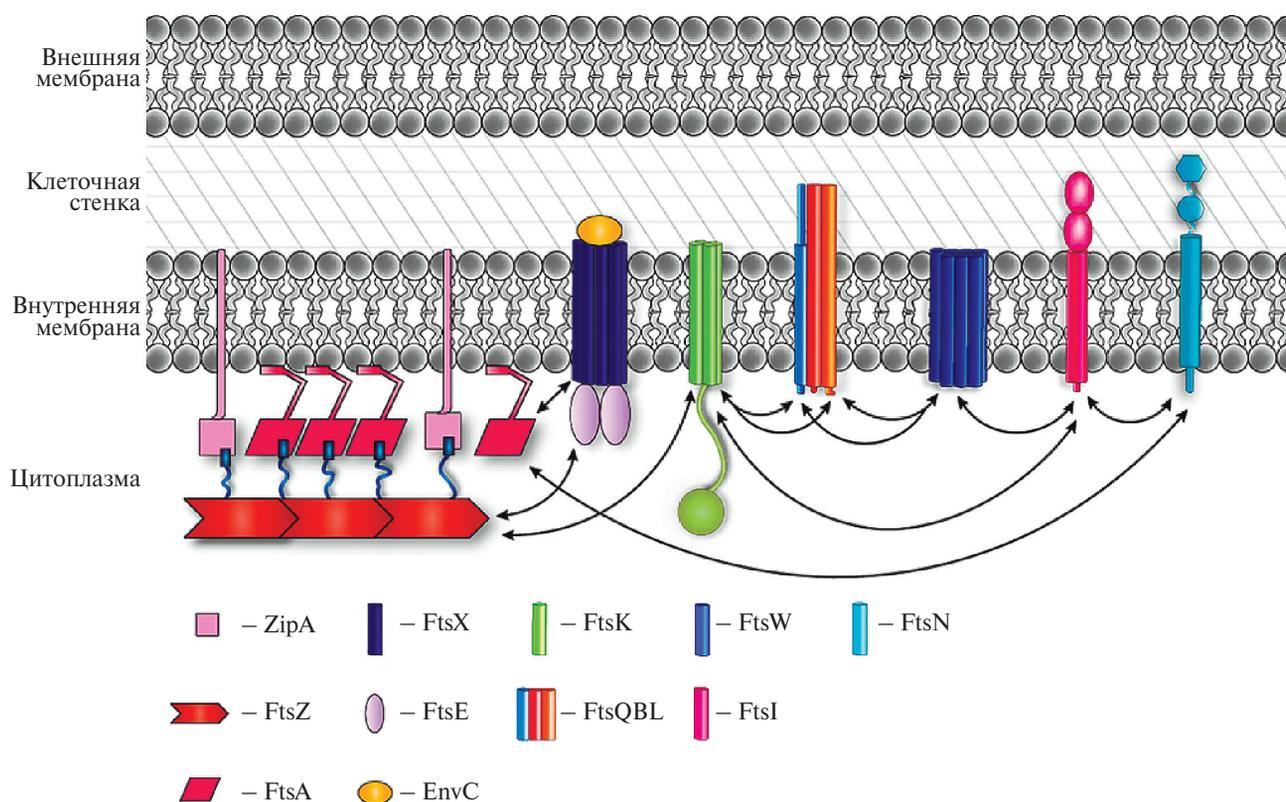


Рис. 4. Состав бактериальной дивисомы на примере *E. coli*. В верхней части указана локализация основных белков дивисомы относительно мембран и клеточной стенки, а также друг относительно друга. Межбелковые взаимодействия отражены контактом белков (например, между FtsE и FtsX), а также стрелками (цитировано по Vedyaykin et al., 2019).

септального пептидогликана и, наконец, цитокинез. Белковый комплекс ABC-транспортер FtsEX следует за ранними белками и, вероятно, участвует в дальнейшей сборке дивисомы. К поздним белкам относятся ДНК-транслоказа FtsK, а также FtsQ, FtsBL, FtsWI и FtsN и другие белки (Attaibi, den Vlaauwen, 2022). Основные белки дивисомы *E. coli* изображены на рис. 4.

Распространенность FtsZ

У бактерий и архей имеется несколько видов белков FtsZ. У большинства бактерий имеется только один белок FtsZ, хотя существуют и бактерии, у которых отсутствует FtsZ, и которые осуществляют клеточное деление иначе, например, представители *Chlamydia* (Ouellette et al., 2020). У большинства архей имеются два белка FtsZ — FtsZ1 и FtsZ2, в то же время есть археи с одним белком FtsZ, аналогично бактериям, что обсуждается далее в главе про архейные гомологи тубулина.

Интересно отметить, что кроме бактерий и архей, белки FtsZ имеются также в некоторых органеллах эукариотических клеток, что согласуется с гипотезой об их бактериальном происхождении. Одно из таких семейств, присутствующее во всех пластидах растительного царства и необходимое для деления, вероятно, произошло от FtsZ цианобактерий (см. рис. 1).

Хлоропластам модельного растения *Arabidopsis thaliana* для деления требуются два гомолога FtsZ: FtsZ1 и FtsZ2 объединяются и, подобно бактериальным и архейным FtsZ, образуют кольцо посередине пластиды (TerBush et al., 2013). Пониженная экспрессия белков FtsZ может быть ответственна за нарушение развития и деления хлоропластов растений, что приводит к образованию мутантов-альбиносов (Xie et al., 2023). Хотя митохондрии большинства эукариот не зависят от FtsZ, у некоторых простейших, включая *Dictyostelium discoideum*, есть гомологи FtsZ, которые участвуют в делении этих органелл. Подобно FtsZ хлоропластов, митохондриальные FtsZ кодируются ядром хозяина и наиболее похожи на FtsZ альфапротеобактерий, которые считаются их предшественниками (Kiefel et al., 2004).

BtubA/BtubB, TubZ И ДРУГИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГОМОЛОГИ ТУБУЛИНА

Белки BtubA/BtubB

Структуры, напоминающие микротрубочки в клетках эукариот, были найдены и в некоторых штаммах бактерий рода *Prostheco bacter*. Бактериальные микротрубочки формируются из протофиламентов белков BtubA и BtubB. Эти белки

являются более близкими гомологами эукариотических тубулинов, чем любой другой бактериальный белок. Последовательности генов *btubA* и *btubB* *Prostheco bacter de jongeei* на 35% идентичны последовательностям α - и β -тубулина (Jenkins et al., 2002). Строение бактериальных микротрубочек схоже со строением микротрубочек эукариот. Однако бактериальные микротрубочки меньше в диаметре в силу того, что они состоят не из тринадцати, а из пяти взаимодействующих протофиламентов, что было показано методом криоэлектронной томографии (Pilhofer et al., 2011).

Было показано, что *VtubA* и *VtubB* способны полимеризоваться в присутствии ГТФ и магния, образуя гетероолигомеры. Полученные структуры *VtubA/VtubB* также демонстрируют высокую гомологию со структурами тубулинов. Наблюдаемые отличия обусловлены, преимущественно, разными конформациями. В отличие от *FtsZ*, в структуре *VtubA* и *VtubB* присутствуют некоторые элементы, свойственные тубулинам, например, М-петля, участвующая в формировании микротрубочек, петля Н1-S2 (Schlieper et al., 2005). Такое сходство *VtubA* и *VtubB* с тубулинами предположительно может объясняться горизонтальным переносом генов тубулина от примитивных эукариот или архей к бактериям (Martin-Galiano et al., 2011). В литературе описаны методы очистки бактериального тубулина *VtubA/VtubB* и рекомбинантных белков, содержащих последовательности эукариотического тубулина, также описаны методы анализа их полимеризации (Andreu, Oliva, 2013). Было показано, что процесс полимеризации происходит лучше при низких концентрациях ионов калия, оптимум концентрации KCl в растворе составляет 50 мМ. Методом конфокальной флуоресцентной микроскопии была показана динамика полимеров в присутствии ГТФ, включая тредмиллинг и стохастическое переключение между сборкой и быстрой разборкой бактериальных микротрубочек (Díaz-Celis et al., 2017).

Когда очищенные *VtubA/VtubB* находятся внутри липосом, они организуются в различные цитоскелет-подобные структуры. Более того, бактериальные микротрубочки могут формировать сократительную силу и изменять форму липосом, подобно полимерам *FtsZ*. В контексте создания синтетической клетки, бактериальные микротрубочки могут помочь формировать липидные компартменты, обеспечивать полярность или направленный транспорт, а также участвовать в процессе деления (Kattan et al., 2021). Функция белков *VtubA/VtubB* в бактериальных клетках до сих пор остается неизвестной.

Белок *FtsZm*

В отличие от многих других бактерий, *Magnetospirillum gryphiswaldense* имеет два гомолога *FtsZ*: канонический *FtsZ*, управляющий процессом

деления в данных клетках, а также вариант с усеченным С-концом, названный *FtsZm*. Подобно основному белку *FtsZ*, его паралог *FtsZm* также обладает ГТФазной активностью и может образовывать гомо- и гетерополимеры с *FtsZ* в условиях *in vitro*. Бактерии *M. gryphiswaldense* интересны тем, что обладают внутриклеточной цепью окруженных мембраной кристаллов магнетита — магнетосом. Ген *ftsZm* расположен внутри оперона, контролирующего формирование магнетосом. Это заставляет предполагать, что *FtsZm*, по-видимому, не участвует в процессе деления клетки, а играет роль в биоминерализации магнетосом (Toro-Nahuelpan et al., 2019). Было показано, что удаление гена *ftsZm* приводит к образованию суперпарамагнитных кристаллов магнетита малого размера и чешуйчатой формы. При этом форма и размер кристаллов восстанавливаются с добавлением нитрата в питательную среду. Нарушение формирования магнетосом в отсутствие нитрата указывает на функциональную связь *FtsZm* с денитрификацией и окислительно-восстановительным контролем магнетосомного железа. Белок может выполнять функцию тонкой настройки соотношения Fe^{2+}/Fe^{3+} в магнетосомах в изменяющихся условиях окружающей среды. Данная функция, видимо, обеспечивается через прямое или косвенное взаимодействие *FtsZm* с окислительно-восстановительными белковыми комплексами. Флуоресцентная микроскопия показала, что *FtsZm* ко-локализуется с *FtsZ* в клетке. При наработке в клетках *E. coli* оба гомолога *FtsZ* образуют отдельные структуры, которые также ко-локализируются. Все это указывает на то, что *FtsZ* рекрутирует *FtsZm*. В экспериментах *in vitro* было показано, что *FtsZm* способен взаимодействовать с белком *FtsZ* (Müller et al., 2014). Цепь магнетосом располагается посередине клетки, при этом в процессе цитокинеза цепь расщепляется и распределяется по дочерним клеткам. После цитокинеза дочерние цепи магнетосом вновь позиционируются в середине клетки. Взаимодействие *FtsZ* и *FtsZm*, вероятно, обеспечивает согласованность процесса деления клетки с образованием и расщеплением цепи магнетосом.

Белок *TubZ*

Известно, что малокопийные плазмиды используют специализированные системы сегрегации, которые помогают поддерживать плазмиду в клетке. Эти системы состоят из моторного белка, формирующего филаменты, адаптерного белка, а также центрального региона на плазмидной ДНК. В зависимости от типа моторного белка системы сегрегации могут быть классифицированы следующим образом: системы типа I используют АТФазы типа *ParA*, которые, в сочетании с адаптерным белком *ParB*, обеспечивают сегрегацию по механизму броуновского хrapовика (Mishra, Srinivasan, 2022); системы типа II используют

актиноподобные филаменты, которые перемещают плазмиды к полюсам клетки перед делением, а системы типа III представляют собой семейство ГТФаз, родственных тубулину, названных TubZ. Белки TubZ были обнаружены на больших вирусных плаزمиде бактерий класса *Bacilli* (например, плазмиды *Bacillus thuringiensis* pBtoxis, *Bacillus anthracis* pXO1, *Bacillus sphaericus* pVsph и *Bacillus cereus* pVc23). Горизонтальный перенос генов *tubZ* и их отсутствие у филогенетически промежуточных видов усложняет исследование вопроса о происхождении семейства TubZ. Однако маловероятно, что TubZ имел эукариотическое происхождение, учитывая существенные отличия структуры самих белков и его филаментов от эукариотических тубулинов. При этом TubZ не так значительно отличается по своей последовательности и структуре от архейного CetZ, что позволяет предположить, что TubZ произошел именно от архейных гомологов тубулина (Fink, Aylett, 2017).

Известны кристаллические структуры TubZ *B. thuringiensis* и *B. cereus* (Ni et al., 2010; Hoshino, Hayashi, 2012). Сравнение этих структур между собой показывает, что аминокислотные остатки, участвующие в гидролизе ГТФ, не являются строго консервативными, однако в целом TubZ из разных видов бактерий демонстрирует схожую структуру. Важной особенностью TubZ является С-концевой фрагмент, который играет критическую роль как в стабилизации структуры TubZ, так и во взаимодействии с ДНК-связывающим белком TubR. В процессе сегрегации репликонов по механизму III типа адаптерный белок TubR связывается с центромерной последовательностью *tubC*, рекрутирует TubZ и стабилизирует его филаменты, при этом тредмиллинг филаментов TubZ способствует разделению ДНК (Mishra, Srinivasan, 2022). Также известна структура TubZ бактериофага *c-st Clostridium botulinum* (Oliva et al., 2012). В данном случае TubZ участвует в сегрегации профага, который сохраняется в виде плазмиды внутри клетки-хозяина. Стоит отметить, что структура данного белка более значительно отличается от предыдущих. Например, в ней отсутствует N-концевая α -спираль H0, располагающаяся в гидрофобном ядре белка между ГТФазным и активационным доменами. Данное различие фаговых и бактериальных структур TubZ, видимо, увеличивает специфичность этих систем сегрегации, так как при наличии нескольких внехромосомных элементов в одном организме может возникнуть конкуренция между системами сегрегации за счет неспецифических межбелковых и взаимодействий белок-ДНК.

TubZ демонстрируют более высокую степень структурной гомологии с FtsZ, чем с эукариотическими тубулинами. Например, N-концевая спираль H0 не является консервативной среди TubZ, то же наблюдается и в структурах FtsZ, как уже

было отмечено выше. Еще одной структурной общностью с FtsZ является отсутствие в TubZ структур, соответствующих тубулиновым M- и N-петлям, которые участвуют в латеральных взаимодействиях между протофиламентами. Видимо, данные структурные различия служат причиной тому, что филаменты, образуемые TubZ и FtsZ, обладают более простой структурой.

TubZ образует филаменты, которые перемещаются внутри клеток за счет тредмиллинга (Kim, 2019). При помощи флуоресцентной микроскопии с использованием зеленого флуоресцентного белка (GFP) удалось отследить динамику филаментов TubZ::GFP в клетках *B. thuringiensis*. Так было показано, что полимеры TubZ::GFP перемещаются вдоль всей клетки, изгибаясь при необходимости для перемещения вокруг полюса клетки и продолжая движение в обратном направлении (Larsen et al., 2007). Разбирающийся конец филамента связывается с комплексом TubRC. При этом из-за упомянутой выше стабилизации структуры за счет взаимодействия с TubR, разборка происходит только строго на конце филамента. Методом просвечивающей электронной микроскопии было показано, что филаменты очищенного белка TubZ *B. thuringiensis* и *C. botulinum in vitro* формируют четырехцепочечную спиральную структуру в присутствии ГТФ и ионов магния. В отличие от мономеров тубулина, мономеры TubZ должны приобретать скрученную конформацию в процессе полимеризации, чтобы формировать спиралевидную нить. Связывание молекулы ГТФ мономером и дальнейшая полимеризация индуцируют поворот N- и С-концевых доменов TubZ относительно друг друга; таким образом, происходит постепенное скручивание филамента. С-концевой фрагмент, связываясь со следующим мономером, управляет данными конформационными изменениями и обеспечивает правильное положение мономеров в спирали. В процессе сборки полимера каталитическая петля, таким образом, приближается к γ -фосфату в сайте связывания ГТФ, после чего может произойти гидролиз ГТФ. Вследствие гидролиза ГТФ происходит конформационное изменение, запускающее деполимеризацию (Fuentes-Pérez et al., 2017).

Белок PhuZ

Не только бактерии, но и бактериофаги используют белки-гомологи тубулина. Анализ баз данных геномных последовательностей фагов позволил найти фаговый гомолог тубулина, получивший название PhuZ. PhuZ является, в частности, продуктом гена *gp59* гигантского бактериофага *Pseudomonas chlororaphis* 201Ф2-1. Было показано, что PhuZ образует динамические филаменты, которые позиционируют фаговое псевдодро в центре клетки во время литического цикла. PhuZ также присутствует в геномах фагов *P. aeruginosa* ФКЗ,

ФРАЗ, KTN4, EL, и SL2, а также некоторых фагов, инфицирующих *Erwinia amylovora* и представителей родов *Vibrio* и *Bacillus* (Guan, Bondy-Denomy, 2020). Филаменты PhuZ формируют в клетке биполярное веретено — структуру из нитей PhuZ, исходящих из полюсов клетки к псевдоядру. При этом данная структура за счет тредмиллинга осуществляет позиционирование и вращение псевдоядра. Было показано, что нитям PhuZ свойственна структура не только биполярного веретена: фаг Goslag из *E. coli* собирает фаговое псевдодро, окруженное своеобразным вихрем из филаментов PhuZ (Birkholz et al., 2022), при этом данные филаменты менее упорядочены, чем в случае образования веретена PhuZ. Для некоторых видов фагов известно, что фаговые капсиды собираются на мембране и передвигаются по филаментам PhuZ к ядру (Prichard et al., 2023).

Белки PhuZ являются близкими гомологами TubZ, что подтверждается наличием общих консервативных элементов в структурах TubZ и PhuZ. Полученные структуры PhuZ бактериофагов 210Ф2–1 и ФКЗ демонстрируют одинаковые особенности конформации. Для PhuZ 210Ф2–1, в отличие от других известных структур TubZ и PhuZ, удалось разрешить структуру С-концевого домена, который в данном случае упорядочен в полимере относительно соседнего мономера (Fink, Aylett, 2017). Наиболее изученные к настоящему времени представители семейства PhuZ образуют динамическую структуру, представляющую собой трехцепочечный филамент. Процесс сборки филамента предположительно происходит по следующему механизму: ГТФ-связанные мономеры PhuZ будут связываться посредством взаимодействий между С-концевым хвостом одного мономера и связывающим карманом следующего мономера. Таким образом, формируются продольные димеры, три таких димера далее латерально связываются, происходит дальнейшая реорганизация С-концов для обеспечения контактов филаментов внутри гексамерного ядра (Zehr et al., 2014). Очевидно, что как минимум для некоторых видов белков PhuZ С-конец играет роль, не характерную для других тубулинов.

АРХЕЙНЫЕ ГОМОЛОГИ ТУБУЛИНА

Большинство архей имеют один или два гомолога FtsZ, которые выполняют функции, близкие к таковым у FtsZ бактерий, и обеспечивают формирование Z-кольца (Aylett, Duggin, 2017). При этом существует большая группа представителей *Crenarchaeota*, у которой не найдены близкие гомологи тубулина, и которая использует для клеточного деления механизм, основанный на ESCRT-III (CdvB) (Aylett, Duggin, 2017). Ключевыми комплексами эукариотической системы ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) являются ESCRT-III и Vps4 (CdvC у архей). Исследования показали, что данная система участвует

в процессах, связанных с инвагинацией и разрывом мембраны (например, во время выхода вируса из клетки), а также важна на финальной стадии деления Metazoa (Caspi, Dekker, 2018). Белки архей Cdv выполняют отличную от эукариотической системы ESCRT роль, хоть и являются гомологами, и их главные функции в процессе деления могут быть связаны с избыточной инвагинацией мембраны и синтезом клеточной стенки. Архейные белки-гомологи тубулина и FtsZ были изначально идентифицированы по связыванию с ГТФ (Baumann, Jackson, 1996). Сравнительный анализ показал, что данные гомологи FtsZ более близки к бактериальному FtsZ, чем к эукариотическому тубулину (см. рис. 1). Таким образом, FtsZ может претендовать на роль практически универсального белка, отвечающего за процесс деления бактерий и архей (далее гомологи FtsZ архей рассмотрены подробнее). В работе 2004 года были проанализированы открытые базы данных для поиска FtsZ и его гомологов (Vaughan et al., 2004). Авторы обнаружили гомологи FtsZ у всех классов (по классификации на момент публикации статьи) филума *Euryarchaeota* (в настоящий момент данный филум называется *Methanobacteriota*). Кроме того, авторы показали наличие у архей нескольких паралоогов FtsZ, которые, вероятно, произошли из-за дупликации FtsZ. В геноме архей могут встречаться белки FtsZ (один FtsZ или пара FtsZ1 и FtsZ2), несколько видов CetZ белков, а также неканонические белки с неизвестными функциями (Aylett, Duggin, 2017).

Архейные гомологи FtsZ и FtsZ-подобные белки

Первым среди белков-гомологов тубулина архей был найден FtsZ. У архей, как уже было указано, их может быть два гомолога, может быть один, а может и вовсе не быть белков FtsZ. FtsZ1 *Halobacterium volcanii* обладает способностью к полимеризации и обладает ГТФазной активностью при концентрации KCl выше 2 М, причем NaCl не способен заменить ионы калия (Aylett, Duggin, 2017). FtsZ1 *H. volcanii* локализуется посередине клетки и образует кольцевую структуру, подобную таковой у бактерий. Кольцо посередине клетки обнаруживается у большинства архей в растущей культуре, что говорит о том, что оно сохраняется на протяжении всего цикла. Кроме того, Z-кольцо присутствует в клетках, еще не имеющих заметного сужения в области будущего сайта деления, что говорит о том, что Z-кольцо формируется задолго до образования перетяжки между дочерними клетками. Мутант FtsZ1 (D250A) с точечной заменой в области петли T7, которая нарушает работу ГТФазного домена, блокирует процесс деления. Клетки при этом продолжают расти, но не способны делиться, в итоге формируются клетки гигантского размера. Интересно, что дополнительная экспрессия FtsZ2 в *H. salinarum* не приводит к каким-либо

изменениям в делении или клеточной форме, тогда как сверхэкспрессия FtsZ в *E. coli* и других бактериях нарушает процесс деления (Aylett, Duggin, 2017).

Также у архей были найдены FtsZ-подобные белки (англ. FtsZ-like group 1, FtsZL1). Данные белки были обнаружены по консервативному ГТФ-связывающему домену (Makarova, Koonin, 2010). Известно небольшое число последовательностей FtsZL1, однако они встречаются у архей разных классов, таких как *Methanomicrobia*, *Halobacteria* и *Thermococci*. Именно FtsZL1, расщепленный транспозоном, первый представитель суперсемейства FtsZ и тубулина, найденный у *Crenarchaeota*. Также найден нерасщепленный FtsZL1 у другого представителя *Crenarchaeota* — *Acidilobus saccharovorans*. Оба этих белка имеют необычные дополнительные длинные участки N-концевого, ГТФ-связывающего домена, вероятно, он предназначен для каких-либо дополнительных неизвестных функций. Структурная организация доменов у FtsZL1 в целом является нестандартной для белков-гомологов тубулина, так как в нем ГТФазный домен и С-концевой домен, которые вовлечены в полимеризацию, заменены другим, более крупным доменом с неизвестной структурой и функциями (Makarova, Koonin, 2010). Таким образом, способность полимеризоваться и осуществлять гидролиз ГТФ у FtsZL1 остается под вопросом. Ввиду консервативности соседних участков в геноме вокруг гена *ftsZL1* у разных видов, можно сделать предположение, что он вовлечен в процессы ремоделирования мембраны вместе со связанными белками.

Белки семейства CetZ

Среди геномов архей распространены дополнительные гены, относящиеся к суперсемейству FtsZ и тубулина (Duggin et al., 2015). В частности, данное явление встречается у галоархей, которые обитают в гиперсоленых экосистемах по всему миру и характеризуются разнообразием форм (Takashina et al., 1990; Burns et al., 2007), полученных на таком модельном организме как *H. volcanii*. Данный вид архей был выделен из Мертвого моря, он обладает высокой толерантностью к хлориду магния; оптимальная концентрация хлорида натрия, требуемая для роста, соответствует таковой в Мертвом море (Mullakhanbhai, Larsen, 1975). Самая большая группа белков архей, относящихся к суперсемейству FtsZ и тубулина, но не являющаяся FtsZ или тубулином, это белки CetZ (ранее назывались FtsZ3 (Vaughan et al., 2004) или FtsZ 2 типа). Название CetZ происходит от англ. “Cell-structure-related Euryarchaeota tubulin/FtsZ homolog” — связанный с клеточной структурой эвриархеот гомолог тубулина/FtsZ. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей показало, что белки семейства CetZ имеют мозаичную структуру: часть аминокислотных остатков соответствует

белку FtsZ, а часть — тубулину. Кристаллическая структура CetZ подтверждает эти данные (Duggin et al., 2015). Разница в аминокислотных остатках между CetZ и FtsZ сконцентрирована вокруг кармана связывания для ГТФ/ГДФ, что может указывать на различия в характере полимеризации данных белков (Brown, Duggin, 2023).

Исследование функций белков CetZ выполнялось на *H. volcanii*, у которой целых 6 открытых рамок считывания для генов, кодирующих гомологи CetZ. Удаление индивидуально каждого из этих генов не приводило к нарушениям в скорости роста или форме клеток (Duggin et al., 2015). Была исследована мутантная форма CetZ1 с точечной мутацией E218A (мутация в петле T7). Аналогичные мутации хорошо охарактеризованы и ведут к нарушению динамических свойств у FtsZ и тубулина, а именно препятствуют ГТФазной активности и диссоциации мономеров. За счет этого формируются длинные стабильные филаменты, нарушающие функции гомологов тубулина (Richards et al., 2000; Scheffers et al., 2002). Мутантная форма CetZ1 не приводит к нарушениям в процессе деления *H. volcanii*, в отличие от аналогичного мутанта FtsZ. Однако CetZ1 E218A ведет к нарушению подвижности архей. Они не образуют гало вокруг колонии при посеве на мягкий агар, также в популяции отсутствуют палочковидные клетки. Таким образом, CetZ1, по-видимому, отвечает за формирование палочковидных клеток, которые обладают подвижностью (Duggin et al., 2015). Для визуализации CetZ1 использовался зеленый флуоресцентный белок (GFP). Во время середины логарифмической фазы, когда клетки имели круглую форму, CetZ1 был локализован в виде точек, патчей и коротких филаментов разной интенсивности вблизи или в области оболочки клетки, особенно в участках с высокой кривизной (по краям клетки), а также в середине клетки и в области бороздки деления. В подвижных клетках CetZ1 локализуется в области одного или двух полюсов в виде точек, коротких филаментов и фокусов на самом конце клетки. В некоторых случаях он также локализовался посередине клетки. Интересно, что CetZ1::GFP так же, как и слитый с GFP FtsZ (Moore et al., 2017), не является полностью функциональным. Механизм контроля клеточной формы и подвижности под действием CetZ1 остается не до конца изученным и является важной задачей для будущих исследований.

CetZ2 консервативен среди многих видов архей и представляет собой отдельную от CetZ1 группу ортологов. Это указывает на то, что данные белки играют отдельную роль. Однако удаление гена *cetZ2* из генома *H. volcanii* не приводило к значимым изменениям в подвижности или форме клеток, в отличие от аналогичных экспериментов с CetZ1 (Duggin et al., 2015). При этом сверхэкспрессия

CetZ2, мутантного по ГТФазе, приводила к ингибированию формирования палочкообразных клеток, что обычно влекло за собой изменение подвижности. Таким образом, данный белок также вовлечен в контроль за формой клеток и их подвижностью. CetZ2 есть только у архей, у которых присутствует CetZ1, что говорит о том, что CetZ2 может быть функционально зависим от CetZ1 (Brown, Duggin, 2023). Данные белки находятся в регионах, консервативных среди архей. Функции этих генов могут указывать на пути, в которые может быть вовлечен CetZ. Возле *cetZ* расположены гены, отвечающие за метаболизм коферментов, сахаров и нуклеотидов. Таким образом, CetZ может участвовать в стабилизации и локализации некоторых метаболических путей. В локусе *cetZ2* соседние гены отвечают за способность клетки к подвижности и адгезии, а также за биосинтез мембраны и клеточной стенки. Также в этом регионе у большинства архей находятся несколько систем, связанных с пилями 4 типа. Хотя биологическая роль этого типа систем неизвестна, они обычно собираются в многокомпонентные внеклеточные комплексы, которые образуют филаменты, встроенные в клеточную оболочку, и отвечают за подвижность и способность к адгезии. В целом, регионы, связанные с пилями, обычно включают в себя 5–6 внеклеточных субъединиц филаментов и двух предсказанных белков оболочки. Возможно, по аналогии с FtsZ, белки CetZ2 могут действовать как каркас для сборки системы пилей 4 типа у некоторых архей.

Белки CetZ из *Thermococcales* образуют филогенетически когерентный кластер (Brown, Duggin, 2023). В отличие от класса *Halobacteria*, у *Thermococcales* имеется только один CetZ. Интересно также, что регион *cetZ* у данных видов архей содержит гены с хорошо предсказанными свойствами, которые характерны как для CetZ1, так и для CetZ2. По всей видимости, это свидетельствует о наличии дивергенции и последующей специализации белков CetZ. Порядки *Archaeoglobales* и *Methanomicrobiales* имеют один CetZ похожий на CetZ *Halobacteria*, а второй — на *Thermococcales*. Разница между этими двумя семействами CetZ во многом обусловлена разницей в M-петле, что указывает на важность этого региона для функций белка. Разнообразие в белках CetZ у архей свидетельствует о возможных различных функциях и молекулярных механизмах работы. Кроме того, это показывает эволюционные различия между разными видами архей, которые могут говорить о разных способах адаптации к окружающей среде.

Неканонические гомологи тубулина архей

Асгардархеи (англ. *Asgard* или *Asgardarchaeota*) — это филум архей, представители которых содержат некоторые специфичные для эукариот белки. В геномах этих архей также кодируются

белки-представители суперсемейства FtsZ и тубулина, который, вероятно, занимает промежуточное положение между FtsZ и эукариотическим тубулином. Данный белок был найден у *Odinarchaeota* и получил название OdinTubulin (Akil et al., 2022). Он формирует протофиламенты, схожие с эукариотическими микротрубочками, но при этом собирается в кольцо, похожее на Z-кольцо, формируемое FtsZ. Эволюционное давление на OdinTubulin могла оказывать увеличивающаяся в размерах хромосома, увеличение в размерах самой клетки во время эукариогенеза, что привело к формированию более жесткой структуры в микротрубочках. При полимеризации OdinTubulin образует широкие пучки и филаменты (Akil et al., 2022). При этом характер полимеризации отличается в буферах с разным составом. Для связывания ГТФ белку необходимы ионы магния, а также калия или натрия, при этом гидролиз ГТФ идет медленнее в присутствии натрия или при отсутствии магния. OdinTubulin способен формировать две формы полимеров: пучки прямых протофиламентов и трубочки, которые состоят из изогнутых протофиламентов. Так, прямые пучки формируются до гидролиза ГТФ, а после гидролиза формируются трубочки, что обеспечивает переход к изогнутой морфологии полимеров. Полный геном представителя *Odinarchaeota*—*Candidatus* *Odinarchaeum yellowstonii* LCB_4 был собран из образца, полученного из горячего источника в Йеллоустоуне, температура которого около 70°C (Tamarit et al., 2022). OdinTubulin полимеризуется как при 37°C, так и при 80°C (Akil et al., 2022). Однако при 80°C образуются более однородные и толстые структуры. При 4°C OdinTubulin не формирует трубочки, и наблюдаются незрелые кольца, которые, видимо, являются шаблоном для дальнейшего формирования трубочек. Кроме того, скорость полимеризации увеличивается при возрастании температуры. Высокая температура смещает равновесия для мономеров, которые могут быть связаны как с ГДФ, так и с ГТФ, в сторону тех, которые связаны с ГТФ. Также при высокой температуре увеличивается скорость гидролиза ГТФ и высвобождение фосфата, что, в свою очередь, приводит к искривлению протофиламента и формированию трубочки. Несмотря на изученные свойства данного белка, его точные функции в клетке остаются неизвестными; предполагается, что он может участвовать не только в клеточном делении. Данный гомолог тубулина также очень интересен с эволюционной точки зрения как промежуточное звено между бактериями и эукариотами, поэтому его изучение остается актуальной задачей.

Кроме описанных выше, найден также так называемый *Thaumarchaeota* FtsZ (Aylett, Duggin, 2017), который довольно далек от FtsZ и тубулина. Он образует маленькую группу с белком, найденным у *Korarchaeota* (имеет в геноме и FtsZ),

и, вероятно, не участвует в процессе деления. Возможно, данные белки позже будут переименованы и отнесены в отдельную группу в соответствии с их функциями, которые пока неизвестны. Еще один белок FtsZ/тубулин суперсемейства двух родов из *Thaumarchaeota* получил название Artubulin. Он находится в сестринской группе по отношению к эукариотическому тубулину на филогенетическом дереве. В геноме он находится рядом с генами компонентов ESCRT-III системы, участвующей в клеточном делении, что говорит о его возможном участии в работе данного механизма. Соответственно, Artubulin также может быть кандидатом на роль промежуточной стадии между бактериальным FtsZ и эукариотическим тубулином. Кроме того, существует еще большое количество белков, относящихся к суперсемейству FtsZ и тубулина, которые не охарактеризованы. Их изучение может пролить свет на эволюцию белков цитоскелета.

ГОМОЛОГИ ТУБУЛИНА КАК МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИБИОТИКОВ

Быстрый рост антибиотикорезистентности увеличивает потребность в новых антибактериальных препаратах (Han et al., 2021; Alotaibi, 2023). Благодаря жизненной важности белка FtsZ для процесса деления и его широкой распространенности среди прокариот, данный белок считается перспективной мишенью для антибактериальных агентов. Использование FtsZ в качестве мишени считается эффективным подходом для разработки новых антибиотиков, которые нарушают деление бактериальных клеток. За последнее десятилетие было идентифицировано большое количество природных и синтетических ингибиторов FtsZ (Panda et al., 2016; Silber et al., 2020; Pradhan et al., 2021).

Многие молекулы-ингибиторы FtsZ связываются с междоменной щелью данного белка (англ. interdomain cleft, IDC), тогда как другие соединения связываются с сайтом связывания ГТФ. Считается, что последние гораздо менее полезны в качестве потенциальных антимикробных терапевтических средств, поскольку они обычно демонстрируют цитотоксичность для клеток млекопитающих из-за высокого сходства последовательностей между сайтами связывания ГТФ FtsZ и тубулина (Pradhan et al., 2021). Междоменная щель FtsZ имеет гораздо меньшее сходство аминокислотной последовательности и трехмерной структуры с тубулином, что делает ее лучшей потенциальной мишенью для лекарств, так как такие лекарства менее токсичны для человека и животных.

Ингибиторы FtsZ растительного происхождения привлекательны как прообраз новых антибиотиков, поскольку они часто менее токсичны для клеток млекопитающих, чем синтетические ингибиторы (Pradhan et al., 2021). Среди ингибиторов

FtsZ природного происхождения наиболее интересными свойствами обладают следующие. Фенилпропаноиды представляют собой группу природных органических соединений, которые синтезируются растениями с использованием фенилаланина и тирозина. Большинство производных фенилпропаноидов обладают антибактериальной активностью и включают коричную кислоту, *n*-кумаровую кислоту, кофейную кислоту, хлорогеновую кислоту, эвгенол и феруловую кислоту. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) для этих соединений, отражающие их эффективность в отношении бактерий, обычно сравнительно высоки — порядка 100 мкг/мл (Nemaiswarya et al., 2011).

Сангвинарин представляет собой алкалоид, полученный из корневищ *Sanguinaria canadensis* (сангвинария канадская), обладающей широким спектром противомикробной активности. Сайт связывания сангвинарина с белком FtsZ пока не установлен, хотя его производные связываются с междоменной щелью (Casiraghi et al., 2020). И у *E. coli*, и у *B. subtilis* данный ингибитор вызывает филаментацию клеток вследствие нарушения деления клеток, что объясняется нарушением функции FtsZ. Однако он также ингибирует полимеризацию тубулина в микротрубочки и поэтому токсичен для клеток млекопитающих. На основе сангвинарина создано несколько ингибиторов FtsZ со сниженной токсичностью для клеток млекопитающих; некоторые из них демонстрируют МИК на уровне 0.1–5 мкг/мл.

Берберин — это растительный алкалоид, имеющийся во многих видах барбариса. Берберин веками использовался в качестве противомикробного терапевтического средства. Известно, что берберин ингибирует сборку FtsZ *E. coli* и его ГТФазную активность в условиях *in vitro*. На основе берберина синтезированы аналоги, связывающиеся с междоменной щелью FtsZ. Величина МИК для производных берберина составляет около 2–16 мкг/мл в отношении различных видов грамположительных бактерий. Кроме того, аналоги берберина предотвращают рост грамотрицательных микроорганизмов, таких как *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli*, при значениях МИК в пределах 32–128 мкг/мл (Di Somma et al., 2023).

Куркумин — это натуральное соединение, полученное из куркумы. На протяжении веков он известен как краситель и ароматизатор в Индии и Южной Азии, а также используется в традиционной медицине. Куркумин проявляет некоторые биологические свойства, такие как противораковое, антиоксидантное и антибактериальное действие. Было показано, что куркумин связывается с тубулином и обладает антипролиферативной активностью, разрушая микротрубочки. Наряду с тубулином, куркумин взаимодействует с FtsZ, стимулируя его ГТФазную активность.

Среди синтетических ингибиторов FtsZ одним из наиболее известных является представитель бензамидов PC190723, который связывается с междоменной щелью FtsZ (Haydon et al., 2008). PC190723 наиболее эффективен против грамположительных бактерий, которые имеют валин в положении, эквивалентном 307-й аминокислоте в FtsZ *E. coli*, таких как *S. aureus* и *B. subtilis*. Напротив, PC190723 неэффективен в отношении *E. coli*, хотя инактивация эффлюксной помпы AcrAB *E. coli* значительно повышает чувствительность к PC190723, что позволяет предположить, что устойчивость грамотрицательных бактерий к этому соединению, по крайней мере частично, объясняется быстрым выведением данного вещества из цитоплазмы. На основе PC190723 создано несколько производных веществ, обладающих улучшенными свойствами (Kaul et al., 2015).

Наряду с бензамидами, среди синтетических ингибиторов FtsZ представляют интерес пиримидиновые ингибиторы (Chan et al., 2013), зантрины (Sogawa et al., 2020), а также ингибиторы пептидной природы (Han et al., 2021) (впрочем, среди последних имеется несколько ингибиторов природного происхождения).

Для других прокариотических гомологов тубулина, таких как CetZ, TubZ и других, включая архейные FtsZ, нам не удалось найти описанных в литературе ингибиторов. Тем не менее разработка таких ингибиторов представляется востребованной, так как она может помочь контролировать бактериальные инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной обзорной работе рассмотрены основные гомологи тубулина, имеющиеся у прокариот. На настоящий момент обнаружено большое разнообразие этих гомологов, которые вовлечены в различные процессы. Наиболее изученным является белок FtsZ, который имеется у большинства бактерий и архей и вовлечен в ключевой для любой клетки процесс деления. Однако даже в случае FtsZ имеются значительные пробелы в наших знаниях о его свойствах, например, неизвестна точная структура Z-кольца, кроме того, не до конца понятно, как распределяются функции гомологов FtsZ у архей, в которых FtsZ обычно присутствует в двух экземплярах. Свойства других гомологов тубулина бактерий и архей изучены намного хуже; для многих из них неизвестны их точные функции, как, например, для бактериальных тубулинов VtubA/VtubB, роль которых в клетке остается загадкой.

Общим свойством для всех гомологов тубулина является их способность к связыванию и гидролизу ГТФ, а также к полимеризации. При этом различные гомологи тубулина формируют различные структуры в клетке, начиная от одиночных

филаментов и пучков в случае FtsZ и заканчивая бактериальными микротрубочками, формируемыми VtubA/VtubB.

Кроме клеточного деления, гомологи тубулина бактерий и архей вовлечены в различные клеточные процессы, такие как поддержание положения ДНК в клетке в случае TubZ и PhuZ, регуляция морфологии клетки в случае CetZ. Вероятно, в будущем будут открыты и другие роли гомологов тубулина. Для этого требуется их дальнейшее изучение.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность коллективу НИК “Нанобиотехнологии” СПбПУ за комфортную творческую среду.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РНФ (проект № 22-24-00085).

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

- Addinall S. G., Bi E., Lutkenhaus J. FtsZ ring formation in fts mutants // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 3877–3884.
- Akil C., Ali S., Tran L. T., Gaillard J., Li W., Hayashida K., Hirose M., Kato T., Oshima A., Fujishima K., Blanchoin L., Narita A., Robinson R. C. Structure and dynamics of Odi-narchaeota tubulin and the implications for eukaryotic microtubule evolution // *Sci. Adv.* 2022. V. 8. Art. eabm2225.
- Alotaibi B. S. Targeting Filamenting temperature-sensitive mutant Z (FtsZ) with bioactive phytoconstituents: An emerging strategy for antibacterial therapy // *PLoS One.* 2023. V. 18. Art. e0290852.
- Andreu J. M., Oliva M. A. Purification and assembly of bacterial tubulin VtubA/B and constructs bearing eukaryotic tubulin sequences // *Methods Cell Biol.* 2013. V. 115. P. 269–281.
- Attaibi M., den Blaauwen T. An updated model of the divisome: regulation of the septal peptidoglycan synthesis machinery by the divisome // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. Art. 3537.
- Aylett C. H.S., Duggin I. G. The tubulin superfamily in Archaea // *Subcell. Biochim.* 2017. V. 84. P. 393–417.

- Baumann P., Jackson S. P.* An archaeobacterial homologue of the essential eubacterial cell division protein FtsZ // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 6726–6730.
- Bi E. F., Lutkenhaus J.* FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli* // Nature. 1991. V. 354. P. 161–164.
- Binarová P., Tuszyński J.* Tubulin: structure, functions and roles in disease // Cells. 2019. V. 8. Art. 1294.
- Birkholz E. A., Laughlin T. G., Armbruster E., Suslov S., Lee J., Wittmann J., Corbett K. D., Villa E., Pogliano J.* A cytoskeletal vortex drives phage nucleus rotation during jumbo phage replication in *E. coli* // Cell. Rep. 2022. V. 40. Art. 111179.
- Bisson-Filho A. W., Hsu Y. P., Squyres G. R., Kuru E., Wu F., Jukes C., Sun Y., Dekker C., Holden S., VanNieuwenhze M. S., Brun Y. V., Garner E. C.* Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division // Science. 2017. V. 355. P. 739–743.
- Bramhill D., Thompson C. M.* GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 5813–5817.
- Brown H. J., Duggin I. G.* Diversity and potential multifunctionality of archaeal CetZ tubulin-like cytoskeletal proteins // Biomolecules. 2023. V. 13. Art. 134.
- Burns D. G., Janssen P. H., Itoh T., Kamekura M., Li Z., Jensen G., Rodríguez-Valera F., Bolhuis H., Dyall-Smith M. L.* *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 387–392.
- Busiek K. K., Margolin W.* Bacterial actin and tubulin homologs in cell growth and division // Curr. Biol. 2015. V. 25. P. R243–R254.
- Cabeen M. T., Jacobs-Wagner C.* The bacterial cytoskeleton // Annu. Rev. Genet. 2010. V. 44. P. 365–392.
- Casiraghi A., Suigo L., Valoti E., Straniero V.* Targeting bacterial cell division: a binding site-centered approach to the most promising inhibitors of the essential protein FtsZ // Antibiotics (Basel). 2020. V. 9. Art. 69.
- Caspi Y., Dekker C.* Dividing the archaeal way: the ancient Cdv cell-division machinery // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 174.
- Chaaban S., Brouhard G. J.* A microtubule bestiary: structural diversity in tubulin polymers // Mol. Biol. Cell. 2017. V. 28. P. 2924–2931.
- Chaikeeratisak V., Birkholz E. A., Pogliano J.* The phage nucleus and PhuZ spindle: defining features of the subcellular organization and speciation of nucleus-forming jumbo phages // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 641317.
- Chan F. Y., Sun N., Neves M. A., Lam P. C., Chung W. H., Wong L. K., Chow H. Y., Ma D. L., Chan P. H., Leung Y. C., Chan T. H., Abagyan R., Wong K. Y.* Identification of a new class of FtsZ inhibitors by structure-based design and *in vitro* screening // J. Chem. Inf. Model. 2013. V. 53. P. 2131–2140.
- Cheng Z., Lu X., Feng B.* A review of research progress of antitumor drugs based on tubulin targets // Transl. Cancer Res. 2020. V. 9. P. 4020–4027.
- Chrétien D., Metz F., Verde F., Karsenti E., Wade R. H.* Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules // J. Cell. Biol. 1992. V. 117. P. 1031–1040.
- Corbin L. C., Erickson H. P.* A unified model for treadmilling and nucleation of single-stranded FtsZ protofilaments // Biophys. J. 2020. V. 119. P. 792–805.
- de Boer P., Crossley R., Rothfield L.* The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase // Nature. 1992. V. 359. P. 254–256.
- de Boer P. A.* Classic spotlight: discovery of *ftsZ* // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 1184.
- Di Somma A., Canè C., Rotondo N. P., Cavalluzzi M. M., Lentini G., Duilio A.* A comparative study of the inhibitory action of berberine derivatives on the recombinant protein FtsZ of *E. coli* // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Art. e00211.
- Díaz-Celis C., Risca V. I., Hurtado F., Polka J. K., Hansen S. D., Maturana D., Lagos R., Mullins R. D., Monasterio O.* Bacterial tubulins A and B exhibit polarized growth, mixed-polarity bundling, and destabilization by GTP hydrolysis // J. Bacteriol. 2017. V. 199. Art. e00211.
- Du S., Lutkenhaus J.* Assembly and activation of the *Escherichia coli* divisome // Mol. Microbiol. 2017. V. 105. P. 177–187.
- Du S., Lutkenhaus J.* At the heart of bacterial cytokinesis: the Z ring // Trends Microbiol. 2019. V. 27. P. 781–791.
- Du S., Pichoff S., Kruse K., Lutkenhaus J.* FtsZ filaments have the opposite kinetic polarity of microtubules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 10768–10773.
- Duggin I. G., Aylett C. H. S., Walsh J. C., Michie K. A., Wang Q., Turnbull L., Dawson E. M., Harry E. J., Whitchurch C. B., Amos L. A., Löwe J.* CetZ tubulin-like proteins control archaeal cell shape // Nature. 2015. V. 519. P. 362–365.
- Erickson H. P., Anderson D. E., Osawa M.* FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010. V. 74. P. 504–528.
- Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S., Hertzog J., Zietlow A., Carlomagno T., Kollmar M.* Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family // Genome Biol. Evol. 2014. V. 6. P. 2274–2288.
- Fink G., Aylett C. H. S.* Tubulin-like proteins in prokaryotic DNA positioning // Subcell. Biochem. 2017. V. 84. P. 323–356.
- Fu G., Huang T., Buss J., Coltharp C., Hensel Z., Xiao J.* *In vivo* structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photo-activated localization microscopy (PALM) // PLoS One. 2010. V. 5. Art. e12682.
- Fuentes-Pérez M. E., Núñez-Ramírez R., Martín-González A., Juan-Rodríguez D., Llorca O., Moreno-Herrero F., Oliva M. A.* TubZ filament assembly dynamics requires the flexible C-terminal tail // Sci. Rep. 2017. V. 7. Art. 43342.

- Guan J., Bondy-Denomy J. Intracellular organization by jumbo bacteriophages // *J. Bacteriol.* 2020. V. 203. Art. e00362.
- Gudimchuk N. B., Alexandrova V. V. Measuring and modeling forces generated by microtubules // *Biophys. Revs.* 2023. V. 15. Art. 1095.
- Haeusser D. P., Margolin W. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. V. 14. P. 305–319.
- Han H., Wang Z., Li T., Teng D., Mao R., Hao Y., Yang N., Wang X., Wang J. Recent progress of bacterial FtsZ inhibitors with a focus on peptides // *FEBS J.* 2021. V. 288. P. 1091–1106.
- Harry E. J., Pogliano K., Losick R. Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. P. 3386–3393.
- Haydon D. J., Stokes N. R., Ure R., Galbraith G., Bennett J. M., Brown D. R., Baker P. J., Barynin V. V., Rice D. W., Sedelnikova S. E., Heal J. R., Sheridan J. M., Aiwale S. T., Chauhan P. K., Srivastava A., et al. An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity // *Science.* 2008. V. 321. P. 1673–1675.
- Hemaiswarya S., Soudaminikkutty R., Narasumani M. L., Doble M. Phenylpropanoids inhibit protofilament formation of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ // *J. Med. Microbiol.* 2011. V. 60. P. 1317–1325.
- Holden S. J., Pengo T., Meibom K. L., Fernandez Fernandez C., Collier J., Manley S. High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* in vivo Z-ring organization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 4566–4571.
- Hong W., Deng W., Xie J. The structure, function, and regulation of *Mycobacterium* FtsZ // *Cell Biochem. Biophys.* 2013. V. 65. P. 97–105.
- Hoshino S., Hayashi I. Filament formation of the FtsZ/tubulin-like protein TubZ from the *Bacillus cereus* pXO1 plasmid // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 32103–32112.
- Janke C., Magiera M. M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21. P. 307–326.
- Jenkins C., Samudrala R., Anderson I., Hedlund B. P., Petroni G., Michailova N., Pinel N., Overbeek R., Rosati G., Staley J. T. Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 17049–17054.
- Kattan J., Doerr A., Dogterom M., Danelon C. Shaping liposomes by cell-free expressed bacterial microtubules // *ACS Synth. Biol.* 2021. V. 10. P. 2447–2455.
- Kaul M., Mark L., Zhang Y., Parhi A. K., Lyu Y. L., Pawlak J., Saravolatz S., Saravolatz L. D., Weinstein M. P., LaVoie E. J., Pilch D. S. TXA709, an FtsZ-targeting benzamide prodrug with improved pharmacokinetics and enhanced *in vivo* efficacy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. P. 4845–4855.
- Kiefel B. R., Gilson P. R., Beech P. L. Diverse eukaryotes have retained mitochondrial homologues of the bacterial division protein FtsZ // *Protist.* 2004. V. 155. P. 105–115.
- Kim K. W. Prokaryotic cytoskeletons: *in situ* and *ex situ* structures and cellular locations // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2019. V. 112. P. 145–157.
- Larsen R. A., Cusumano C., Fujioka A., Lim-Fong G., Patterson P., Pogliano J. Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis* // *Genes Dev.* 2007. V. 21. P. 1340–1352.
- Li Z., Trimble M. J., Brun Y. V., Jensen G. J. The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 4694–4708.
- Löwe J. Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii* // *J. Struct. Biol.* 1998. V. 124. P. 235–243.
- Mahone C. R., Goley E. D. Bacterial cell division at a glance // *J. Cell. Sci.* 2020. V. 133. Art. jcs237057.
- Makarova K. S., Koonin E. V. Two new families of the FtsZ-tubulin protein superfamily implicated in membrane remodeling in diverse bacteria and archaea // *Biology Direct.* 2010. V. 5. Art. 33.
- Margolis R. L., Wilson L. Microtubule treadmilling: what goes around comes around // *Bioessays.* 1998. V. 20. P. 830–836.
- Martin-Galiano A. J., Oliva M. A., Sanz L., Bhattacharyya A., Serna M., Yébenes H., Valpuesta J. M., Andreu J. M. Bacterial tubulin distinct loop sequences and primitive assembly properties support its origin from a eukaryotic tubulin ancestor // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 19789–19803.
- McCausland J. W., Yang X., Squyres G. R., Lyu Z., Bruce K. E., Lamanna M. M., Soderstrom B., Garner E. C., Winkler M. E., Xiao J., Liu J. Treadmilling FtsZ polymers drive the directional movement of sPG-synthesis enzymes via a Brownian ratchet mechanism // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. Art. 609.
- McQuillen R., Xiao J. Insights into the structure, function, and dynamics of the bacterial cytokinetic FtsZ-ring // *Annu. Rev. Biophys.* 2020. V. 49. P. 309–341.
- Mishra D., Srinivasan R. Catching a Walker in the act — DNA partitioning by ParA family of proteins // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 856547.
- Moore D. A., Whatley Z. N., Joshi C. P., Osawa M., Erickson H. P. Probing for binding regions of the FtsZ protein surface through site-directed insertions: discovery of fully functional FtsZ-fluorescent proteins // *J. Bacteriol.* 2017. V. 199. Art. e00553.
- Mullakhanbhai M. F., Larsen H. *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement // *Arch. Microbiol.* 1975. V. 104. P. 207–214.
- Müller F. D., Raschdorf O., Nudelman H., Messerer M., Katzmann E., Plitzko J. M., Zarivach R., Schüler D. The FtsZ-like protein FtsZm of *Magnetospirillum gryphiswaldense* likely interacts with its generic homolog and

- is required for biomineralization under nitrate deprivation // *J. Bacteriol.* 2014. V. 196. P. 650–659.
- Ni L., Xu W., Kumaraswami M., Schumacher M. A. Plasmid protein TubR uses a distinct mode of HTH-DNA binding and recruits the prokaryotic tubulin homolog TubZ to effect DNA partition // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 11763–11768.
- Oliva M. A., Cordell S. C., Löwe J. Structural insights into FtsZ protofilament formation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. V. 11. P. 1243–1250.
- Oliva M. A., Martin-Galiano A.J., Sakaguchi Y., Andreu J. M. Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 7711–7716.
- Osawa M., Erickson H. P. Turgor pressure and possible constriction mechanisms in bacterial division // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 111.
- Ouellette S. P., Lee J., Cox J. V. Division without binary fission: cell division in the FtsZ-less *Chlamydia* // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. Art. e00252–20.
- Panda D., Bhattacharya D., Gao Q. H., Oza P. M., Lin H. Y., Hawkins B., Hibbs D. E., Groundwater P. W. Identification of agents targeting FtsZ assembly // *Future Med. Chem.* 2016. V. 8. P. 1111–1132.
- Pilhofer M., Ladinsky M. S., McDowall A.W., Petroni G., Jensen G. J. Microtubules in bacteria: ancient tubulins build a five-prot filament homolog of the eukaryotic cytoskeleton // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. Art. e1001213.
- Pradhan P., Margolin W., Beuria T. K. Targeting the Achilles heel of FtsZ: the interdomain cleft // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 732796.
- Prichard A., Lee J., Laughlin T. G., Lee A., Thomas K. P., Sy A., Spencer T., Asavavimol A., Caffèratta A., Cameron M., Chiu N., Davydov D., Desai I., Diaz G., Guereca M., et al. Identifying the core genome of the nucleus-forming bacteriophage family and characterization of *Erwinia* phage RAY // *Cell. Rep.* 2023. V. 42. Art. 112432.
- Richards K. L., Anders K. R., Nogales E., Schwartz K., Downing K. H., Botstein D. Structure–function relationships in yeast tubulins // *Mol. Biol. Cell.* 2000. V. 11. P. 1887–1903.
- Santana-Molina C., Del Saz-Navarro D., Devos D. P. Early origin and evolution of the FtsZ/tubulin protein family // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 1100249.
- Scheffers D. J., de Wit J. G., den Blaauwen T., Driessen A. J. GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers // *Biochemistry.* 2002. V. 41. P. 521–529.
- Schlieper D., Oliva M. A., Andreu J. M., Löwe J. Structure of bacterial tubulin Tuba/B: evidence for horizontal gene transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 9170–9175.
- Silber N., Opitz C. L.M. d., Mayer C., Sass P. Cell division protein FtsZ: from structure and mechanism to antibiotic target // *Future Microbiol.* 2020. V. 15. P. 801–831.
- Soderstrom B., Skoog K., Blom H., Weiss D. S., von Heijne G., Daley D. O. Disassembly of the divisome in *Escherichia coli*: evidence that FtsZ dissociates before compartmentalization // *Mol. Microbiol.* 2014. V. 92. P. 1–9.
- Sogawa H., Sato R., Suzuki K., Tomioka S., Shinzato T., Karpov P., Shulga S., Blume Y., Kurita N. Binding sites of Zantrin inhibitors to the bacterial cell division protein FtsZ: molecular docking and ab initio molecular orbital calculations // *Chem. Physics.* 2020. V. 530. Art. 110603.
- Szwedziak P., Wang Q., Bharat T. A., Tsim M., Lowe J. Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division // *Elife.* 2014. V. 3. Art. e04601.
- Takashina T., Hamamoto T., Otozai K., Grant W. D., Horikoshi K. *Haloarcula japonica* sp. nov., a new triangular halophilic archaeobacterium // *Syst. Appl. Microbiol.* 1990. V. 13. P. 177–181.
- Tamarit D., Caceres E. F., Krupovic M., Nijland R., Eme L., Robinson N. P., Ettema T. J. G. A closed *Candidatus Odinnarchaeum* chromosome exposes Asgard archaeal viruses // *Nat. Microbiol.* 2022. V. 7. P. 948–952.
- TerBush A.D., Yoshida Y., Osteryoung K. W. FtsZ in chloroplast division: structure, function and evolution // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2013. V. 25. P. 461–470.
- Toro-Nahuelpan M., Corrales-Guerrero L., Zwiener T., Osorio-Valeriano M., Müller F.-D., Plitzko J. M., Bramkamp M., Thanbichler M., Schüler D. A gradient-forming MipZ protein mediating the control of cell division in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* // *Mol. Microbiol.* 2019. V. 112. P. 1423–1439.
- Van De Putte P., Van D., Roersch A. The selection of mutants of *Escherichia coli* with impaired cell division at elevated temperature // *Mutat. Res.* 1964. V. 1. P. 121–128.
- Vaughan S., Wickstead B., Gull K., Addinall S. G. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of Archaea, Bacteria, and Eukaryota // *J. Mol. Evol.* 2004. V. 58. P. 19–29.
- Vedyaykin A. D., Ponomareva E. V., Khodorkovskii M. A., Borchsenius S. N., Vishnyakov I. E. Mechanisms of bacterial cell division // *Microbiology (Moscow).* 2019. V. 88. P. 245–260.
- Vedyaykin A. D., Vishnyakov I. E., Polinovskaya V. S., Khodorkovskii M. A., Sabantsev A. V. New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells // *Microbiologyopen.* 2016. V. 5. P. 378–386.
- Walker R. A., O'Brien E.T., Pryer N. K., Soboeiro M. F., Voter W. A., Erickson H. P., Salmon E. D. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies // *J. Cell. Biol.* 1988. V. 107. P. 1437–1448.
- Weisenberg R. C. Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations // *Science.* 1972. V. 177. P. 1104–1105.
- Whitley K. D., Jukes C., Tregidgo N., Karinou E., Almada P., Cesbron Y., Henriques R., Dekker C., Holden S. FtsZ treadmilling is essential for Z-ring condensation and septal

- constriction initiation in *Bacillus subtilis* cell division // Nat. Commun. 2021. V. 12. Art. 2448.
- Xie W., Xu D., Chen F., Wang Z., Luo J., He Y., Zheng Q., Liu C. Integrated cytological, physiological, and transcriptome analyses provide insight into the albino phenotype of chinese plum (*Prunus salicina*) // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Art. 14457.
- Yao Q., Jewett A. I., Chang Y. W., Oikonomou C. M., Beeby M., Iancu C. V., Briegel A., Ghosal D., Jensen G. J. Short FtsZ filaments can drive asymmetric cell envelope constriction at the onset of bacterial cytokinesis // EMBO J. 2017. V. 36. P. 1577–1589.
- Zehr E. A., Kraemer J. A., Erb M. L., Coker J. K., Montabana E. A., Pogliano J., Agard D. A. The structure and assembly mechanism of a novel three-stranded tubulin filament that centers phage DNA // Structure. 2014. V. 22. P. 539–548.

Tubulin Homologs in Bacteria and Archaea

N. A. Rumyantseva¹, D. M. Golofeeva¹, A. A. Khasanova¹, and A. D. Vedyaykin^{1, *}

¹*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, Russia*

**e-mail: vedyajkin_ad@spbstu.ru*

Received October 25, 2023; revised November 28, 2023; accepted December 5, 2023

Abstract—While cytoskeletal proteins have long been considered to be present only in eukaryotes, but not in prokaryotes, homologs of the major cytoskeletal proteins, including tubulin, have been discovered in bacteria and archaea in the last 30 years. The properties of tubulin homologs, as well as of the cytoskeleton-like structures they form in prokaryotic cells, vary and differ significantly from the relevant properties of eukaryotic tubulins. The comparison of prokaryotic tubulin homologs with each other seems therefore to be an interesting task and thus is the goal of the current review. We consider such tubulin homologs found in bacteria and archaea as FtsZ, TubZ, PhuZ, BtubA/BtubB, CetZ, etc. The ability of various tubulin homologs to act as targets for pharmaceuticals, similar to the FtsZ protein, which is already a target for promising antibiotics, is also discussed.

Keywords: FtsZ, tubulin, CetZ, TubZ, PhuZ, BtubA, BtubB, cytoskeleton

УДК 579.8.06+579.266.4+574.522

СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О БИОРАЗНООБРАЗИИ АНОКСИГЕННЫХ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ В РЕЛИКТОВОМ ОЗЕРЕ МОГИЛЬНОЕ (ОСТРОВ КИЛЬДИН, МУРМАНСКАЯ ОБЛАСТЬ)

© 2024 г. В. М. Горленко^{a,*}, О. Н. Лунина^a, Д. С. Груздев^b, Е. Д. Краснова^c, Д. А. Воронов^d,
В. В. Беленкова^a, В. В. Козяева^{e,f}, А. С. Саввичев^a

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

^bSciBear OU, Таллин, 10115, Эстония

^cБеломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
Москва, 119234, Россия

^dИнститут проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, 127051, Россия

^eDepartment of Biology, University of Waterloo, Waterloo, ON, N2L 3G1 Canada

^fИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

*e-mail: vgorlenko@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После исправления 04.11.2023 г.

Принята к публикации 11.11.2023 г.

Реликтовое озеро Могильное, отделенное от Баренцева моря песчано-галечной дамбой, находится в высоких широтах Арктики на острове Кильдин (Мурманская область). Это озеро является классическим примером меромиктического водоема морского происхождения. Данные, полученные в экспедиции 2018 года, показали изменения гидрохимического режима озера, произошедшие за последние 20 лет. Содержание сульфида в мнимомolimнионе озера достигает 140 мг/л. Отмечена тенденция осолонения поверхностных вод озера до 7 г/л. Для оз. Могильное характерно несовпадение уровней галоклина и термоклина. Зона хемоклина в озере находится ниже уровня галоклина. В узком кислородсодержащем слое между 3 и 7.5 м в оз. Могильное существует аэробная микрофлора морского типа и морская фауна. Бактериальная пластина сформирована на границе сероводородного слоя, на глубине около 8 м и преимущественно состоит из зеленых серобактерий (ЗСБ). Преобладали коричневоокрашенные виды ЗСБ, содержащие бактериохлорофилл *e*. Сформированное ранее представление о биоразнообразии аноксигенных фототрофных бактериях (АФБ) по морфологическим признакам было скорректировано нами за счет метагеномных данных, полученных при анализе ДНК из двух проб озерной воды зоны хемоклина, а также дополнено выделением новых видов ЗСБ. Данные молекулярной диагностики подтвердили абсолютное доминирование соленоводного вида ЗСБ *Chlorobium phaeovibrioides*. Впервые из оз. Могильное выделены и идентифицированы коричнево- и зеленоокрашенные морфотипы *Prosthecochloris aestuarii*, а также выделен *Prosthecochloris* sp., содержащий бактериохлорофилл *c*. Подробно обсуждается таксономическая позиция *Pelodyction phaem*, постоянно присутствующего в оз. Могильное. Несмотря на частичную изолированность экосистемы оз. Могильное от материнского моря, основные свойства доминирующего вида ЗСБ, а также *Prosthecochloris aestuarii*, оказались сходными с филотипами, обитающими в озерах на побережье Белого моря, имеющего связь с акваторией Баренцева моря.

Ключевые слова: озеро Могильное, морские меромиктические водоемы, водообмен, стратификация, сероводородное заражение, аноксигенные фототрофные бактерии, микробные сообщества, бактериальная пластина

DOI: 10.31857/S0026365624030021

Озеро Могильное находится в высоких широтах Арктики (69°19'11" с.ш., 34°20'55" в.д.) на острове Кильдин (Мурманская область). Оно привлекает внимание гидрологов и биологов уже более ста лет (Исаченко, 1914; Дерюгин, 1927; Gorlenko et al., 1978; Иванов и соавт., 2001; Лунина и соавт., 2005; Strelkov et al., 2014, 2019; Krasnova et al., 2018; Краснова, 2021; Беленкова, Саввичев, 2021). Это сравнительно небольшой мезотрофный анхилиновый меромиктический водоем, содержащий



Рис. 1. Озеро Могильное. Остров Кильдин (Баренцево море). Фото Д. А. Воронова.

сульфид, с практически полным отсутствием циркуляции воды между слоями различной минерализации. От Баренцева моря оз. Могильное отделено с южной стороны дамбой из песка и гальки шириной 70 м и высотой до 5.4 м, через которую просачивается морская вода (рис. 1). С северной стороны в озеро поступают пресные поверхностные воды. В результате смешивания морских и пресных вод образуется устойчивая стратификация водных слоев от почти пресных на поверхности (соленость около 5‰) до соленых на дне (соленость до 30‰).

В озере выделяются три зоны: аэробная, анаэробная, с повышенным содержанием сероводорода, и переходная зона — хемоклина (миксолимнион). На нижней границе проникновения света формируется бактериальная пластина с преобладанием аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ) розового цвета. В начале XX века Б. Л. Исаченко первым исследовал бактериальную пластину оз. Могильное, располагавшуюся на глубине 12 м (Исаченко, 1914). Он определил, что розовый цвет ей придают пурпурные бактерии *Chromatium*, окисляющие сероводород в ходе аноксигенного фотосинтеза. Дальнейшие исследования, проведенные в 1973 году, показали, что бактериальная пластина поднялась до 9 м, и в ней преобладают коричневоокрашенные зеленые серные бактерии (ЗСБ), морфологически сходные с *Chlorobium phaeovibrioides*. Субдоминантами также были коричневоокрашенные ЗСБ *Pelodictyon phaeum* и *Prosthecochloris phaeoasteroidea*. Пурпурные серобактерии были малочисленными. В июне 1999 г. и сентябре 2001 г. были проведены сезонные исследования структуры сообщества АФБ, в процессе которых идентифицированы до вида культуры АФБ методом анализа гена 16S рРНК (Лунина и соавт., 2005). Было подтверждено доминирование в сообществе хемоклина оз. Могильное *Chlorobium phaeovibrioides*, штамм Мог 4. В этом исследовании не были обнаружены субдоминанты ЗСБ, определенные в 70-х годах XX века.

Последние масштабные экспедиции на оз. Могильное были предприняты в июле–августе и октябре 2018 года (Krasnova et al., 2018). Были выполнены гидрохимические исследования и отмечены тенденции изменения физико-химических характеристик водоема. Изучение таксономического статуса АФБ, входящих в состав бактериальной пластины, не проводилось. В представленной работе восполняется этот пробел.

Главной целью настоящего исследования было исследование видового разнообразия АФБ оз. Могильное в зоне хемоклина в конце лета 2018 года. Впервые был применен метод метагеномного анализа микробного сообщества. Параллельно планировалось выделение новых штаммов АФБ и их идентификация.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Физико-химические исследования вертикальной структуры водной толщи оз. Могильное были проведены в конце июля 2018 года. Процедура отбора водных образцов, а также использованные для анализа методы, описаны в предыдущих публикациях (Krasnova et al., 2018). Пробы воды для гидрохимических измерений отбирали с помощью силиконовой трубки, закрепленной на калиброванном тросе, и портативного медицинского насоса Whale Premium Submersible Pump GP1352 (Ирландия). Для получения данных о тонкой стратификации сообщества АФБ в зоне хемоклина отбирали пробы многошприцевым батометром конструкции Воронова (Воронов, Краснова, 2019) с интервалом 2.5 см по вертикали.

Учет общей численности микроорганизмов. Для учета общей численности микроорганизмов (ОЧМ) пробы воды фиксировали раствором глутаральдегида, конечная концентрация которого в пробе составляла 2%. 1–5 мл фиксированной пробы фильтровали через черные поликарбонатные фильтры (“Миллипор”) с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтры окрашивали раствором акридинового оранжевого. Препараты просматривали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus VX 41 с системой визуализации Image Scope Color (M) при увеличении $\times 1000$. Учет клеток проводили с экрана монитора в 20-ти полях зрения.

Культивирование. Первичные посеы АФБ были выполнены из воды, отобранной с глубины 7.8 и 8.0 м. Штаммы выделяли и культивировали при 28°C на свету (2.000 лк), используя среду следующего состава (г/л): NH_4Cl — 0.5, KH_2PO_4 — 0.5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, NaCl — 20.0, KCl — 0.3, NaHCO_3 — 3.0, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 1.0, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.7, дрожжевой экстракт — 0.1, ацетат натрия — 0.5; раствор витаминов и микроэлементов — по 1 мл из каждого концентрированного

стерильного раствора. Конечный pH устанавливали 7.5. Очистку культур АФБ проводили методом разведений на агаризованной (0.5%) среде указанного состава (Лунина и соавт., 2019). Оптимальные условия роста АФБ (температуры, концентрации NaCl) определяли путем измерения оптической плотности выросшей суспензии клеток при 726 нм на фотометре КФК-3 (Россия).

Микроскопирование. Морфологию клеток бактерий изучали в световом микроскопе Olympus BX 41 (Япония) с объективом $\times 100$ с фазовым контрастом. Ультратонкие срезы исследовали под электронным микроскопом Jeol JEM-100C (Япония) при напряжении 80 кВ. Для приготовления ультратонких срезов материал обезвоживали и заливали в Эпон (Ryter, Kellenberger, 1958). Срезы помещали на медные сетки с формваровым покрытием и контрастировали по Рейнольдсу (Reinolds, 1963).

Количество бактериохлорофиллов в природных образцах определено с использованием методов спектрофотометрии и спектрофлуориметрии (Жильцова и соавт., 2020).

Состав пигментов выделенных культур АФБ определяли по спектрам поглощения на спектрофотометре СФ 56А (“ЛОМО”, Россия) в диапазоне длин волн 350–1100 нм. Для этого готовили суспензию клеток в 50% глицерине. Кроме того, исследовали спектральные характеристики экстрактов пигментов АФБ в смеси ацетон–метанол (7 : 2; об./об.).

Филогенетический анализ. Для выделения ДНК из накопительных культур использовали набор DNeasy UltraClean Microbial Kit (“Qiagen”, Нидерланды). Идентификацию накопительных культур ЗСБ проводили с помощью праймерной группоспецифичной системы F-99-GSB-R-1369 для гена 16S рНК (Alexander et al., 2002). Секвенирование проводили на автоматическом генетическом анализаторе DNA Analyzer 3730 (“Applied Biosystems”, США) с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США), согласно инструкции производителя. Выравнивание последовательностей проводили с помощью онлайн-сервиса MAFFT (Kato et al., 2019). Филогенетический анализ проводили при помощи сервиса IQ-TREE (Nguyen et al., 2015) с использованием эволюционной модели, полученной при помощи Model Finder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Дерево было построено при bootstrap-анализе 1000 альтернативных деревьев и визуализировано в iTOL v.6., последовательности были депонированы в GenBank под номерами OR538547–OR538549.

Метагеномный анализ. В соответствии с рекомендациями производителя библиотека фрагментов метагенома была создана с помощью набора NEBNextDNA Library Prep kit (“Illumina”). Секвенирование библиотеки проводилось на приборе

HiSeq 2500 (“Illumina”) с использованием парных чтений (150 п.н.). Качество необработанных чтений определялось с помощью Fast QC v. 0.11.7 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), а некачественные чтения удалялись с помощью Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). Отфильтрованные по качеству чтения были собраны *de novo* с помощью metaSPAdes v. 3.15.0 (Nurk et al., 2017). Таксономию отфильтрованных по качеству чтений для каждого образца присваивали с помощью Kaiju v. 1.5 (Menzel et al., 2016) с использованием нередуцированной базы данных белков NCBI BLAST nr v. 2017–05–16. Для реконструкции генома использовали три различных подхода: MaxBin 2.0 (Wu et al., 2016), MyCC (Lin, Liao, 2016) и BusyBee Web (Laczny et al., 2017). Окончательные сборки геномов были получены с помощью программы Das Tool (Sieber et al., 2018). Таксономическое положение собранного генома определяли с помощью GTDB-Tk v. 1.5.0 (Chaumeil et al., 2019). Определение наличия контаминации и ее удаление проводили с помощью программы RefineM v. 0.0.24 (Parks et al., 2017). Уровень и полноту загрязнения геномной сборки оценивали с помощью CheckM v. 1.0.12 (Parks et al., 2015) с командой “lineage_wf” и настройками по умолчанию. Аннотирование генома проводили с помощью программы PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline), представленной NCBI (Tatusova et al., 2016). Качество сборки генома оценивали с помощью программы QUAST (Gurevich et al., 2013). Для исследования метаболического потенциала автоматическое присвоение идентификаторов KEGG-ортологии (КО) белкам штаммов *Chlorobium* было выполнено с помощью BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016) и подкреплено поиском BLASTp (e-value $< 10^{-20}$) по базе нередуцированных белков NCBI.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические характеристики оз. Могильное в конце июля 2018 года. Поверхностная вода была распреснена до 5.4‰ от поверхности до глубины 2.5 м (рис. 2). Далее, до глубины 6.5 м, происходило резкое увеличение солености с 13.3‰ до 27.2‰. На глубинах 13 м и до дна соленость оставалась стабильной 29.9‰. Отметим, что в Баренцевом море соленость воды составляет 33‰, что свидетельствует о разбавлении морской воды, поступающей в оз. Могильное через дамбу, пресными береговыми стоками. Поверхностная вода озера в конце июля прогрелась до 20°C (рис. 2). Температурный скачок простирался с 2 до 5 метров, после чего температура воды медленно снижалась с 11 до 9°C.

Следует отметить, что граница хемоклина (редокс зона) располагалась на глубине 7.8–8.0 м при солености, близкой к максимальной для этого озера. К этой глубине кислород исчезает, и начинается

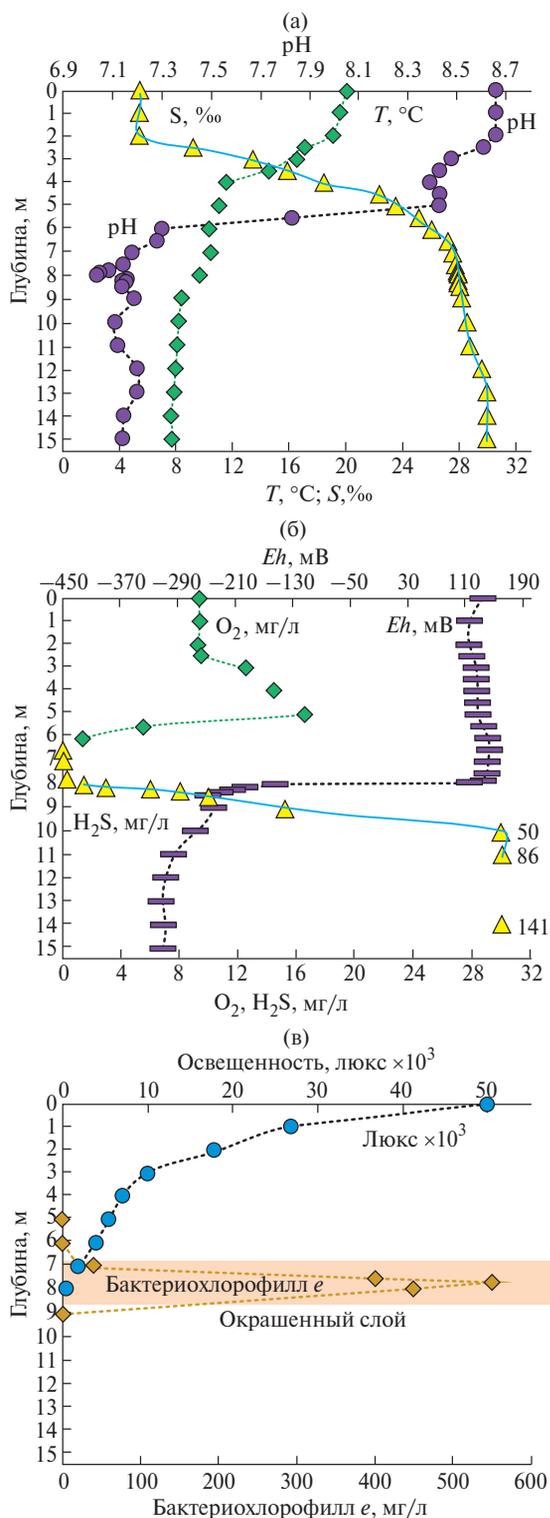


Рис. 2. Основные физико-химические характеристики водной толщи оз. Могильное (июль 2018 г.): а — S — солесность, ‰; pH; T — температура, °C; б — содержание кислорода (O_2), сероводорода (H_2S) и величина окислительно-восстановительного потенциала (Eh); в — величина освещенности (люкс), концентрация бактериохлорофилла e и положение окрашенной бактериальной пластины в водной толще оз. Могильное (Krasnova et al., 2019; Жильцова и соавт., 2019).

резкое увеличение концентрации сероводорода до 141 г/л у дна (рис. 2).

Положение бактериальной пластины. В солнечную погоду до верхней границы распространения сероводорода (зоны хемоклина) достигает незначительное количество световой энергии, достаточной для преимущественного развития коричнево-окрашенных ЗСБ (рис. 2). Бактериальная пластина формируется на глубине в интервале 7.8–8.3 м при солесности 27.8‰ и температуре 9.6°C (рис. 2). Максимальная общая численность бактерий была зарегистрирована на глубине 7.8 м и составляла 3.4 млн клеток в 1 мл. На глубине 8 м ОЧМ снижалась до 2.4 млн клеток в 1 мл. Концентрация бактериохлорофилла e на этих глубинах была высокой и составила 550 и 450 мкг/л соответственно (рис. 2) (Жильцова и соавт., 2020). Это подтверждает доминирование в бактериальной пластине коричнево-окрашенных ЗСБ, приспособленных к жизни при низкой освещенности и спектральных особенностях коротковолнового света, достигающего максимальных глубин. Бактериохлорофилл a , характерный для пурпурных бактерий, на этих глубинах не зарегистрирован. Почти полное отсутствие пурпурных бактерий объяснимо слишком низкой освещенностью на границе хемоклина.

Таксономический состав микробного сообщества зоны хемоклина по данным метагеномного анализа. В результате метагеномного анализа ДНК двух образцов с глубин 7.8 и 8.0 м было получено 3206961 и 3379495 парно-концевых чтений (2×150 пн) для проб Mog_7.8 и Mog_8 соответственно. Полученные чтения были использованы для определения состава микробного сообщества (рис. 3).

В результате в образцах Mog_7.8 и Mog_8 доминировали представители филума *Chlorobiota* (81.2 и 73.4%). Кроме того, были идентифицированы последовательности, относящиеся к филам *Pseudomonadota* (10.1 и 13.4%), *Bacteroidota* (1.9 и 3.5%), *Bacillota* (1.0 и 1.2%) и *Chloroflexota* (0.7 и 1.7%). В отличие от Mog_7.8, в образце Mog_8 были получены последовательности, принадлежащие представителям *Actinomycetota* (0.8%) и *Cyanobacterota* (0.6%). Полученные чтения были использованы для сборки метагеномов. В результате метагеном Mog_7.8 состоял из 8892 скаффолдов (≥ 500 пн), общим размером 11590404, а метагеном Mog_8 состоял из 19437 скаффолдов размером 19211437 пн ($N_{50} = 922$). С целью реконструкции геномов был проведен биннинг обоих метагеномов. В результате был реконструирован геном размером 2210184 пн, состоящий из 97 скаффолдов ($L_{50}/N_{50} = 8/85640$) и имеющий GC состав 52.57%. Полнота и уровень контаминации реконструированного генома были определены с использованием CheckM и составили 99.3 и 0% соответственно. В геноме была идентифицирована полная последовательность гена

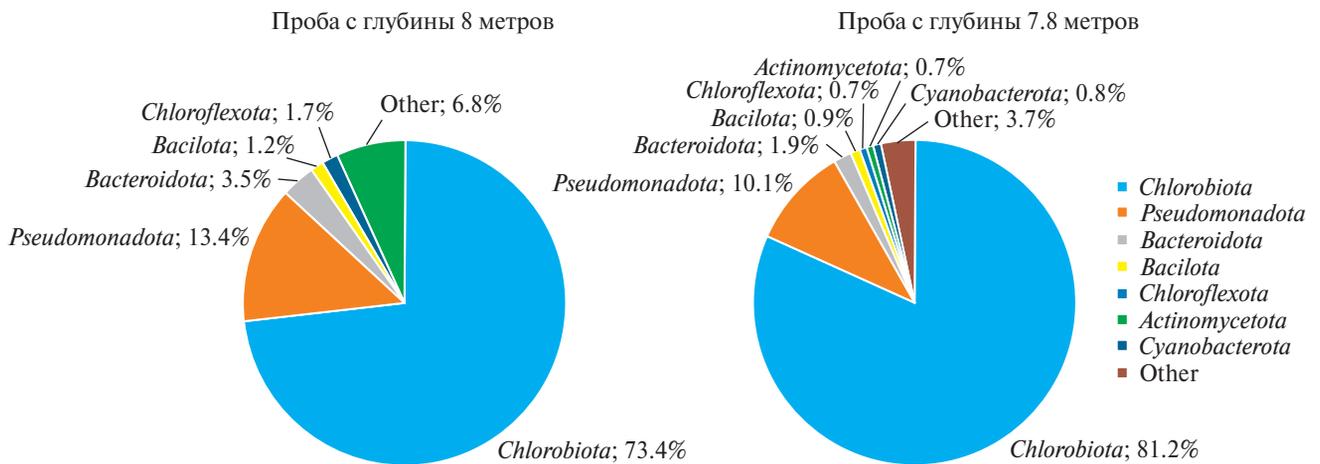


Рис. 3. Таксономический состав бактерий зоны хемоклина двух близко расположенных горизонтов (7.8 и 8.0 м) по данным метагеномного анализа. Пояснения на рисунке.

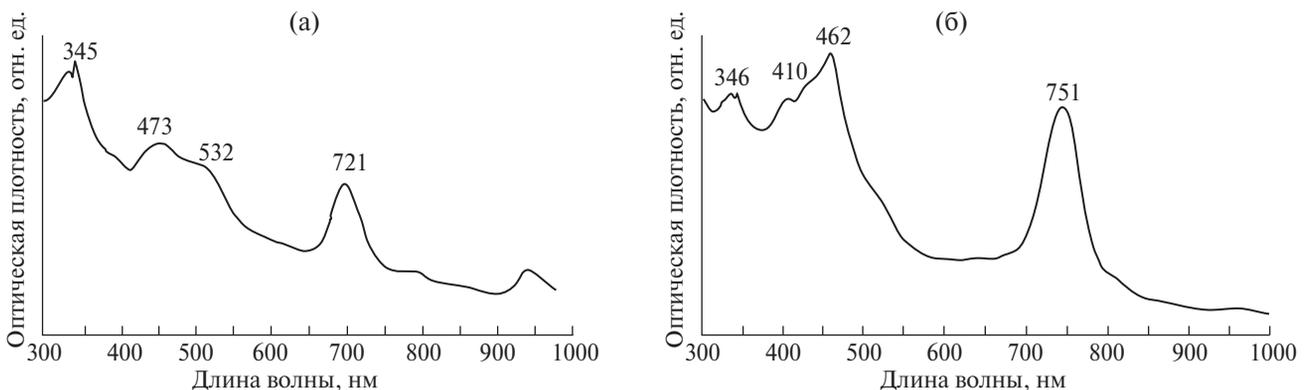


Рис. 4. Спектры поглощения клеток коричневого морфотипа *Ptc. aestuarii*, штамм Mog18–2, обнаруженного в оз. Могильном (а), содержащего бактериохлорофилл *e* (максимум 721 нм.), (ранее назван *Ptc. phaeoasteroidea* (Пучкова, Горленко, 1976)) и зеленого *Prosthecochloris*, штамм Mog18–3 (б), содержащего бактериохлорофилл *c* (максимум 751 нм).

16S рРНК (Mog18–1), которая имела уровень сходства в 99.93% с *Chlorobium phaeovibrioides* Mog4, штаммом, обнаруженным ранее в оз. Могильное (Лунина и соавт., 2005). В собранном геноме были идентифицированы гены *bciD* и *bchF3*, ответственные за биосинтез бактериохлорофилла *e*, и генный кластер *gvp*, отвечающий за образование газовых везикул. Геномный анализ не выявил присутствия других видов ЗСБ, ранее обнаруженных методом посева в оз. Могильное (Gorlenko et al., 1978; Лунина и соавт., 2005).

Характеристика выделенных культур АФБ. Из отобранных из хемоклина проб оз. Могильное нами выделены культуры доминирующего вида *Chlorobium phaeovibrioides*, а также два морфотипа *Prosthecochloris*: коричневого, содержащего бактериохлорофилл *e*, штамм Mog18–2 и зеленого штамм Mog18–3, содержащий бактериохлорофилл *c* (рис. 4, рис. 5).

Оба штамма филогенетически близки между собой и с типовым видом *Prosthecochloris aestuarii*

SK 413, а также с содержащим бактериохлорофилл *e* коричневым штаммом ZM (Gorlenko, 1970) (рис. 6).

Отметим, что зеленый морфотип *Prosthecochloris aestuarii* был обнаружен в бактериальной пластине оз. Могильное впервые. Также впервые выделен в культуру и идентифицирован еще один зеленоокрашенный штамм ЗСБ Mog18–4, содержащий бактериохлорофилл *c* (рис. 4). По данным анализа гена 16S рРНК, штамм Mog18–4 близок с не идентифицируемым до вида штаммом *Prosthecochloris* HL-130-GSB, изолированным из микробного мата теплого стратифицированного оз. Вашингтон (США, штат Вашингтон) (рис. 6) (Thiel et al., 2017). Клетки ЗСБ содержали хлоросомы, выстилающие цитоплазматическую мембрану. Коричневоокрашенные бактерии *Prosthecochloris aestuarii* образовывали клеточные выросты простеки (рис. 5). Кроме ЗСБ, были выделены два штамма пурпурных серобактерий, морфологически близкие бактериям рода *Thiocapsa* и *Thiocystis* (рис. 5). Для этих штаммов ПСБ характерны фотосинтезирующие структуры везикулярного типа и каротиноид окенон.

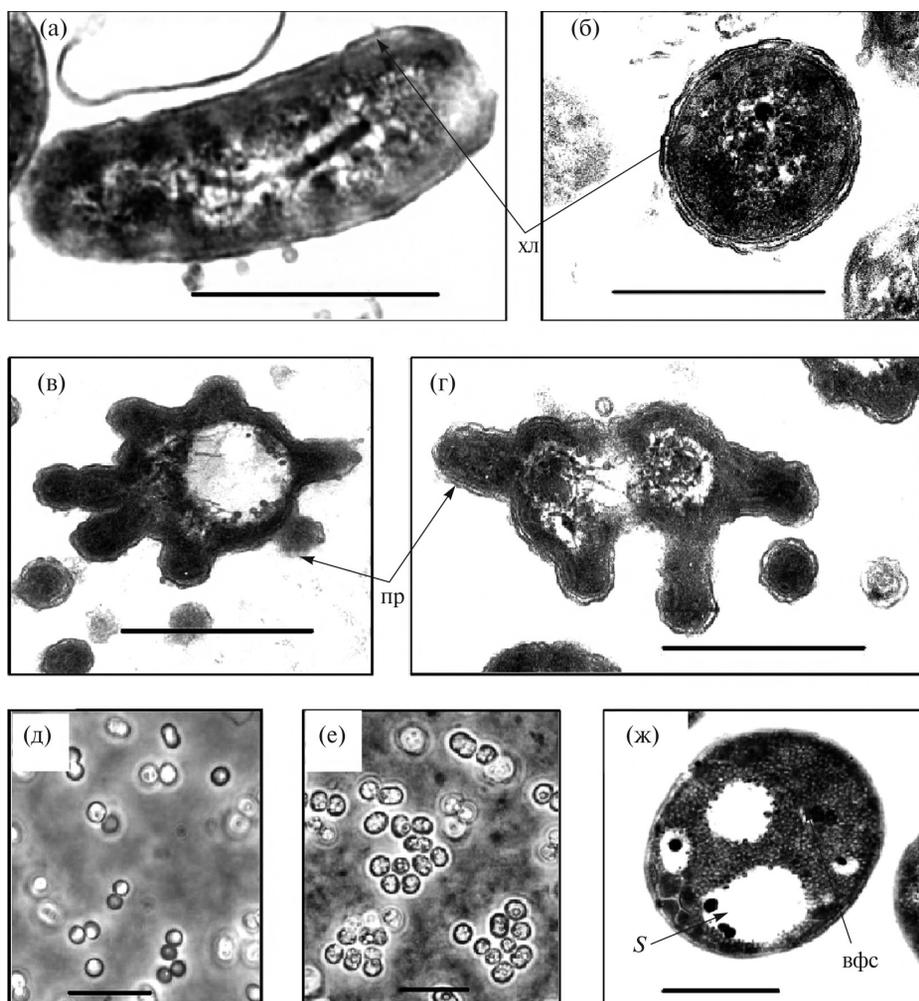


Рис. 5. Тонкое строение выделенных культур АФБ: а, б — *Chlorobium phaeovibrioides*; в, г — коричневоокрашенные *Prosthecochloris aestuarii* с простеками; ж — *Thiocapsa* sp.; д — *Thiocystis* sp.; е — *Thiocapsa* sp. Электронный микроскоп (а–г, ж). Световой микроскоп, фазовый контраст (д, е). Обозначения: ПР — клеточные выросты — простеки; ХС — антенные структуры — хлоросомы; ВФС — фотосинтетические структуры везикулярного типа; S — внутриклеточные включения элементной серы. Масштабная метка — 0.5 мкм.

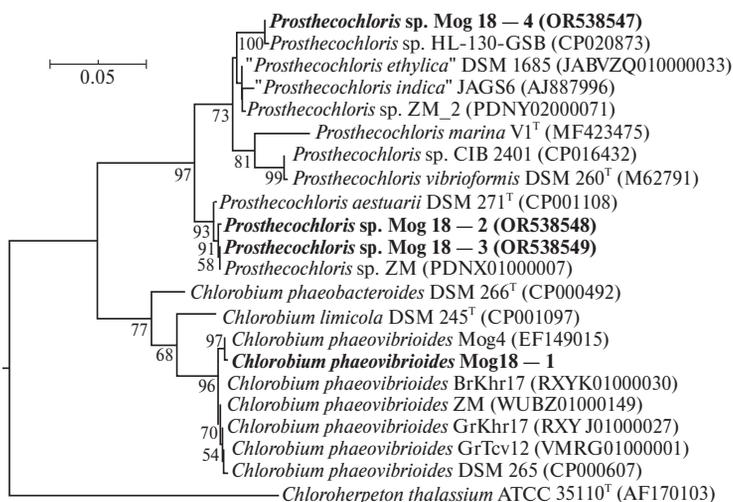


Рис. 6. Филогенетическое дерево, полученное на основе последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение выделенных штаммов среди представителей семейства *Chlorobiaceae*. Номера штаммов, депонированные в GenBank, представлены на дереве.

ОБСУЖДЕНИЕ

Последние данные экспедиции 2018 года показали изменения гидрохимического режима оз. Могильное, повлиявшие на положение бактериальной пластины, а также на видовой состав АФБ. Отмечается тенденция осолонения поверхностных вод озера от 5 до 7 г/л. Одной из причин этого явления стало снижение фильтрационной способности дамбы (Strelkov et al., 2019). Можно предположить, что затрудненный водообмен с морем со временем возрастает вследствие механического засорения пористых структур дамбы и образования в них биопленок. Регулярные исследования дают основание прогнозировать динамику состояния дочерних морских водоемов, отгороженных от материнского моря дамбой. Примерами таких водоемов, кроме оз. Могильное, является оз. Большие Хрусломены (Лунина и соавт., 2023), а также залив Канда, который в 1942 году был полностью отделен от Белого моря насыпной дамбой (Саввичев и соавт., 2017). В послевоенные годы водоток в теле дамбы был восстановлен, и изоляция водоема стала ограниченной. Тем не менее в заливе Канда зарегистрированы признаки сероводородного заражения (Savvichev et al., 2023).

В литературе отмечается, что сероводород часто регистрируется в узких морских заливах с ограниченным водообменом, таких как Чесапикский залив и фьорд Нитинат Лейк (Van Gemerden, Mas, 1995; Findlay et al., 2015; Schmidtova et al., 2009). Чесапикский залив представляет собой частично стратифицированный эстуарий, простирающийся от устья реки Саскуэханна до Атлантического океана. Установлено, что в этом заливе виды ЗСБ родов *Prosthecochloris* и *Chlorobium* играют главную роль в окислении сульфидов и препятствуют проникновению токсичного газа в аэробную зону (Findlay et al., 2015). Во фьорде-озере Нитинат Лейк (Nitinat Lake, Vancouver Island, British Columbia, Канада), которое соединено узкой протокой с Тихим океаном, на верхней границе сероводородного слоя доминировали *Chl. phaeovibrioides*, филогенетически близкие штамму Mog 4, обнаруженному в оз. Могильное (Schmidtova et al., 2009; Лунина и соавт., 2005).

Для оз. Могильное характерно несовпадение уровней галоклина и термоклина. В узком кислородсодержащем слое между 3 и 7 м в оз. Могильное существует морская фауна, среди которой примечателен подвид трески *Gadus morhua kildinensis* (Дерюгин, 1927). Бактериальная пластина формируется в зоне хемоклина при солёности, близкой к солёности морской воды, что предопределяет видовой состав АФБ, представленный умеренно галофильными видами. Данные метагеномного анализа подтвердили абсолютное доминирование солёноводного вида ЗСБ *Chl. phaeovibrioides*. В собранном геноме этого вида идентифицированы гены, ответственные за биосинтез бактериохлорофилла *e*,

гены *bciD* и *bchF3* и определен генный кластер *gvp*, отвечающий за образование газовых везикул. Присутствие газовых везикул у *Chl. phaeovibrioides*, увеличивающих степень плавучести бактерий, впервые было выявлено у штаммов этого вида, выделенных из оз. Большие Хрусломены, имеющего связь с Белым морем (Grouzdev et al., 2019). При анализе метагенома из хемоклина воды оз. Могильное не было обнаружено других видов ЗСБ.

Выделение новых штаммов ЗСБ и их идентификация предоставили дополнительные данные о разнообразии сообщества АФБ в оз. Могильное в минорном компоненте. Усиление освещённости бактериальной пластины, благодаря поднятию границы зоны хемоклина, видимо, стало причиной появления зеленоокрашенных ЗСБ среди доминирующих коричневоокрашенных морфотипов. Впервые были изолированы в культуру зеленоокрашенные и коричневоокрашенные морфотипы *Prosthecochloris aestuarii* (Gorlenko, 1970; Пучкова, Горленко, 1976), а также еще один содержащий бактериохлорофилл с штамм Mog18–4, претендующий на новый вид *Prosthecochloris*.

Pelodictyon phaeum, который ранее регулярно наблюдался в этом озере, не был получен в бактериальной культуре. Вследствие этого не удалось исследовать его филогению. Типовой штамм вида *Pelodictyon phaeum*, выделенный из континентального соленого озера Вейсового (Славянск, Украина), имеет более крупные размеры клеток, изогнутых в полукольцо и содержащих газовые вакуоли (Горленко, 1972; Горленко и соавт., 1973). В некоторых соленых меромиктических озерах этот вид может быть доминантом (Романенко и соавт., 1976). Отметим, что из соленого озера Cibolar Lake, Испания, был выделен штамм CIB2401, названный "*Pelodictyon phaeum*", фенотипически сходный с описанием этого вида (Miraclel et al., 1992). В дальнейшем по геномным характеристикам этот штамм был переопределен и переименован как "*Prosthecochloris phaeum*" (Gegersen et al., 2011). Валидного описания данного вида пока не опубликовано. Филогенетическое положение штамма CIB2401 отражено на рис. 6. Он имеет тесное родство с видом *Prosthecochloris vibrioforme* и, вероятно, является коричневым морфотипом этого вида. Таким образом, таксономическая и генетическая самостоятельность *Pelodictyon phaeum* еще не определена.

Заключая отметим, что экосистема оз. Могильное длительное время находится в изоляции. Вследствие этого в нем возникли благоприятные условия для адаптивных изменений организмов, и, как следствие, возник новый подвид рыбы трески. В то же время, генетические изменения, видимо, не коснулись микроорганизмов, свободно мигрирующих с водой через дамбу. Микроорганизмы практически не изолированы от моря. Поэтому основные свойства доминирующего в оз. Могильное

вида ЗСБ *Chlorobium phaeovibrioides*, а также *Prosthecochloris aestuarii*, оказались сходными с филологами обитающими в озерах на побережье Белого моря, имеющего связь с акваторией Баренцева моря (Grouzdev et al., 2018, 2022; Саввичев и соавт., 2022).

ДАнные О ДЕПонировании ГЕНОМА

Номер депонирования генома *Chlorobium phaeovibrioides* Mog18 — 1 (JAVYJA000000000; BioSample SAMN37347556).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят благодарность Н. М. Кокрятской и Г. Н. Лосюк, участвующим в гидрохимических исследованиях в трудных условиях Заполярья, а также Н. Е. Сузиной за приготовление препаратов для электронной микроскопии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00208), а также в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. А. С. Саввичев, В. М. Горленко и В. В. Беленкова — выполняли полевые и лабораторные исследования; О. Н. Лунина проводила работу с культурами и готовила материал для метагеномного анализа. Д. С. Груздев и В. В. Козяева выполняли метагеномный и филогенетический анализы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беленкова В. В., Саввичев А. С. Микробиологические исследования на озере Могильном // *Природа*. 2021. Т. 1267 (3). С. 50–60.
<https://doi.org/10.7868/S0032874X21030066>

Воронов Д. А., Краснова Е. Д. Исследования мелкомасштабного распределения микроорганизмов в хемоклине прибрежных стратифицированных водоемов, отделяющихся от Белого моря // *Труды VII Межд. научно-практ. конф. “Морские исследования и образование (MARESEDU-2018)”*. Т. 4. Тверь: ООО ПолиПРЕСС, 2019. С. 103–107.

Горленко В. М. Фототрофные коричневые серные бактерии *Pelodictyon phaeum* nov. sp. // *Микробиология*. 1972. Т. 41. С. 370–371.

Горленко В. М., Чеботерев Е. Н., Качалкин В. И. Микробиологические процессы окисления сероводорода в озере Вейсово // *Микробиология*. 1973. Т. 43. С. 610–615.

Дерюгин К. М. Реликтовое озеро Могильное на острове Кильдине // *Природа*. 1927. Т. 4. С. 278–288.

Жильцова А. А., Емельянец П. С., Краснова Е. Д., Воронов Д. А., Пацаева С. В. Определение доминирующих фотосинтезирующих организмов в хемоклине оз. Могильного (о. Кильдин, Баренцево море) и их вертикального распределения методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии // *Труды VIII Межд. научно-практ. конф. “Морские исследования и образование (MARESEDU-2019)”*. Москва, 28–31.10.2019 г. Том II (III). М.: ООО “ПолиПРЕСС”, 2020. С. 428–432.

Иванов М. В., Русанов И. И., Пименов Н. В., Байрамов И. Т., Юсупов С. К., Саввичев А. С., Леин А. Ю., Сапожников В. В. Микробные процессы цикла углерода и серы в озере Могильном // *Микробиология*. 2001. Т. 70. С. 675–686.

Ivanov M. V., Rusanov I. I., Pimenov N. V., Bairamov I. T., Yusupov S. K., Savvichev A. S., Lein A. Yu. and Sapozhnikov V. V. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in Lake Mogil'noe // *Microbiology (Moscow)*. 2001. V. 70. P. 583–593.

Исаченко Б. Л. Исследования над бактериями Северного Ледовитого океана. Петроград: тип. В. Ф. Киришбаума (отд.), 1914. 294 с.

Isachenko B. L. Study on the bacteria of the Arctic Ocean // *Proc. of Murmansk scientific fishing expedition in 1906*. St. Petersburg, 1914. 298 p. (in Russian).

Krasnova E. D., Efimov V. A., Fedyuk M. L., Frolova N. L., Kokryatskaya N. M., Kossenkov A. V., Patsaeva S. V., Vasilenko A. N., Voronov D. A., Strelkov P. P. New data on lake Mogilnoe (Kildin island, Barents Sea): the results of the 2018 expeditions // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019. V. 263. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/263/1/012019>

Краснова Е. Д. Экология меромиктических озер России. 1. Прибрежные морские водоемы // *Водные ресурсы*. 2021. Т. 48. С. 322–333.
<https://doi.org/10.31857/S0321059621030093>

Krasnova E. D. Ecology of meromictic lakes of Russia. Coastal marine waterbodies // *Water Resour.* 2021. V. 48. P. 427–438.
<https://doi.org/10.1134/S009780782103009X>

Лунина О. Н., Саввичев А. С., Бабенко В. В., Болдырева Д. И., Колганова Т. В., Краснова Е. Ф., Кокрятская Н. М., Веслополова Е. Ф., Воронов Д. А., Кузнецов Б. Б., Демиденко Н. А., Летарова М. А., Летаров А. В., Горленко В. М. Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий меромиктического озера Трехцветное

- (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 100–115.
<https://doi.org/10.1134/S0026365619010051>
- Lunina O. N., Savvichev A. S., Babenko V. V., Boldyreva D. I., Kuznetsov B. B., Kolganova T. V., Krasnova E. D., Kokryatskaya N. M., Veslopolova E. F., Voronov D. A., Demidenko N. A., Letarova M. A., Letarov A. V., Gorlenko V. M. Seasonal variations in the structure of an anoxygenic phototrophic bacterial community from the meromictic Lake Trekhtsvetnoe (Kandalaksha Bay, White Sea) // Microbiology (Moscow) 2019. V. 88. P. 71–85.
<https://doi.org/10.1134/S0026261719010041>
- Лунина О. Н., Горленко В. М., Попова О. А., Акимов В. Н., Русанов И. И., Пименов Н. В. Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий реликтового озера Могильное (о. Кильдин, Баренцево море) // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 677–686.
<https://doi.org/10.1134/S0026365619010051>
- Lunina O. N., Gorlenko V. M., Solov'eva O. A., Akimov V. N., Rusanov I. I., Pimenov N. V. Seasonal changes in the structure of the anoxygenic phototrophic bacterial community in Lake Mogilnoe, a relict Lake on Kil'din Island in the Barents Sea // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 588–596.
<https://doi.org/10.1007/s11021-005-0107-7>
- Лунина О. Н., Груздев Д. С., Пацаева С. В., Жильцова А. А., Сузина Н. Е., Краснова Е. Д., Воронов Д. А., Кокрятская Н. М., Веслополова Е. Ф., Саввичев А. С. Аноксигенные фототрофные бактерии меромиктического озера Большая Хрусломены (о. Олений, Кандалакшский залив, Мурманская область, Россия) // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 564–580.
<https://doi.org/10.31857/S0026365623600268>
- Lunina O. N., Grouzdev D. S., Patsaeva S. V., Zhil'tsova A. A., Suzina N. E., Krasnova E. D., Voronov D. A., Kokryatskaya N. M., Veslopolova E. F., Savvichev A. S. Anoxygenic phototrophic bacteria of the meromictic Lake Bol'shie Khruslomeny (Oleniy Island, Kandalaksha Gulf, Murmansk Oblast, Russia) // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 792–806.
<https://doi.org/10.1134/S0026261723602051>
- Пучкова Н. Н., Горленко В. М. Новые коричневые хлоробактерии *Prosthecochloris phaeoasteroidea* nov. sp. // Микробиология. 1976. Т. 45. С. 655–660.
- Романенко В. И., Перес Э. М., Кудрявцев В. М., Публинес М. А. Микробиологические процессы в меромиктическом озере. Ваэ-де-Сан-Хуан, Куба // Микробиология. 1976. Т. 45. С. 539–546.
- Саввичев А. С., Кулакова А. А., Краснова Е. Д., Воронов Д. А., Кадников В. В., Белецкий А. В., Козяева В. В., Русанов И. И., Летарова М. А., Веслополова Е. Ф., Беленкова В. В., Демиденко Н. А., Горленко В. М. Микробное сообщество морского меромиктического желоба (Бухта Биофильтров), расположенного в Кандалакшском заливе Белого моря // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 492–506.
<https://doi.org/10.31857/S002636562210010X>
- Savvichev A. S., Kulakova A. A., Krasnova E. D., Voronov D. A., Kadnikov V. V., Beletskii A. V., Kozyaeva V. V., Rusanov I. I., Letarova M. A., Veslopolova E. F., Belenkova V. V., Demidenko N. A., Gorlenko V. M. Microbial community of a marine meromictic trough (Biofilter Bay) in the Kandalaksha Bay, White Sea // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 432–444.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722100940>
- Саввичев А. С., Демиденко Н. А., Краснова Е. Д., Калмацкая О. В., Харчева А. И., академик РАН Иванов М. В. Микробные процессы в губе Канда — меромиктическом водоеме, искусственно отделенном от Белого моря // Доклады Академии наук. 2017. Т. 474. № 5. С. 637–641.
<https://doi.org/10.7868/S0869565217050243>
- Savvichev A. S., Demidenko N. A., Kadnikov V. V., Belenkova V. V., Rusanov I. I., Gorlenko V. M. Microbial community composition as an indicator of the state of basins located at the sea coast (Exemplified by the Kanda Bay, Kandalaksha Gulf, White Sea) // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 819–830.
<https://doi.org/10.1134/S002626172360194X>
- Alexander B., Andersen J. H., Cox R. P., Imhoff J. F. Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16S rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein // Arch. Microbiol. 2002. V. 178. P. 131–140.
<https://doi.org/10.1007/s00203-002-0432-4>
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Chaumeil P.-A., Mussig A. J., Hugenholtz P., Parks D. H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database // Bioinformatics. 2019. V. 36. P. 1925–1927.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Findlay J. A., Bennetta J. A., Hansona E. T., Luther W. G. Light-dependent sulfide oxidation in the anoxic zone of the Chesapeake Bay can be explained by small populations of phototrophic bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 7560–7569.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02062>
- Gorlenko V. M., Vainshtein M. B., Kachalkin V. I. Microbiological characteristic of Lake Mogilnoye // Arch. Hydrobiol. 1978. V. 81. P. 475–492.
- Gorlenko V. M. A new phototrophic green sulphur bacterium. *Prosthecochloris aestuarii* nov. gen. nov. spec. // Z. Allg. Mikrobiol. 1970. V. 10. P. 147–149.
<https://doi.org/10.1002/JOBM.19700100207>
- Gregersen L. H., Bryant A. D., Frigaard N.-U. Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria // Frontiers in Microbiology. 2011. V. 2. Art. 116.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00116>
- Grouzdev D. S., Gaisin V. A., Krutkina M. S., Bryantseva I. A., Lunina O. N., Savvichev A. S., Gorlenko V. M. Genome sequence of *Prosthecochloris* sp. strain ZM and *Prosthecochloris* sp. strain ZM-2, isolated from an arctic

- meromictic lake // *Microb. Res. Announc.* 2018. V. 7. e01415–18.
<https://doi.org/10.1128/MRA.01415-18>
- Grouzdev D., Gaisin V., Lunina O., Krutkina M., Krasnova E., Voronov D., Baslerov R., Sigalevich P., Savvichev A., Gorlenko V. Microbial communities of stratified aquatic ecosystems of Kandalaksha Bay (White Sea) shed light on the evolutionary history of green and brown morphotypes of *Chlorobiota* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2022. V. 98. Art. fiac103. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiac103>
- Grouzdev D. S., Lunina O. N., Gaisin V. A., Krutkina M. S., Baslerov R. V., Savvichev A. S., Gorlenko V. M. Genome sequences of green- and brown-colored strains of *Chlorobium phaeovibrioides* with gas vesicles // *Microbiol. Resour. Announc.* 2019. V. 8. P. 711–719.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00711-19>
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. P. 1072–1075.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Kalyaanamoorthy S., Minh B. Q., Wong T. K.F., von Haeseler A., Jermini L. S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nature Methods.* 2017. V. 14. P. 587–589.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and ghostkoala: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428 P. 726–731.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
- Katoh K., Rozewicki J., Yamada K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // *Brief. Bioinform.* 2019. V. 20. P. 1160–1166.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Krasnova E. D., Efimov V. A., Fedyuk M. L., Frolova N. L., Kokryatskaya N. M., Kossenkov A. V., Patsaeva S. V., Vasilenko A. N., Voronov D. A., Strelkov P. P. New data on lake Mogilnoe (Kildin island, Barents Sea): the results of the 2018 expeditions // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 2019. V. 263. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/263/1/012019>
- Krasnova E. D., Matorin D. N., Belevich T. A., Efimova L. E., Kharcheva A., Kokryatskaya N. M., Losyuk G. N., Todorenko D., Voronov D. A., Patsaeva S. The characteristic pattern of multiple colored layers in coastal stratified lakes in the process of separation from the White Sea // *J. Ocean Limnol.* 2018. V. 36. P. 1962–1977.
<https://doi.org/10.1007/s00343-018-7323-2>
- Laczny C. C., Kiefer C., Galata V., Fehlmann T., Backes Chr., Keller A. BusyBee Web: metagenomic data analysis by bootstrapped supervised binning and annotation // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. W171–W179.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx348>
- Lin H.-H., Liao Y.-C. Accurate binning of metagenomic contigs via automated clustering sequences using information of genomic signatures and marker genes // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 24175. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1038/srep24175>
- Miracle M. R., Vicente E., Pedrós-Alió C. Biological studies of spanish meromictic and stratified karstic lakes // *Limnetica.* 1992. V. 8. P. 59–77.
- Menzel P., Ng K. L., Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju // *Nat. Commun.* 2016. V. 13. Art. 11257. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Nguyen L.-T., Schmidt H. A., von Haeseler A., Minh B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. P. 268–274.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A. Pevzner A. P. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler // *Genome Res.* 2017. V. 27. P. 824–834.
<https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
- Parks D. H., Imelfort M., Skennerton C. T., Hugenholtz Ph., Tyson G. W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 1043–1055.
<https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Parks D. H., Rinke Chr., Chuvochina M., Chaumeil P.-A., Woodcroft B. J., Evans P. N. Hugenholtz Ph., Tyson G. W. Recovery of nearly 8000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life // *Nat. Microbiol.* 2017. V. 2 P. 1533–1542.
<https://doi.org/10.1038/s41564-017-0012-7>
- Reinolds E. S. The use of lead citrates of high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
<https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
- Ryter A., Kellenberger E., Birch-Andersen A., Maaløe O. Etude au microscope électronique des plasmes contenant de l'acide deoxyribonucleique. 1. Les nucleotides des bacteries en croissance active // *Zeitschrift für Naturforschung B.* 1958. S. 597–605.
<https://doi.org/10.1515/znb-1958-0908>
- Schmidtova J., Hallam S. J., Baldwin S. A. Phylogenetic diversity of transition and anoxic zone bacterial communities within a near-shore anoxic basin: Nitinat Lake // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 3233–3251.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02044.x>
- Sieber Chr.M.K., Probst A. J., Sharrar A., Thomas B. C., Hess M., Tringe S. G., Banfield J. F. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy // *Nat. Microbiol.* 2018. V. 3. P. 836–843.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0171-1>
- Strelkov P., Shunatova N., Fokin M., Usov N., Fedyuk M., Malavenda S. Marine Lake Mogilnoe (Kildin Island, the Barents Sea): one hundred years of solitude // *Polar Biology.* 2014. V. 37. P. 297–310.
<https://doi.org/10.1007/s00300-013-1431-4>
- Strelkov P., Stogov I., Krasnova E., Movchan E., Polyakova N., Goldin S., Ivanov M., Ivanova T., Malavenda S.,

- Fedyuk M., Shunatova N. Rapid unpredicted changes in the stratification of marine lake Mogilnoe (Kildin island, the Barents Sea) through the early 21st century // *Polar Research*. 2019. V. 38. Art. 3394. P. 1–7. <https://doi.org/10.33265/polar.v38.3394>
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E. P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K. D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. P. 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
- Thiel V., Drautz-Moses D.I., Purbojati R. V., Schuster St.C., Lindemann St., Bryant D. A. Genome Sequence of *Prosthecochloris* sp. strain HL-130-GSB from the phylum Chlorobi // *Genome Announc.* 2017. V. 5. Art. e00538–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00538-17>
- Van Gemerden H., Mas J. Ecology of phototrophic sulfur bacteria // *Anoxygenic photosynthetic bacteria* / Eds. Blankenship R. E., Madigan M. T., Bauer C. E. N.Y.: Kluwer Academic, 1995. P. 49–85.
- Wu Y.-W., Simmons B. A., Singer S. W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets // *Bioinformatics*. 2016. V. 32. P. 605–607. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv63>

Present Understanding of Biodiversity of Anoxygenic Phototrophic Bacteria in the Relic Lake Mogilnoe (Kildin Island, Murmansk oblast, Russia)

V. M. Gorlenko^{1, *}, O. N. Lunina¹, D. S. Grouzdev², E. D. Krasnova³, D. A. Voronov⁴, V. V. Belenkova¹, V. V. Kozyaeva^{5, 6}, and A. S. Savvichev¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²ciBear OU, Tallinn, 10115, Estonia

³Pertsov White Sea Biological Station, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, Russia

⁴Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia

⁵Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, ON, N2L 3G1 Canada

⁶K.G. Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071

*e-mail: vgorlenko@mail.ru

Received October 18, 2023; revised November 4, 2023; accepted November 11, 2023

Abstract—The relic Lake Mogilnoe, separated from the Barents Sea by a sand and pebble dam, is located in the high Arctic on the Kildin island (Murmansk region). This lake is a classic example of a meromictic basin of marine origin. The data obtained during the 2018 expedition showed changes in the hydrochemical regime of the lake that have occurred over the past 20 years. Sulfide concentration in the monimolimnion of the lake was as high as 140 mg/L. A tendency for salinization of the surface waters to 7 g/L has been noted. The Lake Mogilnoe is characterized by a discrepancy between the halocline and thermocline levels. The chemocline zone in the lake is below the halocline level. In a narrow oxygen-containing layer between 3 and 7.5 m, aerobic microflora of the marine type and marine fauna were present. The bacterial plate was formed at the boundary of the sulfide layer at ~8 m and mainly consisted of green sulfur bacteria (GSB). Brown-colored GSB species containing bacteriochlorophyll *e* were predominant. The previously formed concept of anaerobic phototrophic bacteria (APB) biodiversity based on morphological characteristics was modified using metagenomic data obtained by analyzing DNA from two samples of lake water in the chemocline zone, and was also supplemented by identifying new GSB species. Molecular diagnostic data confirmed the absolute dominance of the brackish species of GSB *Chlorobium phaeovibrioides*. This is the first on isolation and identification of brown- and green-colored *Prosthecochloris aestuarii* morphotypes from Lake Mogilnoe and identified, as well as of bacteriochlorophyll *c*-containing *Prosthecochloris* sp. The taxonomic position of *Pelodyction phaem*, which was constantly present in the Lake Mogilnoe, is discussed in detail. Despite the partial isolation of the ecosystem of Lake Mogilnoe from the Barents Sea, the main properties of the dominant GSB species of GSB and *Prosthecochloris aestuarii* turned out to be similar to those of the phylotypes living in lakes on the White Sea coast of the, which remained connected with the Barents Sea.

Keywords: Lake Mogilnoe, meromictic water basins, water exchange, stratification, sulfide contamination, anoxygenic phototrophic bacteria, microbial communities, bacterial plate

ГРИБЫ АРКТИЧЕСКИХ МОРЕЙ

© 2024 г. Г. А. Кочкина^{а, *}, И. П. Пинчук^а, Н. Е. Иванушкина^а, А. Н. Автух^а, Н. В. Пименов^б

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, 142290, Пушкино, Россия

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

*e-mail: gak@dol.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 19.12.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Изучены численность и разнообразие мицелиальных грибов в донных отложениях морей Северного Ледовитого океана — Гренландского, Баренцева и Карского. Пробы поверхностных донных отложений были отобраны в 84-м (июль–август 2021 г.) и 86-м (октябрь–ноябрь 2021 г.) рейсах НИС “Академик Мстислав Келдыш”. Таксономическую принадлежность выделенных грибов определяли с помощью полифазной таксономии. Выделенные грибы были отнесены к 16 родам разных классов аскомицетовых, базидиомицетовых и зигомицетовых грибов. Было определено влияние температуры и разных концентраций NaCl в среде на рост грибов, а также влияние условий культивирования на профиль жирных кислот для штаммов, способных к росту на средах с повышенным осмотическим потенциалом. Показано, что состав жирных кислот изменяется в зависимости от условий солености среды, но ответ на осмостресс у изученных культур из глубоководных донных отложений различается.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, донные отложения, биоразнообразие, моря Северного Ледовитого океана

DOI: 10.31857/S0026365624030039

Существуют многочисленные данные, говорящие о наличии грибов в арктических местообитаниях, где они не только сохраняются, но и могут функционировать. Грибы найдены в многолетнемерзлых грунтах, криопэгах, мерзлом вулканическом пепле, ископаемых семенах, сохранившихся в многолетней мерзлоте (Кочкина и соавт., 2007; Стахов и соавт., 2008; Margesin, Miteva, 2011; Ozerskaya et al., 2009).

Осадочные отложения арктических морей являются одной из наименее изученных сред обитания, что связано со многими трудностями, в том числе и с организацией работы в этом регионе. Между тем исследования последних лет свидетельствуют о значительном таксономическом разнообразии прокариотных микробных сообществ, выявленных в водной толще и осадочных отложениях разных районах Арктических морей (Мамаева и соавт., 2016; Rapp et al., 2018; Begmatov et al., 2021; Namsaraev et al., 2023; Savvichev et al., 2023). Грибы же в морских водоемах Арктики изучены значительно меньше. Однако поскольку их участие в трансформации органического вещества в наземных экосистемах, связанное с особенностями мицелиального роста и обилием гидролитических ферментов, высоко, то очевидно, что и в морских

экосистемах они могут играть существенную роль (Shukla, Shukla, 2022). Использование культуральных методов, а также масштабных метагеномных исследований позволяет предположить наличие значительного числа видов грибов в холодной глубоководной среде, причем многие из них удастся идентифицировать только на уровне порядков, что говорит о большом количестве еще не описанных, новых для науки таксонов (Hagestad et al., 2020).

Между тем основные направления многолетних исследований микробиоты полярных регионов связаны не только с оценкой грибного разнообразия и описанием новых видов грибов. Большое внимание уделяется изучению адаптации грибов к жизни в экстремальных местообитаниях, поскольку изоляты из арктических регионов испытывают действие множества стрессоров — низкая температура, повышенная соленость, а глубоководные грибы — еще и высокое гидростатическое давление (Burgaud et al., 2015).

Еще одним направлением исследования экстремотолерантных грибов является изучение их метаболитов и поиск новых, полезных для биотехнологии веществ. За последнее десятилетие появились данные о том, что микроорганизмы, адаптированные к жизни в экстремальных средах

обитания, в том числе выделенные из регионов Арктики и Антарктики, являются источниками новых специализированных метаболитов (Sayed, 2020). Глубоководные грибы не исключение. Они способны синтезировать биологически активные вещества, обладающие антибактериальными, противовирусными, противоопухолевыми свойствами и высокой ферментативной активностью (Wang et al. 2020). Есть данные, что 37% биологически активных метаболитов, производимых глубоководными грибами, обладают цитотоксичностью, а 33% имеют антимикробную активность, что подчеркивает практическую значимость экстремотолерантов как источников биомолекул с большим биотехнологическим потенциалом, причем 22% потенциальных продуцентов выделяются из донных отложений (Jin et al., 2016).

Сегодня численность и таксономическое разнообразие грибов в глубоководных морских грунтах северных морей изучаются во многом благодаря работе полярных экспедиций, которые позволили получить образцы морского грунта, лежащие под большой толщей воды. Появилась информация по видовому составу микобиоты морей Северного Ледовитого океана — Чукотского моря (Бубнова, Коновалова, 2019), Белого моря (Хуснуллина и соавт., 2018), а также Баренцева и Карского морей (Бубнова, Никитин, 2017; Бубнова и соавт., 2020). Вместе с тем, малочисленность этих работ и, следовательно,

отсутствие значимых статистических данных, пока не позволяют делать обобщающие выводы о частоте встречаемости отдельных таксонов и биоразнообразии в этих биотопах в целом.

Цель настоящей работы состоит в получении данных о биоразнообразии мицелиальных грибов в донных отложениях морей Северного Ледовитого океана. В задачи исследования входило выделение чистых культур грибов, определение их физиологических особенностей, а также изучение основных характеристик липидов отдельных штаммов при изменении условий их культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованные образцы. Пробы поверхностных донных отложений (21 образец) были отобраны в 84-м (июль-август 2021 г.) и 86-м (октябрь-ноябрь 2021 г.) рейсах НИС “Академик Мстислав Келдыш”. Пробы осадков отбирали дночерпателем “Океан” в глубоководном Норвежско-Гренландском бассейне, более мелководном Баренцевом море вблизи острова Шпицберген, а также в Карском море около полуостровов Таймыр и Ямал. Немедленно после подъема дночерпателя на борт судна верхний ненарушенный слой донных отложений отбирали в стерильные пластиковые контейнеры и хранили в холодильнике при температуре 4°C (табл. 1). Отобранные осадки были

Таблица 1. Образцы морских донных отложений

№ образца	Точка отбора	Глубина станции (м)	Место отбора образца	Координаты		Слой керна (см)
				Долгота	Широта	
1	7063	319	Гренландское море	76.99693 с.ш.	13.10681 в.д.	0–1
2						5–6
3	7068	1206	Гренландское море	79.00308 с.ш.	6.9284 в.д.	0–1
4						5–6
5	7087	1204	Гренландское море	79.00783 с.ш.	6.90065 в.д.	0–1
6						5–6
7	7091	156	Баренцево море	78.74123 с.ш.	24.4776 в.д.	0–1
8						5–6
9	7104	269	Баренцево море	78.90373 с.ш.	35,64986 в.д.	0–1
10						5–6
11	7192	21	Карское море	73.88383 с.ш.	85.049 в.д.	0–3
12	7194	27.5	Карское море	73.17083 с.ш.	79.87167 в.д.	0–2
13	7198	18	Карское море	72.068117 с.ш.	73.0438 в.д.	1–2
14	7200	50	Карское море	71.849 с.ш.	67.19662 в.д.	0–3
15	7211	40	Карское море	69.96287 с.ш.	65.3411 в.д.	1–4
16	7212	37.5	Карское море	69.96287 с.ш.	65.3411 в.д.	1–4
17	7218	47	Карское море	74.915 с.ш.	69.72267 в.д.	1–4
18	7220	48	Карское море	74.91553 с.ш.	69.72088 в.д.	1–2
19	7222	320	Карское море	75.83237 с.ш.	68.90918 в.д.	0–3
20	7262	28	Карское море	73.77577 с.ш.	73.01417 в.д.	0–4
21	7267	130	Карское море	74.46808 с.ш.	68.01367 в.д.	0–4

представлены окисленными алевритово-пелитовыми илами, часто с примесью песчаной фракции. Дальнейшую работу с осадками проводили в стационарной лаборатории.

Изучение численности и таксономического состава грибов. Для количественного и качественного анализа микромицетов из донных отложений применяли метод посева на агаризованные среды — синтетическую среду Чапека с 2% сахарозы (CZA) и органическую среду Мальц-агар (МА) с добавлением молочной кислоты (0.4% по объему) для подавления роста бактерий.

Перед посевом навеску изучаемых отложений помещали в пробирки с 5 мл стерильной воды при 20°C, встряхивали в течение 3 мин при комнатной температуре (Vortex, 3000 об./мин). Высевы производили из разведения 1:10 в трех повторностях для каждого образца. Учет количества и характера грибных колоний проводили на 21 (культивирование при 20°C) и 45 (культивирование при 4°C) сутки. Число колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли в 1 г воздушно-сухой навески, для чего измеряли влажность образцов весовым способом. Для контроля стерильности воздуха в микробиологическом боксе открытые чашки Петри со средами CZA и МА оставляли на 10 мин, а затем инкубировали при 4 и 20°C. Параллельно использовали накопительный метод, при этом навески образцов заливали жидкой питательной средой (сусло 3.5°Б) и инкубировали при температуре 20°C в течение 60 сут с периодическим визуальным наблюдением. При наличии роста проводили выделение грибов. Для дальнейших исследований изоляты отсеивали на среду МА с последующим хранением культур при 4°C.

Скорость роста выделенных культур при разных температурах (4, 15, 20, 25°C) проверяли на среде МА. Для оценки роста культур при повышенной концентрации соли в питательные среды добавляли NaCl, доводя концентрацию соли в среде до 5, 10 и 20%. Посев культур осуществляли уколом в центр чашки Петри. Наблюдения за развитием грибов проводили еженедельно в течение месяца.

Идентификацию культур осуществляли на основании культурально-морфологических признаков, изученных при посеве на рекомендуемые среды в соответствии с требованиями современных руководств и определителей, активно используя современные номенклатурные базы данных по грибам Mycobank (<https://www.mycobank.org>) и Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>). Выделенные штаммы мицелиальных грибов помещены в рабочую коллекцию и основной фонд Всероссийской коллекции микроорганизмов.

Молекулярно-генетические исследования. Параллельно проводили молекулярно-генетическую идентификацию выделенных культур. Для этого получали биомассу на среде PDA с целлофаном при 25°C. ДНК выделяли с помощью набора

Фитосорб (“Синтол”, Москва, Россия). Концентрацию ДНК измеряли с использованием флуориметра Qubit 3.0 (“Life Technologies”, Карлсбад, Калифорния, США).

ПЦР-амплификацию фрагментов участка региона ITS и D1–D3 домена rDNA LSU (1500 bp) для каждого из исследуемых образцов проводили с использованием подходящих праймеров. Параметры амплификации на термоциклере (“Bio-Rad”, Hercules, CA, США) были следующими: реакционная смесь (25 мкл) содержала 5 мкл шаблонной ДНК, по 0.5 мкл праймеров, 10 мкл мастер-микса (реакционная смесь для ПЦР-РВ; “Синтол”, Москва, Россия) и 7.5 мкл ddH₂O.

Ампликоны очищали с помощью набора Cleanup Standard (“Евроген”, Москва, Россия). Автоматизированное секвенирование ДНК проводилось с использованием праймеров ITS5, ITS3, ITS4, LR0R, LR5 в ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН.

Сборку последовательностей осуществляли с помощью программ BioEdit версии 7.1.11 (Hall, 1999), DNASTAR (SeqMan Pro v. 11.1.0). Последовательности были депонированы в Генбанк под номерами OQ553766–OQ553769, OQ612721, OQ612722, OR482635–OR482638, OR610793, OR612288.

Сходство последовательностей исследуемых культур и типовых/референтных штаммов ближайших видов оценивали с использованием программы BLAST (NCBI). Филогенетический анализ проводили при помощи пакета MEGAX (Kumar et al., 2018) методом максимального подобия (Maximum Likelihood), использовали модель Tamura-Nei со статистическим анализом устойчивости узлов, 1000-кратным бутстраппингом (Bootstrap method).

Определение состава жирных кислот. Биомассу грибов получали путем культивирования в жидкой среде CZA с разной концентрацией NaCl на орбитальном шейкере (180 об./мин) в колбах объемом 100 мл с 20 мл среды при 25°C в течение 48 ч, фильтровали, помещали в стерильные флаконы и лиофилировали. Лиофильно высушенную биомассу после омыления (3.75 М NaOH/MeOH, 100°C, 30 мин) подвергали метанолизу (6 N HCl/MeOH, 80°C, 10 мин). Продукты метанолиза экстрагировали смесью гексан–метил–трет–бутиловый эфир (1 : 1, по об.). Анализ жирных кислот проводили с использованием газового хромато-масс-спектрометра 7890B+5977B (“Agilent Technologies”, США). Метилловые эфиры жирных кислот разделяли на капиллярной колонке HP-5MS (0.25 мкм × 30 м × 0.25 мм) при градиенте температуры от 50 до 300°C со скоростью 40°C/мин. Газ-носитель — гелий. Липидные компоненты были ионизированы электронным ударом и анализированы в режиме сканирования масс. Эфиры жирных кислот идентифицировали с использованием библиотеки масс-спектров NIST17. Концентрации жирных

кислот в образцах определяли в процентах от суммы площадей всех пиков на хроматограмме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность и таксономический состав выделенных грибов. Грибы были обнаружены в 12-ти из 21-го образца (табл. 2). Численность их не высока — от единиц до тысяч КОЕ в пересчете на 1 г воздушно-сухих отложений.

В Норвежско-Гренландском бассейне и Баренцевом море вблизи острова Шпицберген большая часть грибов была выделена при культивировании посевов при 4°C, что закономерно, поскольку температура поверхностных осадочных отложений в этих районах не повышается выше 2°C. При этом в образце № 2 выявлено повышение численности до 8–9 тысяч КОЕ/г. Ранее нами было показано, что распределение грибов в многолетнемерзлых отложениях носит выраженный микроочаговый характер со вспышками численности в отдельных точках. При этом резкое увеличение данного показателя происходит за счет единичных видов (Озерская и соавт., 2008). В данном случае высокая численность достигнута за счет развития представителей единственного вида — *Penicillium chrysogenum*.

В образцах мелководного Карского моря численность грибов также была невысока, увеличиваясь только в образцах № 11 и 12, которые были отобраны вблизи полуострова Таймыр в районах впадения в море рек Пясины и Енисей.

Идентификация выделенных грибов проводилась на основании фенотипических и генотипических признаков. Все выделенные грибы были отнесены к 26 таксонам, которые принадлежат 7 классам грибов (табл. 3, рис. 1).

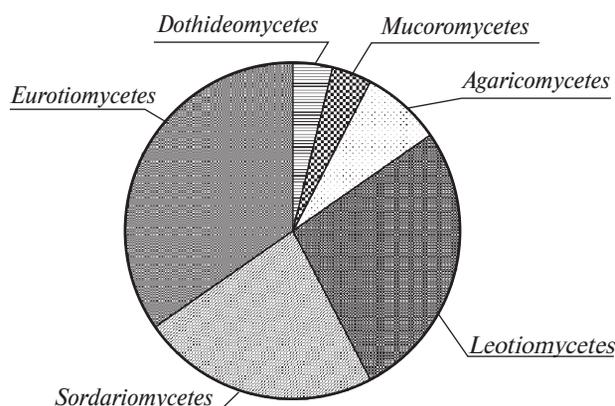


Рис. 1. Классы мицелиальных грибов.

С целью максимального выявления биоразнообразия в работе были использованы среды, наиболее универсальные для выделения грибов, и разные температуры культивирования посевов. Анализ результатов показал, что и натуральная (МА) и синтетическая (CZA) среды в равной степени удовлетворительны для выделения грибов из данных местообитаний. На численность грибов влияла температура культивирования посевов. При исследовании донных отложений Баренцева и Гренландского морей максимальная численность грибов наблюдалась при температуре культивирования 4°C. Особенно это характерно для образцов, где были отмечены всего 1–2 таксона (образцы 3, 4, 6, 8) (табл. 1). В 5 образцах из этого региона грибы выделились только при культивировании при 4°C. Для Карского моря картина обратная. Наибольшая численность грибов в образцах наблюдалась при культивировании посевов при 20°C.

Среди выделенных грибов обнаружено два базидиомицетовых, относящихся к классу *Agaricomycetes*

Таблица 2. Численность грибов в донных отложениях северных морей

№ образца	Местоположение	Точка отбора	Глубина станции (м)	Содержание анионов (мг/л)		Щелочность (мМ/л)	Число КОЕ/г при разных температурах культивирования	
				Cl ⁻	SO ₄ ²⁻		20°C	4°C
2	Гренландское море	7063, 5–6 см	319	17.82	2.76	2.5	7926.6	8997.8
3	Гренландское море	7068, 0–1 см	1206	18.02	2.83	2.2	0.0	10.1
4	Гренландское море	7068, 5–6 см	1206	18.09	2.87	2.4	0.0	33.9
5	Гренландское море	7087, 0–1 см	1204	18.04	2.73	2.2	335.7	447.5
6	Гренландское море	7087, 5–6 см	1204	17.62	2.79	2.4	0.0	32.0
8	Баренцево море	7091, 5–6 см	156	17.81	2.75	2.6	0.0	20.8
9	Баренцево море	7104, 0–1 см	269	17.88	2.92	2.3	36.7	48.9
10	Баренцево море	7104, 5–6 см	269	17.92	2.87	2.5	953.4	727.0
11	Карское море	7192, 0–3 см	21	16.26	2.61	9.30	2111.1	1222.2
12	Карское море	7194, 0–2 см	27.5	15.53	2.50	5.70	700.0	0.0
14	Карское море	7200, 0–3 см	50	17.42	2.85	8.00	62.5	0.0
21	Карское море	7267, 0–4 см	130	17.62	2.88	3.40	115.4	76.9

Таблица 3. Разнообразие грибов в донных отложениях северных морей

Виды грибов	Число образцов, в которых встретился вид в донных отложениях морей		
	Баренцево	Гренландское	Карское
<i>Aspergillus cibarius</i> S. B. Hong et R. A. Samson 2012	0	1	0
<i>Cadophora</i> sp.	0	0	1
<i>Cladosporium iridis</i> (Fautrey et Roum. 1891) G.A. de Vries 1952	0	1	0
<i>Coniochaeta</i> sp.	0	0	1
<i>Gymnostellatospora bhattii</i> (Samson 1972) Piątek et Czachura 2023 (syn. <i>Pseudogymnoascus bhattii</i> Samson 1972)	0	0	1
<i>Mucor zonatus</i> Milko 1967	0	0	1
<i>Oidiodendron periconioides</i> Morrall 1968	0	0	2
<i>Oidiodendron</i> sp.	0	0	1
<i>Oidiodendron tenuissimum</i> (Peck 1894) S. Hughes 1958	0	0	1
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom 1910	2	4	0
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx 1901	0	0	1
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer 1893) Westling 1911	1	0	0
<i>Penicillium lagenae</i> (Delitsch 1943) Stolk et Samson 1983	0	0	1
<i>Penicillium montanense</i> M. Chr. et Backus 1963	0	0	1
<i>Penicillium spinulosum</i> Thom 1910	0	0	1
<i>Penicillium swiecickii</i> K. W. Zaleski 1927	0	0	1
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burds. 1974	0	0	1
<i>Phellinidium ferrugineofuscum</i> (P. Karst. 1887) Fiasson et Niemelä 1984	0	1	0
<i>Pseudeurotium hygrophilum</i> (Sogonov, W. Gams, Summerb. et Schroers 2005) Minnis et D. L. Lindner 2013	0	0	1
<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> A. V. Rice et Currah 2006	0	0	1
<i>Talaromyces proteolyticus</i> (Kamyschko 1961) Samson, Yilmaz et Frisvad 2011	0	0	1
<i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams 1971	0	0	1
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link 1816) Rifai 1969	0	0	1
<i>Trichoderma paraviridescens</i> Jaklitsch, Samuels et Voglmayr 2013	0	0	1
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	1
<i>Verruciconidia persicina</i> (Nicot 1958) L. W. Hou, L. Cai et P. W. Crous 2023 (syn. <i>Acremonium persicinum</i> (Nicot 1958) W. Gams 1971)	0	1	0

(роды *Phellinidium* и *Phanerochaete*), и один зигомичетовый класса *Mucoromycetes* (род *Mucor*).

Все остальные штаммы, выделенные из донных отложений, были отнесены к 13 родам разных классов аскомицетовых грибов отдела *Pezizomycotina*:

Eurotiomycetes – роды *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*;

Leotiomycetes – роды *Cadophora*, *Gymnostellatospora*, *Oidiodendron*, *Pseudeurotium*, *Pseudogymnoascus*;

Sordariomycetes – роды *Coniochaeta*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Verruciconidia*;

Dothideomycetes – род *Cladosporium*.

Наши многолетние исследования арктических и антарктических многолетнемерзлых грунтов показали, что по частоте встречаемости в них обычно преобладают грибы классов *Leotiomycetes* и *Dothideomycetes* (Kochkina et al., 2019). В донных отложениях арктических морей преобладали

представители классов *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes* и *Sordariomycetes*.

Анализ имеющихся на сегодняшний день данных указывает на то, что, несмотря на существенные различия в физико-географических и климатических условиях, биоразнообразие низкотемпературных экотопов разной локализации схоже и определяется, в первую очередь, способностью организмов адаптироваться к экстремальным условиям среды обитания (Cox et al., 2016). Доминируют при этом эвритопные грибы с очень широким диапазоном распространения (Ding et al., 2016; Kochkina et al., 2019). Такие грибы способны использовать широкий спектр источников углерода, что важно в условиях непостоянного поступления органических веществ с потоками воды и глубоководными течениями.

Ранее проведенные исследования донных отложений в регионах Баренцева и Карского морей

свидетельствуют о высоком содержании в них грибов рода *Cladosporium* и стерильного мицелия (Бубнова, Никитин, 2017). В наших исследованиях наибольшей частотой встречаемости в районе Баренцева моря обладали грибы рода *Penicillium*. Эти грибы очень широко распространены в природе, обладают огромными возможностями в качестве продуцентов как полезных, так и токсических веществ, что сказывается на их конкурентоспособности и позволяет существовать в экстремальных местообитаниях. Известно, что грибы рода *Penicillium* способны расти при активности воды 0.85 (Sarkar et al., 2022). При анализе образцов донных отложений Чукотского моря китайские исследователи также установили доминирование представителей рода *Penicillium*, и, что интересно, практически все штаммы показали активный рост при 4°C (Luo et al., 2020). Большинство штаммов, выделенных нами в регионе Баренцева моря, кроме роста при пониженных температурах, обладали способностью к росту на средах с 10% NaCl, а некоторые штаммы — и с 20%.

В донных отложениях Гренландского моря, помимо грибов рода *Penicillium*, были найдены грибы не только других родов, но и классов. Среди них — аскомицетовые грибы *Cladosporium iridis*, *Verruciconidia persicina* (syn. *Acremonium persicinum*), *Aspergillus cibarius* и базидиомицетовый гриб — *Phellinidium ferrugineofuscum*. Последний ранее не встречался в донных отложениях, однако он является возбудителем белой гнили на корнях деревьев, и его находят преимущественно на сосне в зоне бореальных лесов (Ryvarden, Melo, 2017). По-видимому, его попадание в донные отложения связано с морскими течениями, характерными для исследованных районов Гренландского моря. *V. persicina* и *C. iridis* можно отнести к умеренным галотолерантам. Они растут при 10 и 15% NaCl в среде соответственно. Грибы рода *Cladosporium* часто обнаруживают в морских отложениях, но это относится к ограниченному числу видов — *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. perangustum* и *C. sphaerospermum*. Штамм вида *C. iridis*, представители которого обычно выделяются с травянистых растений, был обнаружен в донных отложениях впервые. Гриб *V. persicina*, напротив, часто находят в морских отложениях, в частности, в донных осадках Южно-Китайского моря (Luo et al., 2019). Он обладает высокой метаболической активностью и рассматривается как потенциальный продуцент редких антибиотических веществ (Yurchenko et al., 2021). Информации о нахождении грибов этого вида в морях Северного Ледовитого океана мы не обнаружили.

Наибольший интерес представляет ксеротолерантный гриб *A. cibarius* ВКМ F-4921 (de Hoog et al., 2005), принадлежащий секции *Aspergillus* рода *Aspergillus*. Грибы этой секции, ранее традиционно

относившиеся к роду *Eurotium*, являются ксеротолерантами и ксерофилами, часто выделяются из соленых растворов. Последние сведения об их возможностях свидетельствуют о способности некоторых штаммов расти в 2.1 М растворе MgCl₂, что близко к условиям поверхности Марса (Carre et al., 2022). Штамм *A. cibarius* был выделен нами с глубины 1206 м, т.е. может переживать высокое гидравлическое давление. Очевидно, что этот организм относится к группе грибов с высокими адаптивными способностями, которые могут функционировать при действии множества стрессоров. Такие грибы обычно проявляют оппортунистические свойства и часто становятся возбудителями микотических инфекций. В частности, представитель вида *A. cibarius* был отмечен как возбудитель полимикробного склероцератита (Hayashi et al., 2014).

Несмотря на то что только в 4 образцах донных отложений Карского моря из 11 были обнаружены грибы, их видовой состав там был значительно богаче. Наиболее широко были представлены грибы рода *Penicillium* (5 видов), *Trichoderma* (2 вида) и *Oidiodendron* (2 вида). Для двух последних родов не все штаммы удалось идентифицировать до вида даже с привлечением молекулярно-генетического метода.

Выделенные нами грибы рода *Trichoderma*, также как базидиомицетовый и зигомицетовый грибы — *Phanerochaete chrysosporium* и *Mucor zonatus*, тесно связаны с растительными и животными остатками и могут переноситься течениями на большие расстояния. Интересно, что первая и единственная находка гриба *M. zonatus* в экстремальных условиях была сделана недавно в Антарктиде на острове Кинг-Джорж (Martorell et al., 2019).

Микромицеты рода *Oidiodendron* ранее встречались в морских донных отложениях (Rice et al., 2005), в том числе и холодных северных морей (Хуснуллина и соавт., 2018). Грибы этого рода сапротрофы, обитающие на самых разных субстратах, поскольку являются продуцентами широкого набора ферментов — пектиназ, липаз, полифенолоксидаз и других. Среди представителей этого рода есть психрофилы и практически все штаммы являются психротолерантами. В нашем случае штаммы этого рода были выделены при температуре культивирования 4°C.

Среди остальных видов заслуживают особого внимания грибы класса *Leotiomycetes* (порядок *Thelebolales*) — *Gymnostellatospora bhattii*, *Pseudeurotium hygrophilum* и *Pseudogymnoascus appendiculatus*. Многие грибы этого порядка известны своим высоким адаптивным потенциалом и могут метаболизировать при действии множества стрессоров. Например, представители рода *Pseudogymnoascus* имеют высокую частоту встречаемости как в арктических местообитаниях, так и в Антарктиде, в том числе и в грунтах с высоким загрязнением нефтепродуктами. Более того,

штамм *P. pannorum*, выделенный из криопэга на Колымской низменности, обладал гало- и психротолерантными свойствами, его споры прорастали при температуре -2°C (Кочкина и соавт., 2014; Kochkina et al., 2019). Недавние исследования глубоководных отложений холодных антарктических морей (Южный океан), проведенные методом метабаркодирования, обнаружили ДНК около 300 видов грибов, из которых около 6% были доминирующими. В их число входили грибы рода *Pseudogymnoascus* (Ogaki et al., 2021). Это подтверждает, что набор грибов, составляющих биоразнообразие микобиоты донных отложений северных морей, в первую очередь зависит от способности микромицетов адаптироваться к экстремальным местообитаниям, и в меньшей степени определяется географическим местоположением холодного водоема.

Таким образом, в донных отложениях арктических морей обнаружены грибы, имеющие широкий ареал наземного распространения, но приспособившиеся к существованию или переживанию в условиях морских глубин. Однако среди всех обнаруженных грибов выделяется группа штаммов, способных к росту на средах с повышенным содержанием солей и имеющих активный рост при пониженных температурах. Именно среди них было проведено изучение изменения жирнокислотного профиля в ответ на осмотический стресс.

Физиологические особенности микромицетов, выделенных из изученных образцов. Было определено влияние температуры культивирования и разных концентраций NaCl в среде на рост штаммов всех идентифицированных грибов. Установлено, что культуры большинства видов имели оптимум роста в интервале температур $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$. Исключение составили штаммы видов *Penicillium swiecickii*, *Pseudeurotium hygrophilum*,

Pseudogymnoascus appendiculatus. Скорость роста этих культур при 15°C была на 40–50% выше, чем при 25°C . Ранее при изучении культур из многолетнемерзлых грунтов Арктики и Антарктики мы обнаружили сдвиг температурных границ роста культур отдельных видов в сторону низких температур по сравнению с литературными данными, представленными в определителях, связанный с адаптацией их метаболизма к пониженным температурам (Ivanushkina et al., 2005; Кочкина и соавт., 2014). Это были виды родов *Penicillium*, *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*. Сходные результаты были получены и в настоящем исследовании.

Все выделенные из морских донных отложений штаммы были проверены на способность к росту на средах с добавлением NaCl (от 5 до 20%). Штаммы базидиомицетовых грибов, зигомицетовый гриб, представители всех видов родов *Oidiodendron* и *Trichoderma* и некоторые другие не росли даже при 5% соли в среде. Представители остальных таксонов, представленные в табл. 4, развивались на разных концентрациях соли в среде.

Наиболее устойчивым к соли оказался штамм *Aspergillus cibarius*, выделенный из донных отложений Гренландского моря (глубина 319 м). Более того, данный штамм проявил ксерофильные свойства. Его рост на средах с 20% сахарозы и с концентрацией соли в среде до 15% был интенсивнее, чем в контроле. Концентрация соли до 20% в среде не подавляла полностью рост еще двух штаммов — *Penicillium chrysogenum* и *Cladosporium iridis*, также выделенных из глубинных отложений Гренландского моря (319 и 1206 м соответственно). Остальные 11 штаммов росли при 5% соли в среде, а 6 из них — и при 10%. Большая часть штаммов, проявивших рост на среде с 10% соли, была выделена с больших глубин Баренцева и Гренландского морей (269 и 1204 м соответственно). Три штамма были выделены с небольшой

Таблица 4. Отношение диаметров колоний грибов на средах с разными концентрациями NaCl к контролю* (%)

№ п/п	Штамм ВКМ	Таксон	Концентрация NaCl, %			
			5	10	15	20
1	F-4921	<i>Aspergillus cibarius</i>	394	350	136	75
2	F-4917	<i>Penicillium chrysogenum</i>	70	48	32	16
3	F-4919	<i>Cladosporium iridis</i>	71	29	21	4
4	F-4899	<i>Penicillium corylophilum</i>	84	31	6	0
5	F-4918	<i>Penicillium glabrum</i>	89	47	0	0
6	F-4965	<i>Penicillium swiecickii</i>	65	41	0	0
8	F-4923	<i>Pseudeurotium hygrophilum</i>	49	37	0	0
9	F-4925	<i>Tolyposcladium in flatum</i>	29	27	0	0
10	F-4959	<i>Verruciconidia persicina</i>	29	12	0	0
11	F-4900	<i>Penicillium montanense</i>	42	0	0	0
12	F-4969	<i>Penicillium lagenae</i>	67	0	0	0
13	F-4960	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i>	29	0	0	0
14	F-4929	<i>Gymnostellatospora bhattii</i>	10	0	0	0

*Контролем является среда без добавления соли.

глубины (21 м) Карского моря, из образца с самым богатым видовым разнообразием.

Изменение профилей жирных кислот штаммов при добавлении соли в среду. На основании полученных данных о росте грибов на средах с повышенным осмотическим потенциалом были отобраны штаммы для изучения изменения состава жирных кислот в зависимости от концентрации соли в среде культивирования (табл. 5).

Было установлено, что при 10% соли в среде у штаммов *P. corylophilum* и *P. swiecickii* снижается относительное содержание насыщенных (пальмитиновой и стеариновой) и увеличивается доля ненасыщенных (линолевой и олеиновой) жирных кислот. У штаммов *C. iridis* и *P. glabrum* доля длинноцепочечных кислот (с количеством атомов углерода выше 16) при повышении концентрации соли в среде практически не меняется, но несколько возрастает относительное содержание олеиновой и линолевой кислот соответственно.

У штаммов, снижающих темпы роста при повышении солености, линоленовая кислота не участвует в защите клеток при гиперсолености, в отличие от ранее проведенных наблюдений реакции аскомицетовых грибов на низкотемпературный стресс (Конова и соавт., 2009). Так, в процессе метаболизма штамма *P. chrysogenum* при повышении концентрации соли в среде снижается доля линоленовой кислоты, но увеличивается относительное содержание олеиновой и линолевой кислот.

Особый интерес представляет собой профиль жирных кислот штамма *A. cibarius*, скорость роста

которого повышается при добавлении соли в среду. Его рост при 20% NaCl в среде мало отличается от роста в среде без соли. А при 10% соли увеличивается в 3.5 раза по сравнению с контролем. Состав жирных кислот в биомассе этого штамма сильно отличается от других исследованных культур. В частности, полностью отсутствует линолевая кислота вне зависимости от состава среды. Добавление соли в среду не приводит к увеличению длинноцепочечных кислот. В среде, где культура растет быстрее, увеличивается количество полиненасыщенной линоленовой кислоты на 10–12%, которая обнаруживается во всех вариантах опыта.

Очевидно, что в глубоководных условиях грибы испытывают действие разных стрессоров. Но защита клетки от различных неблагоприятных воздействий может быть сходна. Например, есть данные, что низкая температура и высокое гидростатическое давление оказывают сходное воздействие на биологические мембраны. Давление 1000 атм при температуре 2°C оказывает на мембраны тот же эффект, как и температура –18°C при обычном атмосферном давлении. Считается, что глубоководные бактерии сохраняют функциональность при высоком давлении и низкой температуре за счет увеличения доли мононенасыщенных жирных кислот в их липидах, в частности, олеиновой кислоты (Simonato et al., 2006). При осмотическом стрессе одним из способов регулирования текучести мембраны микроорганизмов является изменение индекса ненасыщенности жирных кислот. Для одного из самых ксерофильных грибов *Xeromyces bisporus* показано, что тенденция к уменьшению индекса ненасыщенности жирных

Таблица 5. Изменения состава жирных кислот в биомассе штаммов грибов на средах с разной концентрацией NaCl

Штаммы	<i>Penicillium chrysogenum</i> ВКМ F-4917			<i>Penicillium glabrum</i> ВКМ F-4918		<i>Cladosporium iridis</i> ВКМ F-4919		<i>Penicillium swiecickii</i> ВКМ F-4965		<i>Penicillium corylophilum</i> ВКМ F-4899		<i>Aspergillus cibarius</i> ВКМ F-4921		
	0	10	20	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	15
Жирные кислоты, % от суммы														
$C_{16:0}$ Пальмитиновая	14.76	14.07	13.63	18.01	18.47	31.07	28.08	17.95	14.36	17.58	13.98	13.01	12.52	10.78
$C_{16:1\omega_9}$ Пальмитолеиновая	–	0.34	–	3.13	2.51	0.97	–	1.74	–	6.32	1.76	–	–	–
$C_{18:0}$ Стеариновая	5.62	4.02	2.75	6.08	5.67	7.22	5.78	4.61	3.14	6.16	4.46	10.28	7.31	6.89
$C_{18:1\omega_9}$ Олеиновая	–	10.65	12.47	23.52	14.98	19.68	37.81	19.32	23.53	20.04	24.16	20.87	14.64	29.27
$C_{18:2\omega_{9,12}}$ Линолевая	58.85	67.86	71.15	49.26	58.05	41.06	28.33	42.89	57.57	48.04	55.63	–	–	–
$C_{18:3\omega_{9,12,15}}$ Линоленовая	19.49	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	55.85	65.53	53.06
Другие	1.28	3.06	–	–	0.32	–	–	13.49	1.40	1.85	0.09	–	–	–
Степень ненасыщенности	1.8	1.5	1.5	1.2	1.3	1.0	0.9	1.1	1.4	1.2	1.4	1.9	2.1	1.9

кислот может рассматриваться как адаптивная реакция при осмострессе (Sagar, 2022).

В нашем исследовании мы обнаружили, что состав жирных кислот изменяется в зависимости от условий солености среды, но ответ на осмостресс у изученных культур из глубоководных донных отложений различается. С ростом концентрации соли степень ненасыщенности жирных кислот для штамма *Penicillium chrysogenum* ВКМ F-4917 изменялась от 1.8 до 1.5, для штамма *Penicillium glabrum* ВКМ F-4918 — от 1.2 до 1.3, для штамма *Cladosporium iridis* ВКМ F-4919 — от 1.0 до 0.9, для штамма *Penicillium swiecickii* ВКМ F-4965 — от 1.1 до 1.4, для штамма *Penicillium corylophilum* ВКМ F-4899 — от 1.2 до 1.4, для штамма *Aspergillus cibarius* ВКМ F-4921 — от 1.9 до 2.1 (табл. 5).

В липидах биомассы штаммов, рост которых угнетается присутствием повышенного содержания соли, в среде с увеличенной концентрацией NaCl (10–20%) во всех случаях изменяется доля ненасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот. У четырех штаммов рода *Penicillium* (табл. 5) наблюдается практически одинаковая реакция на увеличение соли в среде. Изменение профиля жирных кислот происходит в основном за счет линолевой кислоты, возрастание количества которой является ответной реакцией на солевой стресс. Иначе реагирует на действие стрессора гриб *Cladosporium iridis*. Снижение степени ненасыщенности липидов у него происходит за счет резкого уменьшения линолевой кислоты и увеличения олеиновой. Увеличение олеиновой кислоты при осмострессе мы наблюдали ранее при изучении культуры гриба *Pseudogymnoascus ramporum*, выделенного из криопэггов Арктики (Копова и соавт., 2009). Это свидетельствует об ином типе защиты клеток от стресса. Увеличивается жесткость мембраны (Simonato et al., 2006), и меняется ее проницаемость, что, возможно, защищает от выхода из клеток протекторов, которые могут образовываться при действии стрессора (многоатомные спирты, сахара и др.). Аналогичное повышение олеиновой кислоты и снижение линолевой, приводящее к увеличению жесткости мембраны, описано у грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium* в ответ на осмотический стресс (Leong et al., 2015).

Совершенно иной профиль жирных кислот у *Aspergillus cibarius*. Видно, что у галофильной культуры с оптимумом роста при повышенном содержании соли, в липогенезе большую роль играет линоленовая кислота и полностью отсутствует линолевая. Клетки этого микроорганизма содержат в мембране полиненасыщенную жирную кислоту в большом количестве, и состав жирных кислот практически не меняется при увеличении соли в среде. Клетка защищена конститутивно, и изменение среды не является для нее стрессом. Таким образом, у культур с разной степенью галотолерантности наблюдается различная

реакция профиля жирных кислот на действие осмострессора.

В заключение необходимо отметить, что способность к росту в широком диапазоне температур, солености, гидростатического давления, которые имеют место в экстремальных глубоководных условиях, делают грибы, выделенные из донных отложений, перспективным объектом изучения в отношении ферментов и вторичных метаболитов, полезных для биотехнологии и фармацевтики.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1051, госзадания ФИЦ ПНЦБИ РАН и госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов благодарит руководителя ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН Колганову Татьяну Владимировну за неоценимую помощь в установлении молекулярно-генетических диагнозов выделенных грибов, а также научный состав и экипаж НИС “Академик Мстислав Келдыш” за предоставленные образцы донных осадков.

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

- Бубнова Е. Н., Бондаренко С. А., Георгиева М. Л. Первые сведения о грибах арктических морей Сибири // Труды VIII Международной научно-практической конференции “Морские исследования и образование (MARESEDU-2019)”. Т. I (III). Тверь: ООО “ПолиПРЕСС”, 2020. С. 383–384.
- Бубнова Е. Н., Коновалова О. П. Грибы в донных грунтах Чукотского моря // Биология моря. 2019. Т. 45. № 2. С. 86–96.
<https://doi.org/10.1134/S0134347519020025>
- Бубнова Е. Н., Никитин Д. А. Грибы в донных грунтах Баренцева и Карского морей // Биология моря. 2017. Т. 43. С. 366–371.

- Bubnova E. N., Nikitin D. A.* Fungi in bottom sediments of the Barents and Kara Seas // *Russ. J. Mar. Biol.* 2017. V. 43. P. 400–406.
- Конова И. В., Сергеева Я. Э., Галанина Л. А., Кочкина Г. А., Иванушкина Н. Е., Озерская С. М.* Липогенез грибов *Geomyces pannorum* при воздействии стрессоров // *Микробиология.* 2009. Т. 78. С. 52–58.
- Konova I. V., Sergeeva Ya. E., Galanina L. A., Kochkina G. A., Ivanushkina N. E., Ozerskaya S. M.* Lipid synthesis by *Geomyces pannorum* under the impact of stress factors // *Microbiology (Moscow).* 2009. V. 78. P. 42–47.
- Кочкина Г. А., Иванушкина Н. Е., Акимов В. Н., Гиличинский Д. А., Озерская С. М.* Галописхротолерантные грибы рода *Geomyces* из криопэггов и морских отложений Арктики // *Микробиология.* 2007. Т. 76. С. 39–47.
- Kochkina G. A., Ivanushkina N. E., Akimov V. N., Gilchinsky D. A., Ozerskaya S. M.* Halopsychrotolerant fungi of the genus *Geomyces* from cryopegs and marine sediments of the Arctic // *Microbiology (Moscow).* 2007. V. 76. P. 39–47.
- Кочкина Г. А., Озерская С. М., Иванушкина Н. Е., Чигинева Н. И., Василенко О. В., Спирина Е. В., Гиличинский Д. А.* Разнообразие грибов деятельного слоя Антарктиды // *Микробиология.* 214. Т. 83. С. 236–244
<https://doi.org/10.7868/s002636561402013x>
- Kochkina G. A., Ozerskaya S. M., Ivanushkina N. E., Chigineva N. I., Vasilenko O. V., Spirina E. V., Gilichinskii D. A.* Fungal diversity in the Antarctic active layer // *Microbiology (Moscow).* 2014. V. 83. P. 94–101.
- Мамаева Е. В., Галачьянц Ю. П., Хабудаев К. В., Петрова Д. П., Погодаева Т. В., Ходжер Т. В., Земская Т. И.* Метагеномный анализ микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря и Енисейского залива // *Микробиология.* 2016. Т. 85. С. 187–198.
- Mataveva E. V., Galach'yants Y. P., Khabudaev K. V., Petrova D. P., Pogodaeva T. V., Khodzher T. B., Zemskaya T. I.* Metagenomic analysis of microbial communities of the sediments of the Kara Sea shelf and the Yenisei Bay // *Microbiology (Moscow).* 2016. V. 85. P. 220–230.
- Озерская С. М., Кочкина Г. А., Иванушкина Н. Е., Князева Е. В., Гиличинский Д. А.* Структура комплексов микромицетов в многолетнемерзлых грунтах и криопэггах Арктики // *Микробиология.* 2008. Т. 77. С. 542–550.
- Ozerskaya S. M., Kochkina G. A., Ivanushkina N. E., Knyazeva E. V., Gilichinskii D. A.* The structure of micro-mycete complexes in permafrost and cryopegs of the Arctic // *Microbiology (Moscow).* 2008. Т. 77. P. 482–489.
- Стахов В. Л., Губин С. В., Максимович С. В., Ребриков Д. А., Савилова А. М., Кочкина Г. А., Озерская С. М., Иванушкина Н. Е., Воробьева Е. А.* Микробные сообщества древних семян, извлеченных из многолетнемерзлых плейстоценовых отложений // *Микробиология.* 2008. Т. 77. С. 396–403.
- Stakhov V. L., Gubin S. V., Maksimovich S. V., Rebrikov D. V., Savilova A. M., Kochkina G. A., Ozerskaya S. M., Ivanushkina N. E., Vorobyova E. A.* Microbial communities of ancient seeds derived from permanently frozen Pleistocene deposits // *Microbiology (Moscow).* 2008. V. 77. P. 348–355.
- Хуснуллина А. И., Биланенко Е. Н., Кураков А. В.* Микроскопические грибы донных грунтов Белого моря // *Сибирский экологический журнал.* 2018. Т. 25. С. 584–598.
<https://doi.org/10.15372/SEJ20180507>
- Khusnullina A. I., Bilanenko E. N., Kurakov A. V.* Microscopic fungi of White Sea sediments // *Contemp. Probl. Ecol.* 2018. V. 11. P. 503–513.
- Begmatov S., Savvichev A. S., Kadnikov V. V., Beletsky A. V., Rusanov I. I., Klyuvitkin A. A., Novichkova E. A., Mardanov A. V., Pimenov N. V.* Microbial communities involved in methane, sulfur, and nitrogen cycling in the sediments of the Barents Sea // *Microorganisms.* 2021. V. 9. Art. 2362.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9112362>
- Burgaud G., Hué N. T. M., Arzur D., Coton M., Perrier-Cornet J. M., Jebbar M., Barbier G.* Effects of hydrostatic pressure on yeasts isolated from deep-sea hydrothermal vents // *Res. Microbiol.* 2015. V. 166. P. 700–709.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.07.005>
- Carré L., Zaccai G., Delfosse X., Girard E., Franzetti B.* Relevance of earth-bound extremophiles in the search for extraterrestrial life // *Astrobiology.* 2022. V. 22. P. 322–367.
<https://hal.science/hal-03819312>
- Cox F., Newsham K. K., Bol R., Dungait J. A. J., Robinson C.* Not poles apart: Antarctic soil fungal communities show similarities to those of the distant Arctic // *Ecol. Lett.* 2016. V. 19. P. 528–536.
<https://doi.org/10.1111/ele.12587>
- de Hoog G. S., Zalar P., van den Ende B. G., Gunde-Cimerman N.* Relation of halotolerance to human-pathogenicity in the fungal tree of life: an overview of ecology and evolution under stress // *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea* / Eds. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. Dordrecht: Springer, 2005. P. 371–397.
- Ding Z., Li L., Che Q., Li D., Gu Q., Zhu T.* Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica // *Extremophiles.* 2016. V. 20. P. 425–435.
<https://doi.org/10.1007/s00792-016-0833-y>
- Hagestad O. C., Andersen J. H., Altermark B., Hansen E., Rämä T.* Cultivable marine fungi from the Arctic Archipelago of Svalbard and their antibacterial activity // *Mycology.* 2020. V. 11. P. 230–242.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1708492>
- Hayashi Y., Eguchi H., Toibana T., Mitamura Y., Yaguchi T.* Polymicrobial sclerokeratitis caused by *Scedosporium apiospermum* and *Aspergillus cibarius* // *Cornea.* 2014. V. 33. P. 75–877.
- Ivanushkina N. E., Kochkina G. A., Ozerskaya S. M.* Fungi in ancient permafrost sediments of the Arctic and Antarctic regions // *Life in Ancient ice* / Eds. J. Castello, S. Rogers. Ch. 9. Proc. Prins. Univ. Princeton: Princeton Univ. Press, 2005. P. 127–139.

- Jin L., Quan C., Hou X., Fan S. Potential pharmacological resources: natural bioactive compounds from marine-derived fungi // *Mar. Drugs*. 2016. V. 14. Art. 76. <https://doi.org/10.3390/md14040076>
- Kochkina G. A., Ivanushkina N. E., Lupachev A. V., Starodumova I. P., Vasilenko O. V., Ozerskaya S. M. Diversity of mycelial fungi in natural and human-affected Antarctic soils // *Polar Biol*. 2019. V. 42. P. 47–64. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2398-y>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol*. 2018. V. 35. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Leong S. L. L., Lantz H., Pettersson O. V., Frisvad J. C., Thrane U., Heipieper H. J., Dijksterhuis J., Grabherr M., Pettersson M., Tellgren-Roth C., Schnürer J. Genome and physiology of the ascomycete filamentous fungus *Xeromyces bisporus*, the most xerophilic organism isolated to date // *Environ. Microbiol*. 2015. V. 17. P. 496–513.
- Luo M., Zang R., Wang X., Chen Z., Song X., Ju J., Huang H. Natural hydroxamate-containing siderophore acremonpeptides A–D and an aluminum complex of acremonpeptide D from the marine-derived *Acremonium persicinum* SCSIO 115 // *J. Nat. Prod*. 2019. V. 82. P. 2594–2600. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00545>
- Luo Y., Xu W., Luo Zh.-H., Pang K.-L. Diversity and temperature adaptability of cultivable fungi in marine sediments from the Chukchi Sea // *Bot. Mar*. 2020. V. 63. P. 197–207. <https://doi.org/10.1515/bot-2018-0119>
- Margesin R., Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms // *Res. Microbiol*. 2011. V. 162. P. 346–361. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004>
- Martorell M. M., Ruberto L. A. M., Fernandez P. M., De Figueroa L. I. C., Mac Cormack W. P. Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi // *Antarct. Sci*. 2019. V. 31. P. 3–12. <https://doi.org/10.1017/S0954102018000421>
- Namsaraev Z., Kozlova A., Tuzov F., Krylova A., Izotova A., Makarov I., Bezgreshnov A., Melnikova A., Trofimova A., Kuzmin D., Patrushev M., Toshchakov S. Biogeographic analysis suggests two types of planktonic prokaryote communities in the Barents Sea // *Biology*. 2023. V. 12. Art. 1310. <https://doi.org/10.3390/biology12101310>
- Ogaki M. B., Pinto O. H. B., Vieira R., Neto A. A., Convey P., Carvalho-Silva M., Rosa C. A., Camara P., Rosa L. H. Fungi present in Antarctic deep-sea sediments assessed using DNA metabarcoding // *Microb. Ecol*. 2021. V. 82. P. 157–164. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01658-8>
- Ozerskaya S., Kochkina G., Ivanushkina N., Gilichinsky D. Fungi in permafrost // *Permafrost soils* / Ed. R. Margesin (Austria). Berlin–Heidelberg: Springer Verlag, 2009. P. 85–95. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69371-0_7
- Rapp J. Z., Fernández-Méndez M., Bienhold C., Boetius A. Effects of ice-algal aggregate export on the connectivity of bacterial communities in the Central Arctic Ocean // *Front. Microbiol*. 2018. V. 9. Art. 1035. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01035>
- Rice A. V., Currah R. S. *Oidiodendron*: A survey of the named species and related anamorphs of *Myxotrichum* // *Stud. Mycol*. 2005. V. 53. P. 83–120. <https://doi.org/10.3114/sim.53.1.83>
- Ryvarden L., Melo I. Poroid fungi of Europe // *Synopsis Fungorum*. V. 37. Oslo: Fungiflora A/S, 2017. 431 p.
- Sarkar S., Singh N. A., Rai N. Xerophilic fungi: physiology, genetics and biotechnology // *Extremophilic fungi* / Eds. Sahay S. Singapore: Springer Nature, 2022. P. 253–270.
- Savvichev A. S., Rusanov I. I., Kadnikov V. V., Beletsky A. V., Zakcharova E. E., Samylyna O. S., Sigalevich P. A., Semiletov I. P., Ravin N. V., Pimenov N. V. Biogeochemical activity of methane-related microbial communities in bottom sediments of cold seeps of the Laptev Sea // *Microorganisms*. 2023. V. 11. Art. 250. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020250>
- Sayed A. M., Hassan M. H., Alhadrami H. A., Hassan H. M., Goodfellow M., Rateb M. E. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites // *J. Appl. Microbiol*. 2020. V. 128. P. 630–657. <https://doi.org/10.1111/jam.14386>
- Shukla S., Shukla H. Ecology, physiology, and diversity of piezophilic fungi // *Extremophilic fungi* / Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. P. 141–170. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4907-3_8
- Simonato F., Campanaro S., Lauro F. M., Vezzi A., D'Angelo M., Vitulo N., Valle G., Bartlett D. H. Piezophilic adaptation: a genomic point of view // *J. Biotechnol*. 2006. V. 126. P. 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.038>
- Wang Y. N., Meng L. H., Wang B. G. Progress in research on bioactive secondary metabolites from Deep-Sea derived microorganisms // *Mar. Drugs*. 2020. V. 18. Art. 614. <https://doi.org/10.3390/md18120614>
- Yurchenko A. N., Girich E. V., Yurchenko E. A. Metabolites of marine sediment-derived fungi: Actual trends of biological activity studies // *Mar. Drugs*. 2021. V. 19. P. 88. <https://doi.org/10.3390/md19020088>

Fungi of the Arctic Seas

G. A. Kochkina^{1, *}, I. P. Pinchuk¹, N. E. Ivanushkina¹, A. N. Avtukh¹, and N. V. Pimenov²

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

²*Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: gak@dol.ru*

Received November 10, 2023; revised November 19, 2023; accepted November 28, 2023

Abstract—The abundance and diversity of mycelial fungi in the bottom sediments of the Arctic Ocean seas (the Greenland, Barents and Kara seas) were studied. Samples of the surface bottom sediments were collected during the 84th (July–August 2021) and 86th (October–November 2021) cruises of RV *Akademik Mstislav Keldysh*. The taxonomic affiliation of the isolated fungi was determined using polyphasic taxonomy. The isolated fungi belonged to 16 genera of different classes of ascomycetous, basidiomycetous, and zygomycetous fungi. The effect of cultivation temperature and different NaCl concentrations on fungal growth was determined, as well as the effect of cultivation conditions on the fatty acid profile for the strains capable of growth on media with increased osmotic potential. While fatty acid composition was shown to be affected by changes in environmental conditions, the response to osmotic stress differed among the studied cultures from deep-sea sediments.

Keywords: filamentous fungi, bottom sediments, biodiversity, seas of the Arctic Ocean

УДК 579.24+574.38+574.472+579.8.06+550.72

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ Fe- И Mn-ОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ И ЧИСЛЕННОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В Fe-Mn ОРТШТЕЙНАХ РАЗНОГО РАЗМЕРА

© 2024 г. Я. О. Тимофеева^a, Е. С. Мартыненко^{a, b, *}, М. Л. Сидоренко^a,
А. В. Ким^{a, b}, В. М. Казарин^a

^aФедеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,
Владивосток, 690022 Россия

^bДальневосточный федеральный университет, Владивосток, о. Русский, 690922 Россия

*e-mail: martynenko98@inbox.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 18.10.2023 г.

Принята к публикации 20.10.2023 г.

Проанализировано таксономическое разнообразие и численное распределение культивируемых форм Fe- и Mn-окисляющих микроорганизмов в Fe-Mn ортштейнах разного размера и почвенном мелкоземе дерново-буро-подзолистых глееватых почв, сформированных на территории, не подверженной влиянию прямого техногенного воздействия. Результаты получены с использованием комбинации микробиологических, молекулярных и аналитических методов, а также не инвазивных методик. Основной объем микроорганизмов, культивированных из ортштейнов, относился к группе Mn-окисляющих. В ортштейнах идентифицированы бактерии родов *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Priestia*, из которых 4 рода являлись ортштейно-специфичными. Специфика численного распределения Mn- и Fe-окисляющих микроорганизмов во внешней и внутренней зонах ортштейнов разного размера отражает участие Mn-окисляющих микроорганизмов на всех стадиях формирования и развития ортштейнов и Fe-окисляющих микроорганизмов на начальных этапах их формирования. В исследованных ортштейнах обнаружены сферулы и губчатые структуры бактериальной природы. Почвенный мелкозем, вмещающий ортштейны, характеризуется изменением численности доминантных групп микроорганизмов по профилю. Марганец-окисляющие бактерии почвенного мелкозема представлены родами *Priestia* и *Methylobacterium*.

Ключевые слова: Fe-Mn ортштейны, Mn-окисляющие микроорганизмы, Fe-окисляющие микроорганизмы, таксономический состав бактерий, дерново-буро-подзолистые глееватые почвы

DOI: 10.31857/S0026365624030047

Железо-марганцевые ортштейны (ЖМО) представляют собой обособленные от вмещающей почвенной массы образования со специфичным строением и составом (минералогический, химический) и являются наиболее распространенной формой почвенных марганцево-железистых конкреционных новообразований (Росликова, 1996; Зайдельман, Никифорова, 2001; Timofeeva et al., 2014; Ettler et al., 2017; Gasparatos et al., 2019; Timofeeva et al., 2021). Результаты многочисленных исследований указывают на диагностическое значение ЖМО в почвах с переменным типом окислительно-восстановительного режима и на эффективность ЖМО в накоплении и ограничении подвижности ряда элементов с переменной валентностью (Cornu et al., 2005; Tan et al., 2006; Gasparatos, 2012; Пуртова, Тимофеева, 2022; Fischel et al., 2023). В настоящее время в разделе исследования почвенных ЖМО имеется достаточно большой объем

информации, посвященный вопросам их состава, строения, распределения и генезиса. Обязательными условиями для образования и развития ЖМО являются наличие в почвенном мелкоземе достаточного количества ионов Fe, Mn и контрастное чередование окислительно-восстановительных процессов (Костенков, 1986; Росликова, 1996; Зайдельман, Никифорова, 2001; Gasparatos et al., 2019; Sipos et al., 2022; Fischel et al., 2023). Несмотря на существование спорных точек зрения, механизм образования ЖМО в почвах определяется факторами, способствующими осаждению в микрочастицах основных ортштейнообразующих соединений ((гидр)оксиды Fe и Mn) (Костенков, 1986; Зайдельман, Никифорова, 2001; Тимофеева, Голов, 2010; Gasparatos et al., 2019). Одним из таких факторов является микробиологическая трансформация Fe и Mn, которая включает извлечение металлов из почвенного раствора, их дальнейшее осаждение

и накопление микроорганизмами (Аристовская, 1975; Пиневиц, 2005; Водяницкий, 2010; Лысак и соавт., 2013).

В отечественной и зарубежной литературе недостаточно результатов исследований, охватывающих вопросы участия почвенной микрофлоры в формировании и развитии ЖМО, чтобы однозначно оценить вклад микроорганизмов в процессы трансформации элементов при образовании ортштейнов в почвах и круговороте элементов в целом. Результаты немногочисленных исследований, направленных на изучение состава микроорганизмов в Fe-Mn новообразованиях, демонстрируют варьирование таксономических групп и бактериальных комплексов в новообразованиях различных типов почв (Шапова, 1994; Лысак и соавт., 2013; Hu et al., 2015). В конкрециях дерново-подзолистых почв Московской области обнаружены представители филумов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*; из конкреций почв рисовых и тростниковых полей на юге Китая выделены представители *Burkholderiales*, *Rhodocyclales*, *Acidobacteriales*, *Desulfuromonales* и *Clostridiales*; в ЖМО почв морских террас США отмечено ведущее участие микроскопических грибов в осажении Fe (Schulz et al., 2010; Лысак и соавт., 2013; Hu et al., 2015).

Почвы юга Дальнего Востока характеризуются активным проявлением процесса ортштейнообразования. Содержание ЖМО в отдельных горизонтах почв может достигать 33% от веса почвенной массы (Росликова, 1996; Тимофеева, 2008; Timofeeva et al., 2021; Пуртова, Тимофеева, 2022). При этом сведения о роли микроорганизмов в формировании ЖМО весьма эпизодичны и представлены единичными упоминаниями об участии видов *Pedomicrobium* и *Metallogenium* в начальных стадиях формирования ортштейнов (Шапова, 1994). Кроме того, основная часть результатов исследований микроорганизмов в ЖМО представлена данными, полученными с территорий, испытывающих воздействие различных техногенных факторов (почвы урбанизированных ландшафтов, агроэкосистем). Это не позволяет получить достоверную информацию об участии различных групп почвенных микроорганизмов в формировании и развитии ЖМО в почвах естественных, не нарушенных антропогенной деятельностью экосистем и оценить воздействие техногенеза на прохождение указанных процессов.

Целью исследования являлось изучение численности культивируемых форм микроорганизмов и таксономического разнообразия Fe- и Mn-окисляющих бактерий в ортштейнах разного размера, формирующихся в почвах, не испытывающих прямого техногенного воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследований. Для оценки вклада микроорганизмов в формирование ЖМО заложено три полнопрофильных почвенных разреза на территории национального парка “Земля Леопарда” (43°50'69"–43°52'60" с.ш., 131°73'00"68–131°71'55" в.д.), который расположен на юго-западе Приморского края. Территория национального парка не подвержена влиянию прямого техногенного воздействия и относится к условно незагрязненной. Объектом исследований являлись образцы ЖМО и вмещающего почвенного мелкозема дерново-буро-подзолистый глееватых почв. Исследованные почвы имели следующее строение профиля: горизонт АУ (мощность от 11 до 16 см) — темно-серого цвета, однородной окраски, содержит плотные и мягкие бурые Fe-Mn ортштейны бурого и темно-бурого цветов, легкосуглинистый, комковатой структуры, рыхлый с волнистой границей и ясным переходом в горизонт Yelnn (мощность от 8 до 12 см) — серовато-бурого цвета с единичными мелкими размытыми пятнами темно-бурого цвета, встречаются многочисленные мелкие примазки охристого и темно-бурого цветов, содержит плотные и мягкие бурые Fe-Mn ортштейны, среднесуглинистый, комковато-призматической структуры, уплотнен, переход в нижележащий горизонт постепенный, граница не выражена, BELnn, g (мощность от 32 до 41 см) — бурого цвета с многочисленными контрастными пятнами охристого цвета, встречаются многочисленные примазки охристого цвета, содержит плотные и мягкие темно-бурые Fe-Mn ортштейны, тяжелосуглинистый, мелко-призматической структуры, плотный, переход в нижележащий горизонт постепенный, граница языковатая, VTg (мощность от 39 до 53 см) — темно-бурый с многочисленными мелкими размытыми пятнами охристого цвета, встречаются многочисленные примазки охристого цвета, содержит плотные и мягкие темно-бурые Fe-Mn ортштейны, глинистый, призматической структуры, твердый, переход нижележащий горизонт постепенный, граница волнистая, BCg (мощность до 23 см) — охристо-бурого цвета с многочисленными крупными размытыми пятнами охристого и сизого цветов, встречаются единичные мелкие примазки темно-бурого цвета, в верхней части горизонта присутствуют единичные мягкие и плотные Fe-Mn ортштейны разного размера, глинистый, крупно-призматической структуры, плотный. Названия почв приведены согласно классификации и диагностике почв России (Классификация и диагностика почв России, 2004).

Отбор образцов. Для микробиологических исследований почвенные монолиты, содержащие ЖМО, отбирали стерильными инструментами и помещали в стерильный упаковочный материал

согласно ГОСТ 17.4.4.02–84. Образцы были упакованы в сумки-холодильники и доставлены в лабораторию для незамедлительного исследования. В лабораторных условиях ЖМО тщательно отделяли от вмещающего почвенного мелкозема при помощи захватного прецизионного пинцета и настольной оптической лупы с 10-кратным увеличением. Разделение ЖМО по размерным фракциям проводили при помощи линейки. Марганец- (MnOM) и Fe-окисляющие микроорганизмы (FeOM) культивировали из внешней и внутренней зон ЖМО и вмещающего почвенного мелкозема. Для выделения микроорганизмов из внутренней зоны ЖМО промывали физиологическим раствором и стерилизовали 70% раствором C_2H_5OH в течение 1 мин, далее трижды промывали стерильным физиологическим раствором с последующим измельчением (Zhang et al., 2008; Hu et al., 2015). Для определения химического состава ЖМО отбирали по почвенным генетическим горизонтам методом мокрого просеивания, с дальнейшим отделением ЖМО от примесей (осколки минералов, органические остатки) в лабораторных условиях (Timofeeva et al., 2021; Пуртова, Тимофеева, 2021). Очистка поверхности ЖМО от частиц почвенного мелкозема проводилась при помощи 20 мин. погружения в ультразвуковую ванну в спиртовой раствор (50%) согласно рекомендациям Etlger et al. (2017). При исследовании распределения элементов внутри ЖМО отдельные образцы ЖМО фиксировали в эпоксидной смоле.

Культивирование. Навески образцов ЖМО и вмещающего ЖМО почвенного мелкозема (10 г) помещали в колбы со 100 мл физиологического раствора, согласно рекомендациям Д. Г. Звягинцева (Звягинцев, 1991). Полученный раствор суспендировали на орбитальном шейкере Shaker S-3. 09M (“ELMI”, Латвия) в течение 30 мин при 110 об./мин (Логинова и соавт., 2011); 0.1 мл полученных суспензий вносили на поверхность плотных питательных сред в чашки Петри (Звягинцев, 1991). Продолжительность культивирования составляла 14 сут при температуре 20–22°C (Федорюк, Няникова, 2015). В работе использовали специальную плотную питательную среду следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 0.5, $NaNO_3$ – 0.5, K_2HPO_4 – 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5, лимонная кислота – 10, сахароза – 2, триптон – 1, агар-агар – 20; pH 6.8; в которую вносили $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в количестве 5.9 г/л и $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 4.7 г/л для культивирования FeOM и MnOM соответственно (Захарова, Парфенова, 2007).

Геномная ДНК чистых культур бактерий, выращенных на специальной питательной агаризованной среде для культивирования Fe- и Mn-окисляющих бактерий, была выделена с помощью набора реагентов НК-сорбент “Base” (“Литех”) в соответствии с инструкцией производителя.

Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК использовали набор реагентов Био-Мастер HS-Taq ПЦР (2×) (“Biolabmix”, Россия) согласно протоколу с добавлением универсальных бактериальных праймеров 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' и 1350R5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3' (Lane et al., 1985). Амплификацию проводили на My Cycler (“BioRad”, США) при 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) (Lane et al., 1985).

ПЦР-продукты разделяли в агарозном геле (1%) с добавлением этидиум бромид в электрофорезной камере при напряженности поля около 2 В/см, результаты учитывали на трансиллюминаторе Квант 312 (“Хеликон”, Россия) под ультрафиолетовым излучением.

Очистка полученных ампликонов была проведена с помощью набора для ферментативной очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT Express (“Thermo FS”, США) согласно протоколу. Очищенные ПЦР-продукты секвенировали по методу Сенгера, используя набор реагентов Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) для подготовки нуклеотидных последовательностей к прочтению на генетическом анализаторе Нанофор-05 (“Синтол”, Россия).

Филогенетический анализ проводили 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 MEGA 11, для выравнивания последовательностей использовали алгоритм программы CLUSTAL W (<http://www.genebee.msu.su/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.

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК отдельных штаммов бактерий внесены в базу данных GenBank под номерами OR039558–OR039569.

Содержание оксидов Fe и Mn в образцах ЖМО и вмещающих почв определяли методом энергодисперсионной рентгенфлуоресцентной спектроскопии на анализаторе EDX 800HS-P (“Shimadzu”, Япония) с использованием 8-ми государственных стандартных образцов сравнения согласно М-02-0604-2007 (Методика выполнения измерений..., 2007). Описание параметров измерения, формата и рабочей среды при проведении анализа

приведены в работе Пуртовой, Тимофеевой (Пуртова, Тимофеева, 2021). Проверка достоверности измерений осуществлялась путем анализа 1 стандартного образца через 10 неизвестных (опытных) образцов. Максимальный уровень отклонения содержания оксидов макроэлементов от сертифицированных значений стандартного образца в опытных образцах составлял не более 0.9%.

Электронная микроскопия. Изображения структур бактериальной и минеральной природы и карты распределения элементов внутри ЖМО получали с помощью электронного сканирующего микроскопа MERLIN (“Carl Zeiss”, Германия), оснащенного энергодисперсионным спектрометром INCA Energy 350 X–Max 150 (“Oxford Instruments”, Abingdon, Великобритания).

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

Таксономическая характеристика штаммов выделенных бактерий проведена на основе анализа структуры гена 16S рРНК по методу Сэнгера на базе лаборатории морской микробиологии Института Мирового океана ДВФУ.

Математическая обработка полученных данных включала расчет медианных значений, среднеквадратического отклонения, коэффициента накопления элементов в ортштейнах (Gasparatos, 2012), корреляционный анализ и проводилась с применением программ Statistica и Microsoft Excel 2007. Уровень значимости полученных результатов (P) не превышал 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Профильное распределение Fe- и Mn-окисляющих микроорганизмов в почвенном мелкоземе. Исследованные почвы имеют ярко выраженную дифференциацию по численности и составу изученных микроорганизмов (рис. 1).

Полученные результаты указывают на численное преобладание MnОМ над FeОМ в двух верхних горизонтах почв. В нижележащих горизонтах культивируемых MnОМ обнаружить не удалось, что, вероятно, связано с изменением условий аэрации почв в средней и нижней частях профиля. Также с глубиной залегания почвенного горизонта снижается видовое разнообразие микроорганизмов (Fierer et al., 2003). FeОМ были культивированы из верхнего (AY) и срединного (BELnn) горизонтов исследованных почв. Максимальное содержание FeОМ обнаружено в срединном горизонте, что указывает на большую устойчивость данных микроорганизмов к изменению водно-воздушного режима.

Несмотря на принадлежность части изученных микроорганизмов к группе MnОМ,

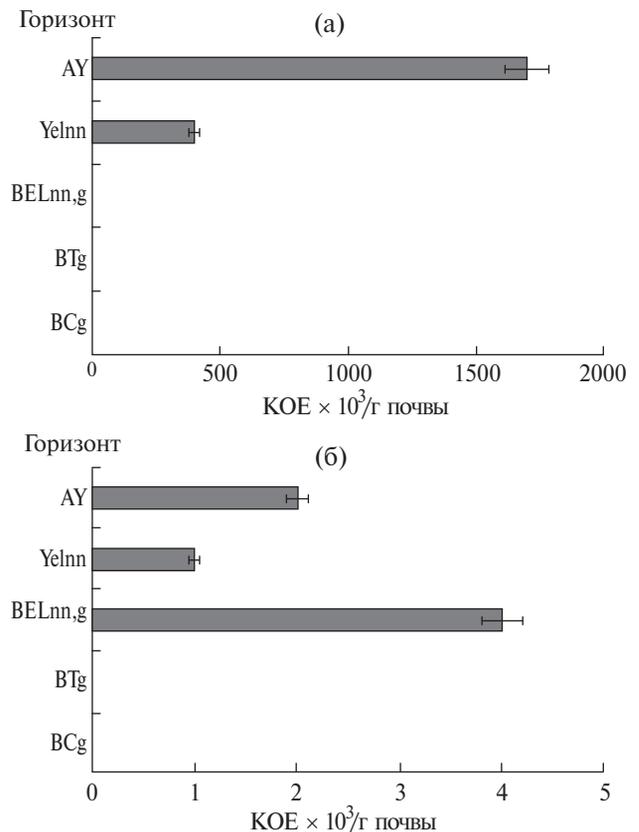


Рис. 1. Численность Mn-окисляющих (а) и Fe-окисляющих (б) микроорганизмов в почвенном мелкоземе.

предполагающую непосредственное участие ионов Mn в процессах метаболизма, взаимосвязь между содержанием Mn в почвенном мелкоземе и численностью MnОМ была обратно пропорциональной ($r = -0.99$) (табл. 1).

Вероятно, это связано с нахождением большего объема Mn в почвенном мелкоземе в составе комплексных соединений, в которых преобладают восстановленные (преимущественно четырехвалентные) формы Mn (Мартынова, 2012). В исследованных почвах наибольшее влияние на размножение MnОМ и развитие их биомассы оказывало содержание в почвах оксидов Fe ($r = 0.99$). Это обусловлено содержанием ионов Fe во многих ферментах, участвующих в фундаментальных физиологических процессах (дыхание, центральный метаболизм, восстановление ДНК) (Andreini et al., 2008; Frawley, Fang, 2014). Из почвенного мелкозема изолированы Mn-окисляющие бактерии, относящиеся к родам *Priestia* и *Methylobacterium* (рис. 2).

Данные бактерии выделяются из почв повсеместно (Лысак, 2007). Результаты ряда работ указывают на непосредственное участие бактерий рода *Priestia* и *Methylobacterium* в процессах трансформации Fe и Mn в почвах (Аристовская, 1975; Пиневиц, 2005; Hu et al., 2015; Gupta et al., 2020; Lyu et al., 2021).

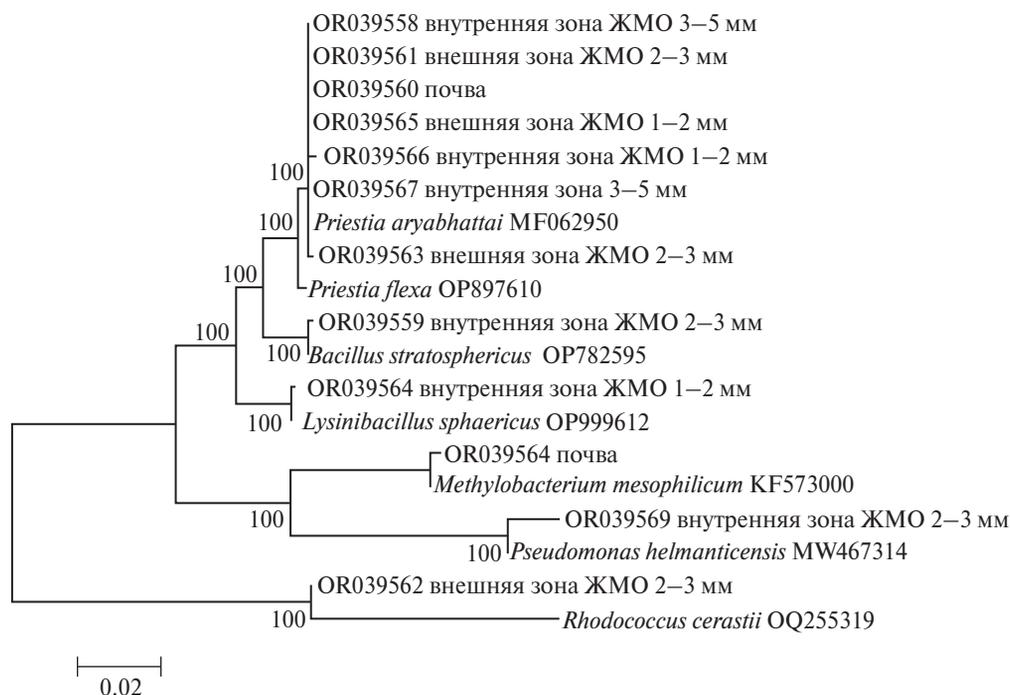


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий, изолированных из почвенного мелкозема и ортштейнов. Дендрограмма построена на основе алгоритма метода объединения ближайших соседей (NJ). Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Представлены значения бутструп поддержки выше 50%.

Таблица 1. Содержание и накопление Fe и Mn в почвах и ортштейнах, медианное значение \pm значение среднеквадратического отклонения

Горизонт	Объект	MnO		Fe ₂ O ₃	
		Содержание оксидов, мг/кг	Коэффициент накопления	Содержание оксидов, мг/кг	Коэффициент накопления
AY	Почва	0.08 \pm 0.004		3.82 \pm 0.150	
	Ортштейн	0.78 \pm 0.030	9.75	24.07 \pm 0.880	6.30
Yelnn	Почва	0.11 \pm 0.005		3.63 \pm 0.140	
	Ортштейн	0.69 \pm 0.026	6.27	23.46 \pm 0.870	6.46
BELnn, g	Почва	0.05 \pm 0.002		3.50 \pm 0.160	
	Ортштейн	0.90 \pm 0.040	18.00	22.71 \pm 0.900	6.48
BTg	Почва	0.06 \pm 0.001		7.81 \pm 0.340	
	Ортштейн	1.42 \pm 0.049	23.67	18.23 \pm 0.740	2.33
BCg	Почва	0.08 \pm 0.003		6.51 \pm 0.270	
	Ортштейн	4.59 \pm 0.155	57.37	10.80 \pm 0.360	1.66

Fe- и Mn-окисляющие микроорганизмы в ортштейнах. Подавляющий объем численности микроорганизмов в ЖМО представлен MnOM (табл. 2).

В отличие от почвенного мелкозема, MnOM идентифицированы в ЖМО, сформированных не только в верхней, но и в нижней части профиля (до глубины 140 см). Отсутствие культивируемых форм MnOM во вмещающем почвенном мелкоземе и их наличие в ЖМО в одних и тех же горизонтах

позволяет предположить проявление кратковременных окислительно-восстановительных периодов, в которые MnOM попадают в нижележащие горизонты (преимущественно с гравитационным током почвенного раствора) и образуют микрозоны. Такие микрозоны могут являться первичным ядром для образования ЖМО. В отдельных исследованиях подобные образования идентифицируют как “прото-конкреции” (Dabard, Loi, 2012).

Таблица 2. Содержание Mn- и Fe-окисляющих микроорганизмов в ортштейнах разного размера (КОЕ × 10³/г ортштейнов), медианное значение ± значение среднеквадратического отклонения

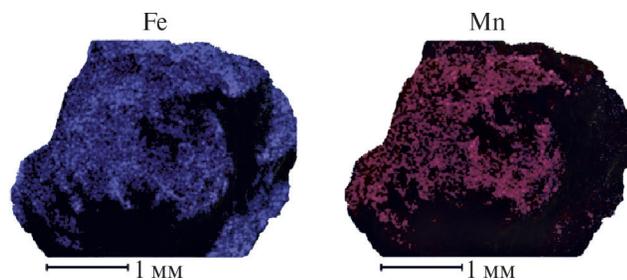
Горизонт	Размерная фракция ортштейнов	MnOM		FeOM	
		Внешняя зона	Внутренняя зона	Внешняя зона	Внутренняя зона
AY	1–2 мм	20.0 ± 1.0	38.4 ± 1.9	4.0 ± 0.2	–
	2–3 мм	40.0 ± 2.0	11.2 ± 0.5	–	–
	3–5 мм	170.0 ± 8.5	24.0 ± 1.2	–	–
Yelnn	1–2 мм	3.0 ± 0.1	22.4 ± 1.12	5.0 ± 0.2	–
	2–3 мм	20.0 ± 1.0	9.6 ± 0.4	–	–
	3–5 мм	10.0 ± 0.5	2.1 ± 0.1	–	–
BELnn, g	1–2 мм	110.0 ± 5.5	–	–	–
	2–3 мм	1330.0 ± 66.5	9.0 ± 0.4	–	–
	3–5 мм	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	–	–
BTg	1–2 мм	–	11.3 ± 0.6	–	–
	2–3 мм	–	–	–	–
	3–5 мм	–	–	–	–
BCg	1–2 мм	–	–	–	–
	2–3 мм	650.0 ± 32.5	1.3 ± 0.1	–	–
	3–5 мм	20.0 ± 1.0	26.4 ± 1.3	–	–

Широко исследованная способность отдельных групп почвенных микроорганизмов к окислению Mn(II) и осаждению (гидр)оксидов Mn на поверхности клеток способствует образованию микросферических агрегатов, что в последующем, возможно, приводит к формированию ЖМО. Данное предположение может подтверждаться спецификой распределения Fe и Mn внутри ЖМО. В изученных образцах ЖМО всех размеров четко идентифицировано ядро (внутренняя зона ортштейнов), обогащенное ионами Mn (рис. 3).

Также наличие MnOM в ЖМО при их отсутствии в почвенном мелкоземе подтверждает обособленность ЖМО как закрытой системы, характеризующейся отличными от вмещающих горизонтов показателями pH (более кислая реакция среды), Eh (ниже величины вмещающей почвенной массы), C_{общ} (накопление в ЖМО) (Костенков, 1986; Пуртова, Тимофеева, 2021). Вероятно, при сезонной смене окислительно-восстановительного режима микроорганизмы, находящиеся в почвенном мелкоземе средней и нижней частях профиля, отмирают или могут быть представлены некультивируемыми формами. При этом в ЖМО сохраняется среда, обеспечивающая жизнеспособное состояние MnOM, что дополнительно

подтверждается наличием культивируемых форм MnOM не только во внешней, но и во внутренней зонах ортштейнов (табл. 2).

Непосредственное участие FeOM в процессе образования ЖМО освещено в ряде работ (Аристовская, 1975; Пиневиц, 2005; Водяницкий, 2010). При проведении настоящих исследований FeOM удалось культивировать только из внешней зоны ЖМО размером 1–2 мм, сформированных в двух верхних горизонтах исследованных почв (AY, Yelnn). Полученные данные указывают на наличие жизнеспособных форм микроорганизмов данной группы только в зоне контакта ЖМО с вмещающим мелкоземом почв. Учитывая размер ЖМО, можно предположить, что FeOM в исследованных почвах принимают участие лишь на начальных стадиях формирования ЖМО, когда в новообразованиях еще присутствуют доступные для их роста и развития соединения Fe. Такими соединениями, как правило, являются аморфные и слабоокристаллизованные Fe-обогащенные компоненты ортштейнов. Данное предположение подтверждается результатами ряда работ (Liu et al., 2021; Sipos et al., 2022) о преобладании аморфных и слабоокристаллизованных соединений Fe в ЖМО мелких размерных фракций. В ЖМО крупного размера идентифицированы, преимущественно, окристаллизованные минералы Fe, которые содержат ионы Fe в недоступной для FeOM форме (Пиневиц, 2005; Timofeeva et al., 2014; Sipos et al., 2022). Однако результаты проведенных ранее исследований ЖМО разного размера в почвах исследуемого региона указывают на наличие окристаллизованных форм Fe и в ЖМО размером 1–2 мм (Timofeeva et al., 2014). Вероятно, одним из условий возможности культивирования FeOM из ЖМО размерной фракции 1–2 мм является их локализация в верхней части профиля. Результаты специализированных

**Рис. 3.** Карты распределения элементов в ортштейнах.

исследований демонстрируют замедление скорости кристаллизации соединений Fe в ЖМО и вмещающей почвенной массе в горизонтах, обогащенных органическим веществом (Fischel et al., 2023).

Из исследованных ЖМО различных размеров фракций идентифицированы бактерии, относящиеся к родам *Bacillus*, *Priestia*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*. Для большинства идентифицированных родов бактерий характерно участие в процессах трансформации соединений Fe и Mn в разных средах, в том числе в почвах. (Аристовская, 1975; Пиневиц, 2005; Cappelletti et al., 2020). Следует отметить, что результаты исследований, отражающих участие бактерий рода *Lysinibacillus* в процессах окисления и/или осаждения Fe и Mn в почвах, в данный момент недостаточно, чтобы однозначно утверждать о значимом влиянии таких бактерий на указанные процессы. Бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas* ранее были выделены из конкреций почв различных регионов мира (Li-Mei et al., 2008; Hu et al., 2015; Lysak et al., 2019; Lyu et al., 2021). Бактерии, относящиеся к родам *Rhodococcus* и *Lysinibacillus*, насколько нам известно, ранее не были идентифицированы в почвенных ЖМО.

Таксономическое положение Fe- и Mn-окисляющих бактерий, изолированных из почвенного мелкозема и ортштейнов. При изучении таксономического положения выделенных из почв и ЖМО бактерий выявлено, что все штаммы относятся к трем филумам: *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* и *Bacillota* (рис. 2). Штаммы OR039558, OR039558, OR039561, OR039565, OR039566, OR039567 имели высокую степень родства (99.51, 98.23, 100, 99.77, 99.47 и 99.47% соответственно) с гомологом MF062950 *Priestia aryabhatai*, полученным с корней томатов (Китай). Штамм OR039563 был гомологичен бактерии вида *Priestia flexa* (99.62%). Представители рода *Priestia* способны осаждать и накапливать металлы на поверхности и внутри клеток (Ghosh et al., 2018; Shahid et al., 2022). В ЖМО исследуемых почв роль полученных изолятов может быть схожей. У штамма OR039559 отмечена высокая степень гомологии со штаммом *Bacillus stratosphericus* (OP782595). Бактерии этого рода способны аккумулировать металлы, в том числе Mn^{2+} , из различного субстрата без изменений скорости роста (Li et al., 2023). Штамм OR039562 имел высокий процент сходства (99.88%) с *Rhodococcus cerastii* (OQ255319). Известно, что в составе рода *Rhodococcus* есть виды, способные окислять Mn, продуцируя Mn-зависимые пероксидазы DyP-типа (Singh et al., 2013; Jofre et al., 2021). Также у некоторых *Rhodococcus* spp. активность гидроксилазы зависит от Mn, и бактерии специально используют гетерометаллический кофактор Mn/Fe для осуществления каталитической функционализации неактивированной первичной связи углерода (Powell et al., 2023). Вероятно, выделенный нами

штамм также может трансформировать Mn, окисляя и осаждая его.

Нуклеотидная последовательность штамма OR039564 имела 100% гомологию со штаммом из базы данных NCBI *Lysinibacillus sphaericus* (OP999612). Этот вид достаточно широко распространен в объектах окружающей среды и был выделен из различных сред и обогащенных металлами почв. В литературе отмечена способность *Lysinibacillus* spp. ограничивать подвижность тяжелых металлов в почвах за счет наличия на поверхности клетки белкового S-слоя (Suhr et al., 2016). Активная трансформация тяжелых металлов и снижение их токсичного воздействия на живые организмы установлены при совместном нахождении в почвенной среде *Lysinibacillus sphaericus*, *Bacillus* sp. и *Rhodococcus* sp. (Emenike et al., 2016). Штамм OR039568 гомологичен (99.85%) виду *Methylobacterium mesophilicum* (KF573000). Результаты ряда исследований указывают на способность *Methylobacterium* spp. восстанавливать Fe(III) и окислять Fe(II) (Hu et al., 2013; Ainiwaer et al., 2022). В работе Доурато и соавт. (Dourado et al., 2015) описаны гены у некоторых *Methylobacterium* spp., которые обеспечивают толерантность к накоплению металлов. Штамм OR039569 имеет 99.74% сходство с гомологом *Pseudomonas helmanticensis* (OP800175). Способность представителей рода *Pseudomonas* к окислению Mn и Fe широко освещена в литературе (Керкау et al., 2016; Li et al., 2023). В результате реакции окисления электроны проходят через терминальные оксидазы цитохрома *c* для восстановления кислорода и получения энергии для роста бактерий (Ciancio et al., 2022). Также у некоторых видов данного рода описаны два вида оксидазы Cu, которые участвуют в окислении Mn(II) и Mn(III) (Lyu et al., 2021).

Структуры бактериальной природы в ортштейнах. Во внешней и внутренней зонах исследованных ЖМО были обнаружены структуры правильной шарообразной формы, предположительно, бактериальной природы (рис. 4а, 4б).

Структуры встречались как в виде единичных сферул, так и в виде локализаций небольших групп. Размер данных структур (от 1.5 до 2.5 мкм) и преобладание углерода в элементном составе дополнительно указывают на возможность их отнесения к микроскопическим организмам. В ЖМО встречались шарообразные структуры, состоящие преимущественно из углерода, и структуры, покрытые соединениями Fe и Mn. Наибольшая плотность покрытия структур Fe и Mn отмечается в зоне контакта с веществом ЖМО, что указывает на осаждение основных ортштейнообразующих элементов на поверхности таких структур (рис. 4в). На основании результатов секвенирования и морфологического строения идентифицированных бактерий, вероятнее всего, обнаруженные сферулы являются

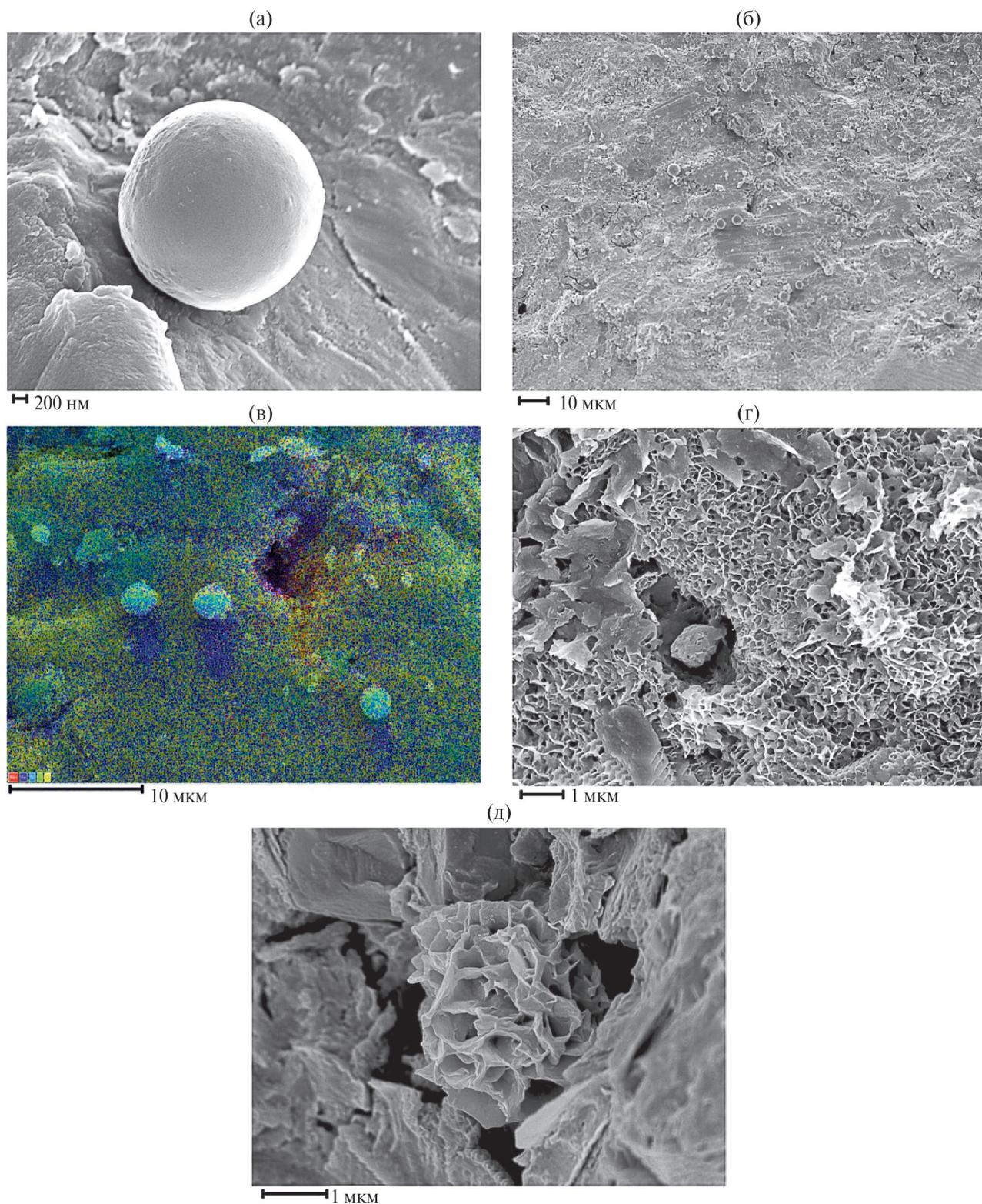


Рис. 4. Структуры в ортштейнах: а — сферула во внутренней зоне ортштейнов; б — группа сферул на поверхности ортштейна; в — элементный состав сферул; г — гликокаликс; д — “nanoflowers” (наноцветы).

представителями бактерий рода *Rhodococcus*. Также в ЖМО обнаружены скопления губчатых структур, схожие по морфологии с гликокаликсом бактерий и состоящие преимущественно из Fe, Mn и C (рис. 4г). Структуры с подобным строением были отмечены в Fe-Mn конкрециях океанов (Астафьева и соавт., 2021).

Участие Fe- и Mn-окисляющих микроорганизмов в формировании и развитии ортштейнов. Исходя из представленных в научной литературе теорий образований ЖМО, их формирование и развитие в почвах сопровождается увеличением размера (Gasparatos et al., 2019). Изучение количественного распределения MnOM и FeOM в ЖМО разного размера позволяет отразить специфику участия целевых групп микроорганизмов на различных стадиях формирования ЖМО в разных горизонтах почвенного профиля (табл. 2). Отличительной особенностью ЖМО размерной фракции 1–2 мм является наличие культивируемых форм FeOM, что, как было отмечено ранее, указывает на нахождение Fe-содержащих соединений в ЖМО данной размерной фракции в подходящей для функционирования FeOM форме. Исследование количества и распределения MnOM внутри ЖМО размера 1–2 мм, сформированных в различных горизонтах профиля, указывает на преимущественную локализацию MnOM во внутренней зоне ЖМО, сформированных в двух верхних горизонтах профиля (AY, Yelnn) и в текстурном горизонте VTg. ЖМО данной размерной фракции, сформированные в горизонте BELnn, g, характеризуются присутствием MnOM только во внешней зоне. Из ЖМО этого горизонта выделено максимальное количество MnOM, характерное для размерной фракции 1–2 мм. Исходя из морфологических особенностей данного горизонта, можно предположить, что в горизонте BELnn, g происходит более быстрая и, соответственно, более контрастная смена окислительно-восстановительного режима, и процессы дегидратации и кристаллизации Mn-содержащих соединений внутри ЖМО идут более активно. Вероятно, локализация MnOM во внешней зоне ЖМО связана с присутствием доступных для микроорганизмов форм Mn только в объеме свежесаженных на поверхности ЖМО соединений. Данное предположение отчасти подтверждается особенностями распределения MnOM в ЖМО более крупных размерных фракций.

В ЖМО размеров 2–3 и 3–5 мм MnOM были выделены и из внешней, и из внутренней зон. Характерной особенностью ЖМО размера 2–3 мм является резкое увеличение количества MnOM во внешней зоне (от 2.1 до 500 раз). Также ЖМО данной размерной фракции отличаются наибольшим содержанием культивируемых MnOM среди всех изученных размерных фракций. Прежде всего, это связано с фактом активизации накопления Mn по мере роста ЖМО, что было подтверждено

проведенными ранее исследованиями (Тимофеева, 2008). Полученные результаты указывают на непосредственное участие MnOM в процессах трансформации Mn-содержащих соединений в ЖМО размера 2–3 мм, где основной объем Mn, осажденный на поверхности ортштейнов, представлен не окристаллизованными, соответственно, доступными для MnOM соединениями. В целом, в ЖМО размера 2–3 мм максимальное количество MnOM установлено в новообразованиях, сформированных в средней и нижней частях почвенного профиля (горизонты BELnn, g, BCg).

Внешняя зона ЖМО размерной фракции 3–5 мм, сформированных в верхней части почвенного профиля, также характеризуется повышенным содержанием культивируемых MnOM по сравнению с внутренней зоной. С продвижением вглубь почвенного профиля содержание MnOM во внешней и внутренней зонах ЖМО выравнивается. Наибольшее количество MnOM было выделено из ЖМО верхнего горизонта AY. В нижележащих горизонтах отмечено резкое снижение количества MnOM. В ЖМО горизонта BCg наблюдалось незначительное увеличение количества MnOM. В ЖМО данной размерной фракции процессы перевода Mn-содержащих соединений в окристаллизованные формы идут более интенсивно за счет активизации дегидратации аморфных соединений, обогащенных Mn, вероятно, с участием MnOM (Timofeeva et al., 2014). Подтверждением усиления минерализации и окристаллизации Mn-обогащенных соединений в ЖМО данного размера является наличие пластинчатых кристаллов, которые не были обнаружены в ортштейнах более мелкого размера (рис. 4д). Подобные розетки кристаллов внутри ортштейнов в литературе именуются как “nanoflowers” (наноцветы) и представляют собой минералы группы Mn (литиюфорит или бернесит) (Fischel et al., 2023). Доступные для MnOM соединения Mn в ЖМО размерной фракции 3–5 мм представлены в основном (гидр)оксидными соединениями, покрывающими кристаллы минералов (Timofeeva et al., 2014; Fischel et al., 2023).

Следует отметить отсутствие культивируемых форм исследуемых микроорганизмов в ЖМО размерных фракций 2–3 и 3–5 мм, формирующихся в текстурном горизонте VTg. Вероятно, это связано как с различным проявлением интенсивности микробиологических процессов в отдельных горизонтах почвенного профиля, так и с отмеченной в литературных источниках способностью ЖМО текстурных горизонтов активизировать накопление ряда тяжелых металлов до концентраций, ингибирующих рост и развитие микроорганизмов (Тимофеева, 2008; Холопов, 2013).

Анализ взаимосвязи между численностью культивируемых форм MnOM и содержанием MnO и Fe₂O₃ в ЖМО не подтвердил наличия

выраженной зависимости между этими переменными ($r_{\text{MnOM-Mn}}$ от -0.56 до 0.20 , $r_{\text{MnOM-Fe}}$ от -0.15 до 0.26). По аналогии с почвенным мелкоземом, отсутствие взаимосвязи может быть вызвано преимущественным нахождением ионов Mn и Fe в составе труднодоступных для МОМ соединений. Исключением из общей закономерности является средний уровень корреляционной зависимости ($r = 0.64$) между численностью MnOM и содержанием валовых форм Fe в ЖМО размерной фракции 1–2 мм, что является дополнительным подтверждением преобладания аморфных и слабокристаллизованных соединений Fe в ортштейнах на начальных стадиях их формирования.

Несмотря на отсутствие взаимосвязи между численностью MnOM и валовым содержанием Mn, на основе расчета корреляционной зависимости между изменением численности MnOM и интенсивностью накопления Mn ортштейнами, отмечено ярко выраженное влияние MnOM на накопление Mn в ЖМО размерных фракций 1–2 ($r = 0.99$) и 2–3 мм ($r = 0.96$), сформированных в верхней и средней частях профиля исследованных почв. В ЖМО более крупного размера коэффициент корреляции между численностью MnOM и уровнем накопления Mn был отрицательным ($r = -0.25$), что указывает на отсутствие влияния MnOM на процессы, формирующие накопительную способность ЖМО данного размера.

Таким образом, в работе отражено участие культивируемых форм MnOM и FeOM на разных стадиях формирования и развития ЖМО, формирующихся в профиле дерново-буро-подзолистых глееватых почв. Выявлены рода бактерии, определяющие образование ЖМО, и процессы, происходящие в ЖМО почв, не испытывающих влияния прямого техногенного воздействия.

Вмещающий ортштейны почвенный мелкозем характеризуется изменением целевых групп микроорганизмов по профилю. По численности изученных групп микроорганизмов в верхней части профиля отмечается преобладание MnOM над FeOM, с продвижением вглубь почвенного профиля происходит обратная смена доминантных групп. Параметром, оказывающим наибольшее влияние на численность MnOM, является содержание в почвах оксидов Fe. В почвенном мелкоземе бактерии, относящиеся к группе MnOM, представлены родами *Priestia* и *Methylobacterium*.

Основной объем микроорганизмов, культивируемых из почвенных ЖМО (внешняя и внутренняя зоны), представлен группой MnOM. В совокупности с особенностями распределения Mn в ЖМО полученные результаты позволяют предположить, что первичным звеном образования ЖМО в исследованных почвах могут являться скопления MnOM. Культивируемые FeOM были выделены только из внешней зоны мелких ЖМО, сформированных

в верхней части почвенного профиля, подтверждая участие FeOM лишь на начальных этапах формирования ЖМО.

В ЖМО идентифицированы бактерии, относящиеся к родам *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Priestia*. Таксономический состав бактерий, за исключением рода *Priestia*, был ортштейно-специфичным. Структуры бактериальной природы в ЖМО представлены единичными сферами и их небольшими группами. На поверхности сферул отмечено осаждение Fe и Mn. Также в ЖМО обнаружены губчатые структуры, схожие по морфологии с гликокаликсом бактерий.

Изучение количественного распределения MnOM и FeOM во внешней и внутренней зонах ЖМО разного размера указывает на участие MnOM на всех этапах их формирования и развития. Особенности количественного распределения MnOM в разных зонах ЖМО обоснованы наличием доступных для микроорганизмов форм Mn (свежеосажденные аморфные соединения). Наибольшее содержание культивируемых MnOM обнаружено в ЖМО размерной фракции 2–3 мм. Анализ взаимосвязи между численностью MnOM и интенсивностью накопления Mn позволил отразить активное участие данной группы микроорганизмов в процессах аккумуляции Mn в ЖМО размерных фракций 1–2 и 2–3 мм. Несмотря на присутствие большого количества культивируемых форм MnOM в ЖМО более крупного размера (3–5 мм), MnOM не оказывали влияния на накопление Mn.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта № 23-24-00255, <https://rscf.ru/project/23-24-00255/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аристовская Т. В. Роль микроорганизмов в мобилизации и закреплении железа в почвах // Почвоведение. 1975. № 4. С. 290–295.
- Астафьева М. М., Жегалло Е. А., Ривкина Е. М., Самылина О. С., Розанов А. Ю., Зайцева Л. В., Авдонин В. В., Карпов Г. А., Сергеева Н. Е. Бактериальная палеонтология. М.: Российская академия наук, 2021. 124 с.

- Водяницкий Ю. Н. Гидроксиды железа в почвах // Почвоведение. 2010. № 11. С. 1341–1352.
- Vodyanitskii Y. N. Iron hydroxides in soils: a review of publications // Euras. Soil Sci. 2010. V. 43. P. 1244–1254. <https://doi.org/10.1134/S1064229310110074>
- Зайдельман Ф. Р., Никифорова А. С. Генезис и диагностическое значение новообразований почв лесной и лесостепной зон. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 2001. 216 с.
- Захарова, Ю.Р., Парфенова В. В. Метод культивирования микроорганизмов, окисляющих железо и марганец в донных отложениях озера Байкал // Известия РАН. Сер. биол. 2007. № 3. С. 290–295.
- Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ, 1991. 304 с.
- Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
- Костенков Н. М. Окислительно-восстановительные режимы в почвах периодического переувлажнения (Дальний Восток). М.: Наука, 1986.
- Логинова О. О., Данг Т. Т., Белоусова Е. В., Грабович М. Ю. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 2. С. 127–133.
- Лысак В. В. Микробиология. Минск: БГУ, 2007. 426 с.
- Лысак Л. В., Кадулин М. С., Конова И. А., Лапыгина Е. В., Иванов А. В., Звягинцев Д. Г. Численность, жизнеспособность и таксономический состав наноформ бактерий в железо-марганцевых конкрециях // Почвоведение. 2013. № 6. С. 707–714.
- Lysak L. V., Kadulin M. S., Konova I. A., Lapygina E. V., Ivanov A. V., Zvyagintsev D. G. Population number, viability, and taxonomic composition of the bacterial nanoforms in iron-manganic concretions // Euras. Soil Sci. 2013. V. 46. P. 668–675. <https://doi.org/10.1134/S1064229313060069>
- М-02-0604-2007. Методика выполнения измерений массовой доли кремния, кальция, титана, ванадия, хрома, бария, марганца, железа, никеля, меди, цинка, мышьяка, стронция, свинца, циркония, молибдена, в порошковых пробах почв и донных отложений рентгеноспектральным методом с применением энергодисперсионных рентгенофлуоресцентных спектрометров типа EDX фирмы “Shimadzu”. СПб., 2007. 17 с.
- Мартынова М. В. Формы нахождения марганца, их содержание и трансформация в пресноводных отложениях // Экологическая химия. 2012. Т. 21. С. 38–52.
- Пиневич А. В. Микробиология железа и марганца. СПб.: СПбГУ, 2005. 374 с.
- Пуртова Л. Н., Тимофеева Я. О. Изучение некоторых свойств и активности каталазы агротемногумусовых подбелов при различных видах агротехнического воздействия // Почвоведение. 2022. № 10. С. 1277–1289.
- Purtova L. N., Timofeeva Ya. O. Study of some properties and catalase activity in albic stagnosols under different agrogenic impacts // Euras. Soil Sci. 2022. V. 55. P. 1436–1445. <https://doi.org/10.1134/S1064229322100131>
- Пуртова Л. Н., Тимофеева Я. О. Характеристика мелкозема и ортштейнов агрогенных почв южной части Приморского края: физико-химические, оптические свойства, каталазная и каталитическая активность // Почвоведение. 2021. № 12. С. 1481–1491.
- Purtova L. N., Timofeeva Y. O. Fine earth and nodules in agrogenic soils from the south of Primorskii region: physicochemical and optical properties, catalase and catalytic activity // Euras. Soil Sci. 2021. V. 54. P. 1855–1863. <https://doi.org/10.1134/S1064229321120097>
- Росликова В. И. Марганцево-железистые новообразования в почвах равнинных ландшафтов гумидной зоны. Владивосток: Дальнаука, 1996. 291 с.
- Тимофеева Я. О. Накопление и фракционирование микроэлементов в почвенных железо-марганцевых конкрециях различного размера // Геохимия. 2008. № 3. С. 293–301.
- Timofeeva Y. O. Accumulation and fractionation of trace elements in soil ferromanganese nodules of different size // Geochem. Int. 2008. V. 46. P. 260–267. <https://doi.org/10.1134/S0016702908030038>
- Тимофеева Я. О., Голов В. И. Аккумуляция микроэлементов в ортштейнах почв // Почвоведение. 2010. № 4. С. 434–444.
- Timofeeva Y. O., Golov V. I. Accumulation of microelements in iron nodules in concretions in soils: a review // Euras. Soil Sci. 2010. V. 43. P. 401–407. <https://doi.org/10.1134/S1064229310040058>
- Федорюк Е. Д., Няникова Г. Г. Выделение культур железо- и марганец-окисляющих микроорганизмов // Наука и образование в современной конкурентной среде. 2015. № 1. С. 3–8.
- Холопов Ю. А. Изучение реакции микроорганизмов почв лесных ценозов на внесение солей свинца и кадмия в условиях модельного опыта // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15. С. 260–267.
- Щапова Л. Н. Микрофлора почв юга Дальнего востока России. Владивосток: ДВО РАН, 1994. 186 с.
- Ainiwaer A., Liang Y., Ye X., Gao R. Characterization of a novel Fe²⁺ activated non-blue laccase from *Methylobacterium extorquens* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. Art. 9804. <https://doi.org/10.3390/ijms23179804>
- 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 // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G. L., Thornton J. M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles // J. Biol. Inorg. Chem. 2008. V. 13. P. 1205–1218. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0404-5>
- Cappelletti M., Presentato A., Piacenza E., Firrincieli A., Turner R. J., Zannoni D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 8567–8594. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10861-z>
- Ciancio C. L., Piazza A., Masotti F., Garavaglia B. S., Ottado J., Gottig N. Manganese oxidation counteracts the deleterious effect of low temperatures on biofilm formation

- in *Pseudomonas* sp. MOB-449 // Front. Mol. Biosci. 2022. V. 9. Art. 1015582. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1015582>.
- Cornu S., Deschatrettes V., Salvador-Blanes S., Clozul B., Hardy M., Branchut S., Forestier L. L. Trace element accumulation in Mn-Fe-oxide nodules of a planasolic horizon // Geoderma. 2005. V. 125. P. 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.06.009>
- Cotroneo S., Schiffbauer J. D., McCoy V.E., Wortmann U. G., Darroch S. A., Peng Y., Laflamme M. A new model of the formation of Pennsylvanian iron carbonate concretions hosting exceptional soft-bodied fossils in Mazon Creek, Illinois // Geobiology. 2016. V. 14. P. 543–555. <https://doi.org/10.1111/gbi.12197>
- Dabard M. P., Loi A. Environmental control on concretion-forming processes: examples from Paleozoic terrigenous sediments of the North Gondwana margin, Armorican Massif (Middle Ordovician and Middle Devonian) and SW Sardinia (Late Ordovician) // Sediment. Geol. 2012. V. 267–268. P. 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2012.05.013>
- Dourado M. N., Camargo Neves A. A., Santos D. S., Araújo W. L. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. // BioMed Res. Int. 2015. Art. 909016. <https://doi.org/10.1155/2015/909016>.
- Emenike C. U., Agamuthu P., Fauziah S. H. Blending *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. for optimal reduction of heavy metals in leachate contaminated soil // Environ. Earth Sci. 2016. V. 75. Art. 26. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4805-9>
- Ettler V., Chren M., Mihaljevič M., Drahotka P., Kříbek B., Veselovský F., Sracek O., Vaněk A., Penížek V., Komárek M., Mapani B., Kamona F. Characterization of Fe-Mn concentric nodules from Luvisol irrigated by mine water in a semi-arid agricultural area // Geoderma. 2017. V. 299. P. 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.03.022>
- Fischel M. H.H., Clarke C. E., Sparks D. L. Synchrotron resolved microscale and bulk mineralogy in manganese-rich soils and associated pedogenic concretions // Geoderma. 2023. V. 430. Art. 116305. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.116305>
- Frawley E. R., Fang F. C. The ins and outs of bacterial iron metabolism // Mol. Microbiol. 2014. V. 93. P. 609–616. <https://doi.org/10.1111/mmi.12709>
- Gasparatos D. Fe-Mn concretions and nodules to sequester heavy metals in soils // Environ. Chem. Sust. World. 2012. V. 2. P. 443–474. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2439-6_11
- Gasparatos D., Massas I., Godelitsas A. Fe-Mn concretions and nodules formation in redoximorphic soils and their role on soil phosphorus dynamics: current knowledge and gaps // Catena. 2019. V. 182. Art. 104106. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104106>
- Ghosh P. K., Maiti T. K., Pramanik K., Ghosh S. K., Mitra S., De T. K. The role of arsenic resistant *Bacillus aryabhatai* MCC3374 in promotion of rice seedlings growth and alleviation of arsenic phytotoxicity // Chemosphere. 2018. V. 211. P. 407–419. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.148>
- Gupta R. S., Patel S., Saini N., Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
- Hu C., Zhang Y., Zhang L., Luo W. Effects of microbial iron reduction and oxidation on the immobilization and mobilization of copper in synthesized Fe(III) minerals and Fe-rich soils // J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 24. P. 534–544. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10001>
- Hu M., Li F., Lei J., Fang Y., Tong H., Wu W., Liu C. Pyrosequencing revealed highly microbial phylogenetic diversity in ferromanganese nodules from farmland // Environ. Sci. Process. Impacts. 2015. V. 17. P. 213–224. <https://doi.org/10.1039/c4em00407h>
- Jofré I., Matus F., Mendoza D., Nájera F., Merino C. Manganese-oxidizing Antarctic bacteria (Mn-Oxb) release reactive oxygen species (ROS) as secondary Mn(II) oxidation mechanisms to avoid toxicity // Biology. 2021. V. 10. Art. 1004. <https://doi.org/10.3390/biology10101004>
- Kepkay P. E., Nealson K. H. Growth of a manganese oxidizing *Pseudomonas* sp. in continuous culture // Arch. Microbiol. 1987. V. 148. P. 63–67. <https://doi.org/10.1007/BF00429649>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 35. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 6955–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Li J., Guo Y. K., Zhao Q. X., He J. Z., Zhang Q., Cao H. Y., Liang C. Q. Microbial cell wall sorption and Fe-Mn binding in rhizosphere contribute to the obstruction of cadmium from soil to rice // Front. Microbiol. 2023. V. 14. Art. 1162119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1162119>
- Li-Mei Z., Liu F., Tan W., Feng X., Zhu Y., He J. Microbial DNA extraction and analyses of soil iron–manganese nodules // Soil Biol. Biochem. 2008. V. 40. P. 1364–1369. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.004>
- Liu C., Massey M. S., Latta D. E., Xia Y., Li F., Gao T., Hua J. Fe(II)-induced transformation of iron minerals in soil ferromanganese nodules // Chem. Geol. 2021. V. 559. Art. 119901. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119901>
- Lysak L., Konova I., Lapygina E., Soina V., Chekin M. Filtered forms of prokaryotes and bacteriophages in soil concretions // IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 2019. V. 368. Art. 012030. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/368/1/012030>
- Lyu J., Yu X., Jiang M., Cao W., Saren G., Chang F. The mechanism of microbial-ferromanganese nodule interaction and the contribution of biomineralization to the formation of oceanic ferromanganese nodules // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 1247. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061247>

- Powell M. M., Rao G., Britt R. D., Rittle J. Enzymatic hydroxylation of aliphatic C-H bonds by a Mn/Fe cofactor // *bioRxiv: the preprint server for biology*. 2023. Art. 532131. <https://doi.org/10.1101/2023.03.10.532131>
- Schulz M. S., Vivit D., Schulz Ch., Fitzpatrick J., White A. Biologic origin of iron nodules in a marine terrace chronosequence, Santa Cruz, California // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2010. V. 74. P. 550–564. <https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0144>
- Shahid M., Zeyad M. T., Syed A., Singh U. B., Mohamed A., Bahkali A. H., Elgorban A. M., Pichtel J. Stress-tolerant endophytic isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 modulates physio-biochemical mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) for enhanced salt tolerance // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022. V. 19. Art. 10883. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710883>
- Singh R., Grigg J. C., Qin W., Kadla J. F., Murphy M. E., Eltis, L. D. Improved manganese-oxidizing activity of DypB, a peroxidase from a lignolytic bacterium // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. P. 700–706. <https://doi.org/10.1021/cb300608x>
- Sipos P., Kovacs I., Balazs R., Toth A., Barna G., Mako A. Micro-analytical study of the distribution of iron phases in ferromanganese nodules // *Geoderma*. 2022. V. 405. Art. 115455. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115445>
- Suhr M., Raff J., Pollmann K. Au-interaction of Slp1 polymers and monolayer from *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53 — QCM-D, ICP-MS and AFM as tools for biomolecule-metal studies // *J. Vis. Exp.* 2016. V. 107. Art. e53572. <https://doi.org/10.3791/53572>
- Tan W. F., Liu F., Li Y. H., Hu H. Q., Huang Q. Y. Elemental composition and geochemical characteristics of iron-manganese nodules in main soils of China // *Pedosphere*. 2006. V. 16. P. 72–81. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60028-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60028-3)
- Timofeeva Y. O., Karabtsov A., Ushkova, M., Burdukovskii M., Semal V. Variation of trace element accumulation by iron-manganese nodules from Dystric Cambisols with and without contamination // *J. Soils Sediments*. 2021. V. 21. P. 1064–1078. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02814-w>
- Timofeeva Y. O., Karabtsov A. A., Semal' V.A., Burdukovskii M. L., Bondarchuk N. V. Iron-manganese nodules in udepts: the dependence of the accumulation of trace elements on nodule size // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2014. V. 78. P. 767–778. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.10.0444>
- Zhang L. M., Liu F., Tan W. F., Feng X. H., Zhu Y., He J. Microbial DNA extraction and analyses of soil iron-manganese nodules // *Soil Biol. Biochem.* 2008. V. 40. P. 1364–1369. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.004>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Taxonomic Composition of Cultured Fe-and Mn-oxidizing Bacteria and Microbial Abundance in Fe-Mn Nodules of Different Sizes

Ya. O. Timofeeva¹, E. S. Martynenko^{1, 2, *}, M. L. Sidorenko¹, A. V. Kim^{1, 2}, and V. M. Kazarin¹

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

²Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690922 Russia

*e-mail: martynenko98@inbox.ru

Received October 9, 2023; revised October 18, 2023; accepted October 20, 2023

Abstract—Taxonomic diversity and quantitative distribution of cultured forms of Fe- and Mn-oxidizing microorganisms in Fe-Mn nodules of different sizes and fine earth of Gleyic Luvisols formed in the territory not affected by direct anthropogenic impact, were analyzed. The results were obtained using a combination of microbiological, molecular and analytical methods and noninvasive techniques. Most of the microorganisms which were cultured from the nodules were Mn oxidizers. Bacteria of the genera *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, and *Priestia* were identified in the nodules. Quantitative distribution of Fe- and Mn-oxidizing microorganisms in the outer and inner zones of the nodules of different sizes demonstrated that Mn-oxidizing microorganisms were involved in all stages of nodules formation and development, while Fe-oxidizing microorganisms participated in the initial phase of their formation. Spherules and porous structures of bacterial nature were observed in the studied nodules. The host fine earth was characterized by differences in the relative abundance of the dominant microbial groups in the profile. Manganese-oxidizing bacteria were represented in the soil fine earth by the genera *Prestia* and *Methylobacterium*.

Keywords: Fe-Mn nodules, Mn-oxidizing microorganisms, Fe-oxidizing microorganisms, taxonomic composition of bacteria, Gleyic Luvisols

УДК 577.355.3

РОДОПИН, ВСТРОЕННЫЙ В КОМПЛЕКС LH2 ИЗ *ALLOCHROMATIUM VINOSUM*, СПОСОБЕН К ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

© 2024 г. З. К. Махнева^а, М. А. Большаков^а, А. А. Ашихмин^а, А. А. Москаленко^{а, *}^аИнститут фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

*e-mail: andrey-moskalenko@rambler.ru

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После исправления 24.10.2023 г.

Принята к опубликованию 26.10.2023 г.

Из клеток *Allochrochromatium vinosum* с ингибированным с помощью дифениламина (ДФА) синтезом каротиноидов были получены ДФА мембраны, в которые был встроен родопин. Выделен комплекс LH2 с содержанием родопина 85%. С помощью теста на термостабильность комплексов LH2 (ДФА и со встроенным родопином) установлено, что каротиноиды ранних стадий биосинтеза (≤ 1 молекулы на комплекс) не мешают встраиванию родопина. Установлено, что при облучении комплекса LH2 со встроенным родопином светом с длиной волны 502 нм происходит выцветание БХл850 со скоростью, близкой к скорости в контрольном комплексе LH2. Это указывает на то, что родопин после встраивания в ДФА комплекс LH2 способен к генерации синглетного кислорода под действием света. Подтверждены полученные ранее данные о гетерогенности каротиноидного состава в ДФА комплексах LH2 (варьирование количества отдельных каротиноидов на один комплекс в общей популяции) и выдвинутая нами ранее гипотеза о структурной роли каротиноидов, а именно, их способности стабилизировать комплексы LH2. На основании анализа полученных результатов, а также литературных данных обсуждается взаимодействие синглетного кислорода и каротиноидов.

Ключевые слова: фотосинтезирующие бактерии, фотосинтез, каротиноиды, комплекс LH2, синглетный кислород, 3-ацетил-хлорофилл

DOI: 10.31857/S0026365624030057

Светособирающая антенна пурпурных фотосинтезирующих бактерий состоит, как правило, из двух типов пигмент-белковых комплексов: периферийного LH2 (В800–850) и прицентрального LH1 (В870–890). Последний образует с реакционным центром (RC) ансамбль LH1-RC. Основным из этих комплексов (по количеству копий в клетке и содержанию пигментов) является комплекс LH2. Схематично он представляет собой полый цилиндр, построенный из двух типов (α и β) гидрофобных полипептидов. С одним α/β -гетеродимером нековалентно связаны три молекулы бактериохлорофилла (БХл) и один каротиноид. БХл в комплексе LH2 поглощает при ~ 385 нм (полоса Core), ~ 590 нм (Q_x переход), а также при ~ 800 и ~ 850 нм в ближней ИК-области (Q_y переходы БХл), а каротиноиды – в области ~ 400 – 550 нм.

Молекулы каротиноидов располагаются между α - и β -полипептидами в так называемых “каротиноидных карманах” таким образом, что их полиеновая цепь приобретает S-образную форму, проходит перпендикулярно мембране и взаимодействует как с молекулами БХл в соответствующих агрегатах (БХл800, БХл850), так и с аминокислотными остатками обоих полипептидов (Freer et al., 1996; Prince et al., 1997; Papiz et al., 2003; Prince et al., 2003; Gabrielsen et al., 2009, Löhner et al., 2015). Согласно модели, предложенной в работе (Löhner et al., 2015), комплекс LH2 из пурпурной серной бактерии *Allochrochromatium (Alc.) vinosum* может состоять из 12 пар α/β -гетеродимеров, 36 молекул БХл и 12 молекул каротиноидов.

Каротиноиды являются дополнительными пигментами фотосинтезирующих пурпурных бактерий и выполняют ряд функций *in vivo*, из которых можно выделить светособирающую, структурную и защитную (Cogdell, Frank, 1987; Britton, 2008): во-первых, они расширяют спектральный

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл, LH – светособирающий комплекс, *Alc.* – *Allochrochromatium*, АцХл – 3-ацетил-хлорофилл, ДФА – дифениламин.

диапазон солнечного света, используемого в бактериальном фотосинтезе; во-вторых, их центральное положение в структуре комплекса позволяет им стабилизировать эту структуру, и без каротиноидов комплексы теряют свою термостабильность и устойчивость к действию некоторых детергентов (Москаленко и соавт., 1983; Moskalenko, Karapetyan, 1996; Moskalenko et al., 2005); в-третьих, они способны дезактивировать (тушить) химически активную форму кислорода – синглетный кислород ($^1\text{O}_2^*$), а также нейтрализовать его, если он все же образовался, защищая, таким образом, БХл в комплексах от фотоокисления (Cogdell, Frank, 1987; Polivka, Frank, 2010). Ранее одному из авторов данной работы удалось обнаружить, что при освещении сине-зеленым светом (полоса поглощения каротиноидов) в мембранах или комплексах LH2 *Alc. vinosum* (старое название *Alc. minutissimum*) происходило выцветание длинноволновой полосы поглощения БХл850 комплекса LH2 (Москаленко, 1974). Такой же эффект был обнаружен позднее у некоторых других серных бактерий (Большаков, 2012; Ашихмин, 2014; Leiger et al., 2019). При прямом возбуждении самого БХл в образце фотовыцветание полосы БХл850 практически отсутствовало (Москаленко, 1974, Махнева и соавт., 2007). В работе (Махнева и соавт., 2016) показано, что похожие спектральные изменения происходят в мембранах и в изолированных комплексах LH2 при их окислении феррицианидом калия. Продукт окисления с максимумом поглощения в районе 700 нм был идентифицирован как 3-ацетил-хлорофилл (АцХл). Прямое действие синглетного кислорода на мембраны и комплексы LH2 из ряда бактерий, которое изучалось при добавлении к образцу бенгальского розового, известного генератора $^1\text{O}_2^*$, показало, что возбуждение последнего вызывает в спектрах поглощения образцов изменения, аналогичные наблюдаемым при возбуждении каротиноидов (Махнева и соавт., 2019а, 2019b; Makhneva et al., 2021). Фотовыцветание БХл прекращалось при добавке тушителей синглетного кислорода. На основе указанных данных мы пришли к выводу, что возбуждение каротиноидов в комплексах LH2 из *Alc. vinosum* приводит к генерации синглетного кислорода, который затем окисляет БХл850 с образованием АцХл (Махнева и Москаленко, 2022; Кленина и соавт., 2022). Таким образом, была выявлена принципиально новая функция каротиноидов в бактериальном фотосинтезе.

Открытие этой функции стало возможным благодаря уникальности структуры комплекса LH2 из *Alc. vinosum*. Она, вероятно, заключается в том, что у молекул БХл в кластере БХл850 во II пиррольном кольце в положении 7–8 присутствуют два свободных протона, которые при окислении БХл (в данном случае синглетным кислородом) отрываются с образованием двойной связи. Таким образом, у окисленного БХл меняется система сопряженных

двойных связей, что приводит к образованию АцХл. На спектре поглощения этот процесс фиксируется как уменьшение полосы поглощения Q_y БХл850 с коротковолновым смещением и появление пика АцХл около 700 нм. На основании полученных результатов стало понятно, что комплекс LH2 из *Alc. vinosum* является природным сенсором синглетного кислорода. Он был использован в этом качестве в гетерогенной системе (комплекс фотосистемы 2 + комплекс LH2) и установлена возможность регистрации с его помощью генерации синглетного кислорода комплексами фотосистемы 2 (Махнева и соавт., 2022).

В данной работе проведено встраивание родопина в бескаротиноидный комплекс (ДФА-комплекс) LH2 из клеток *Alc. vinosum*, выращенных в присутствии ингибитора каротиноидогенеза дифениламина (ДФА), и показана возможность генерации синглетного кислорода при освещении в области поглощения родопина в такой гомогенной системе (ДФА комплекс LH2 + родопин). Установлено, что процесс окисления БХл протекает с образованием АцХл, который является конечным продуктом окисления в этой системе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактерии *Alc. vinosum* (старое название *Alc. minutissimum*) из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ выращивали при температуре 30°C при непрерывном освещении (интенсивность света 90 Вт/м²) на среде Larsen (Кондратьева, 1972). В качестве источника света использовали лампы накаливания мощностью 75 W. Клетки собирали в стационарной фазе роста на 4–6 сут выращивания. ДФА-клетки *Alc. vinosum* выращивали в присутствии 71 мкМ (12 мг/л среды) ДФА. Полученную биомассу сразу использовали в экспериментах или хранили при температуре –18°C.

Для выделения пигмент-содержащих мембран клетки *Alc. vinosum* ресуспендировали в 10 мМ Трис-НСI-буфере (рН 8.0) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗГ 13–0.1–22 (“Ультразвуковая техника”, Россия). Мембраны получали, как описано в работе (Ашихмин и соавт., 2020). Пигмент-белковые комплексы выделяли методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-TOYOPEARL 650 S (Большаков и соавт., 2016). Для солюбилизации мембран был использован додецилмальтозид (ДМ) в концентрации 2–2.5%. Полученные образцы сразу использовали для анализа или хранили при –18°C.

Родопин выделяли методом ВЭЖХ, как описано в работе (Ашихмин и соавт., 2022). Чистота препарата составляла ≥85%. Спектр поглощения родопина представлен на рис. 1а.

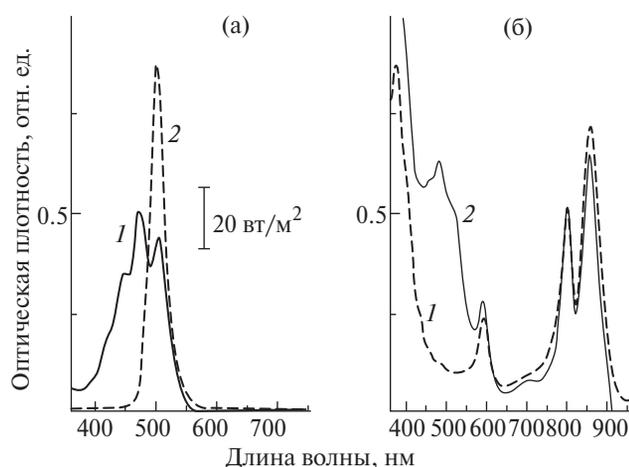


Рис. 1. а – Спектр поглощения родопина, используемого для встраивания (1) и спектр излучения светодиода; б – спектры поглощения ДФА-мембран из клеток *Alc. vinosum* с ингибированным синтезом Кар до (1) и после добавления к ним 3 порций родопина и последующего диализа (2).

Для его встраивания использовали модифицированную методику, описанную в работе (Торопыгина и соавт., 2003а). В качестве образца для встраивания брали 2.7 мл ДФА-мембран *Alc. vinosum* (плотность 20 опт. ед. при 850 нм; рис. 1б), к которым добавляли 0.3 мл ДМ (20%). Родопин (0.43 мМ) растворяли в 1.8 мл смеси ацетон-метанол (7 : 2) и добавляли к ДФА-мембранам дробно по 0.6 мл. Объем родопина в растворителе не превышал 20% от объема образца. После каждого добавления родопина проводили диализ образца против Трис-НСl буфера (50 мМ; рН 8) с 0.1% ДМ для удаления растворителя. В одном опыте добавляли до 3 порций родопина. Спектры поглощения мембран до и после добавления родопина представлены на рис. 1б.

Пигменты анализировали методом ВЭЖХ (Ashikhmin et al., 2017) на колонке Spherisorb ODS2 5 мкм (“Waters”, США). Установка для ВЭЖХ состояла из насоса LC10ADvp с модулем FCV10 Alvp, детектора с диодной матрицей SPD-M20A и термостата СТО-20АС (“Shimadzu”, Япония).

Спектры поглощения мембран и пигмент-белковых комплексов регистрировали при комнатной температуре на спектрофотометре Cary 50 (“Varian”, Австралия).

Комплексы LH2 облучали светом с длиной волны 502 нм, используя светодиод мощностью 30 Вт. Интенсивность света была 118 Вт/м². Термостойкость комплексов проверяли, нагревая образец в течение 1 или 5 мин при 80°C. Электрофорез в ПААГ проводили в 7% геле (Москаленко, Ерохин, 1974).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для встраивания каротиноида использованы ДФА-мембраны *Alc. vinosum*, которые содержали небольшое количество каротиноидов ранних стадий биосинтеза (нейроспорин, ξ -каротин и их производные), а также так называемые неокрашенные предшественники фитонин и фитофлуин (рис. 2).

По нашим оценкам, содержание окрашенных каротиноидов в образце не превышало 5%. На первом этапе было важно добиться эффективного встраивания родопина в комплекс LH2. Поэтому мы увеличили концентрацию родопина и уменьшили количество порций каротиноида, добавляемых к образцу. В результате был получен образец, в котором основной максимум каротиноидов в ≈ 4 раза выше максимума Q_x перехода при 590 нм (рис. 1а). Выделение комплекса LH2 со встроенным родопином показало, что удалось добиться $\approx 85\%$ эффективности встраивания этого каротиноида. Отметим, что в спектре поглощения комплекса LH2 со встроенным родопином, кроме самого родопина (максимум при 497 нм) присутствуют также каротиноиды ранних стадий биосинтеза (максимум при 432 нм) (рис. 1 и 2). Данные ВЭЖХ подтверждают, что родопин – это основной каротиноид в комплексе LH2 (рис. 3).

Примерно такая же эффективность встраивания родопина в ДФА комплекс LH2 из *Alc. vinosum* была получена нами ранее при исследовании влияния количества сопряженных двойных связей в молекулах каротиноидов на эффективность переноса энергии на БХл (Ашихмин и соавт., 2018). Однако в этом случае комплекс находился в более коротковолновой конформации, и поэтому отношение полос БХл850/БХл800 было меньше 0.9. Возникает вопрос, что может мешать 100% встраиванию родопина в комплекс LH2? Возможно, это связано с присутствием небольшого количества

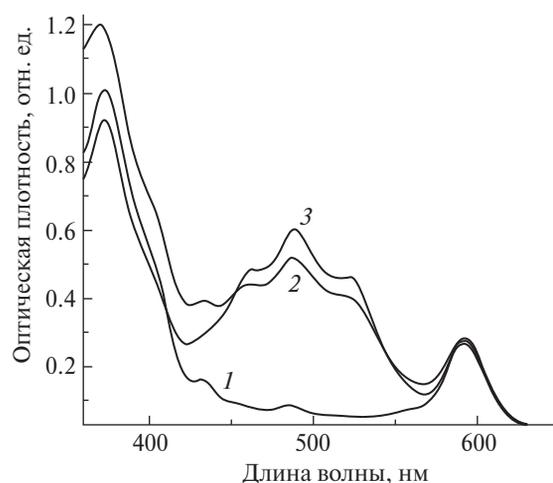


Рис. 2. Спектры поглощения ДФА-комплекса LH2 (1), комплекса LH2 со встроенным родопином (2) и контрольного комплекса LH2 из *Alc. vinosum* (3).

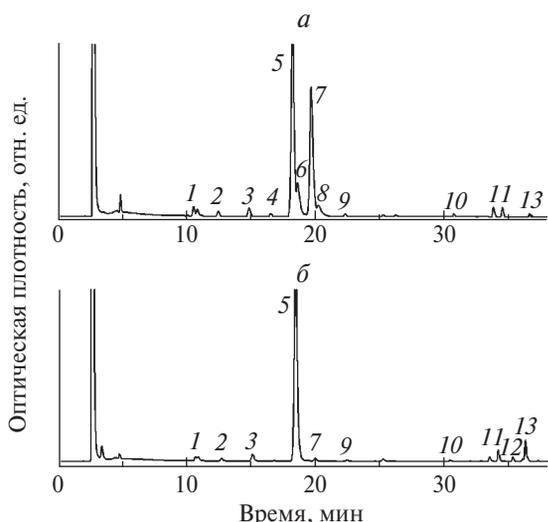


Рис. 3. ВЭЖХ пигментов комплекса LH2 со встроенным родопином (а) и ДФА-комплекса LH2 (б) из *Alc. vinosum*. Идентификация пиков: 1–5 – БХл и его производные; 6 – дидегидрородопин; 7 – родопин; 8 – спирилоксантин; 9 – бактериофеофитин; 10 – неидентифицированный продукт некаротиноидной природы; 11 – ζ -каротин; 12 – фитофлуин; 13 – фитоин.

каротиноидов в образце, используемом для встраивания (рис. 1 и 2), которые локализованы в части комплексов и блокируют процесс встраивания. Чтобы ответить на этот вопрос, был проведен дополнительный эксперимент по изучению термостабильности образцов. Мы основывались на выдвинутой нами теории о том, что каротиноиды способны играть структурную роль, стабилизируя комплексы LH2 против внешних воздействий (температура, детергенты) (Москаленко и соавт., 1983; Moskalenko, Karapetyan, 1996; Moskalenko et al., 2005), и предположили, что среди комплексов со встроенными каротиноидами могли присутствовать комплексы с большим содержанием каротиноидов (80–100%) и комплексы с низким содержанием каротиноидов (1–2 молекулы). Нагревание при 80°C сохранило бы (не полностью) первый тип комплексов и разрушило бы второй тип. Это, в свою очередь, привело бы к тому, что в спектре поглощения комплекса LH2 со встроенным родопином исчез максимум при 432 нм. Результаты эксперимента представлены на рис. 4.

Хорошо видно, что при нагревании разрушается только небольшая часть ($\approx 10\%$) комплекса LH2 со встроенным родопином. Отметим, что такой же процесс наблюдается для контрольных комплексов. Из спектров поглощения в каротиноидной области исследуемого комплекса видно, что каротиноиды из ранних стадий биосинтеза сохранились в его структуре после нагревания (рис. 4в). Аналогичный опыт, проведенный с ДФА комплексом LH2, подтвердил, что через 5 мин нагревания при 80°C разрушается основная часть, а выживает только $\approx 10\text{--}12\%$ комплекса LH2, которые обогащены

каротиноидами в ≈ 3.5 раза по сравнению с исходным комплексом (рис. 4г). Из этих данных следует, что присутствие небольшого количества каротиноидов (≈ 1 молекула на комплекс) не препятствуют их встраиванию в комплексы LH2, и высказанное выше предположение о возможной блокировке такого процесса каротиноидами из ранних стадий биосинтеза не соответствует действительности. Полученные результаты являются также прямым доказательством структурной функции каротиноидов и подтверждают гетерогенность каротиноидного состава в популяции ДФА-комплексов LH2 (Москаленко и соавт., 1983; Makhneva et al., 2008; Moskalenko, Karapetyan, 1996).

Перед оценкой возможности генерации синглетного кислорода родопином, встроенным в комплекс LH2, необходимо было оценить способность образцов, используемых для встраивания, к участию в подобном процессе. Дело в том, что в отличие от мутантов, которые имеют достаточно стандартные характеристики, в ДФА образцах количество и состав каротиноидов варьирует от опыта к опыту, а, следовательно, и эффективность генерации синглетного кислорода тоже будет разной. Для подобных опытов в данной работе был использован светодиод, который обладал узким диапазоном излучения (спектр его излучения был похож на спектр пропускания интерференционного светофильтра) и высокой мощностью светового потока (рис. 1а) по сравнению со стеклянными

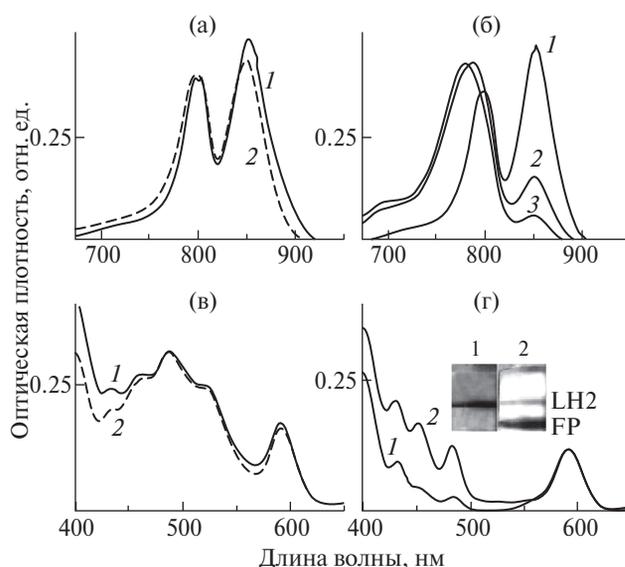


Рис. 4. Изменения в спектре поглощения комплекса LH2 со встроенным родопином (а) до (1) и после нагревания 5 мин при 80°C (2) и ДФА-комплекса LH2 (б) до (1) и после нагревания 2 мин (2) и 5 мин (3) при 80°C. Спектры (в, г) нормированы: по максимуму при 486 нм (в, 1) и при 590 нм (г, 1). Вставка: ПАГЭ ДФА-комплекса LH2 до (1) и после нагревания 5 мин (2) при 80°C (LH2 – комплекс LH2; FP – зона свободных пигментов).

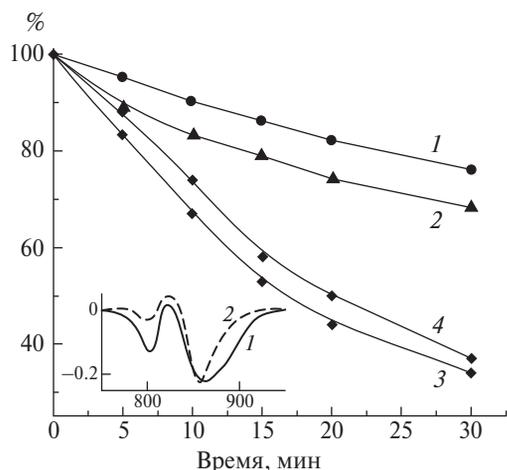


Рис. 5. Кривые выцветания БХл850 в ДФА-мембранах (1), ДФА-комплексе LH2 (2), контрольном комплексе LH2 (3) и комплексе LH2 со встроенным родопином (4) при освещении светодионом с максимумом излучения 502 нм. Вставка: разностные спектры “контроль – 30 мин освещения светом 502 нм” ДФА-мембран (1) и ДФА-комплекса LH2 (2). Спектры нормированы по максимуму БХл850.

светофильтрами разных типов, которые мы использовали ранее (Махнева и соавт., 2019а, 2019б; Махнева и соавт., 2020). Показано, что ДФА комплекс LH2 в выделенном состоянии менее устойчив к облучению светом с максимумом 502 нм по сравнению с ДФА мембранами (рис. 5).

Этот результат совпадает с общими представлениями о том, что подобный комплекс более устойчив *in vivo*, чем *in vitro*. Отметим, что в ДФА мембранах выцветают обе полосы Q_y комплекса LH2 (БХл850 и БХл800), а также Q_y комплекса LH1 (БХл880) (рис. 5, вставка). Выцветания полосы Q_y комплекса LH2 (БХл800) мы ни разу не зафиксировали при облучении контрольных образцов с помощью светофильтров (Москаленко, 1974; Махнева и соавт., 2019а, 2019б; Махнева и соавт., 2020). Ранее было показано, что действующим фактором этого процесса может являться синглетный кислород, который образуется при облучении комплексов LH2 из *Alc. vinosum* в область каротиноидов (Махнева и соавт., 2019б, 2020). Наличие этого эффекта в ДФА комплексах LH2 связано с частичным перекрытием области поглощения каротиноидов из ранних стадий биосинтеза со спектром излучения используемого светодиода. В контрольных комплексах LH2 этот процесс идет с более высокой скоростью (рис. 5).

Сравнивая процесс выцветания БХл в комплексах LH2 со встроенным родопином и контрольных комплексах LH2, можно отметить, что они практически идентичны. В обоих случаях происходит выцветание полосы БХл850, ее коротковолновое смещение до 830 нм и одновременное появление

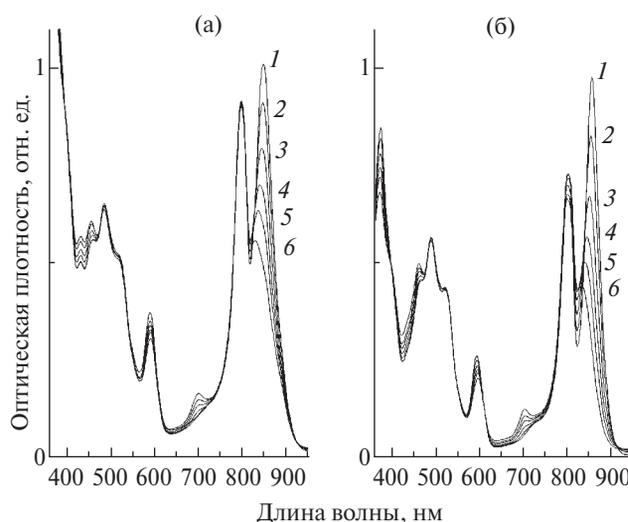


Рис. 6. Изменения в спектре поглощения комплекса LH2 со встроенным родопином (а) и контрольного комплекса LH2 (б) при освещении светодионом с максимумом излучения 502 нм: 1 – 0; 2 – 5; 3 – 10; 4 – 15; 5 – 20; 6 – 30 мин.

полосы поглощения окисленного продукта – АцХл (рис. 6).

Скорости окисления БХл850 в обоих комплексах были близки (рис. 5). Установлено, что понижение температуры с 24 до 0°С уменьшало выцветание БХл850 в контрольном комплексе LH2 с ~85% до ~47%, однако реакция окисления не останавливалась (результаты не показаны). Следует подчеркнуть, что АцХл является конечным продуктом окисления БХл в рассматриваемом процессе, так как его концентрация в образце увеличивается при увеличении времени освещения, а не выходит на плато или уменьшается, что характерно для промежуточных продуктов (рис. 7). Таким образом,

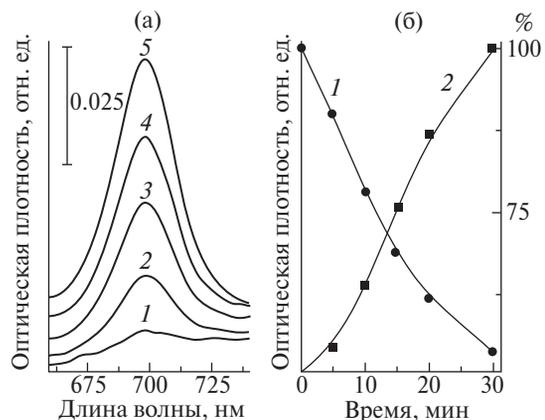


Рис. 7. Влияние освещения светодионом с максимумом излучения 502 нм на комплекс LH2 со встроенным родопином: а – увеличение поглощения АцХл (1 – 5; 2 – 10; 3 – 15; 4 – 20; 5 – 30 мин освещения); б – кривые изменения поглощения Q_y БХл850 (1) и АцХл (2).

родопин, встроенный в комплекс LH2, способен генерировать синглетный кислород под действием света, и он окисляет БХл850.

Способность бактериальных каротиноидов генерировать синглетный кислород является неожиданной и поэтому, фактически, в литературе не рассматривалась, так как перекрывалась их защитной функцией (Griffiths et al., 1955; Calvin, 1955; Cogdell, Frank, 1987; Frank, Cogdell, 1993, 1996; Britton, 2008; Polivka, Frank, 2010; Uragami et al., 2020). Ранее в наших работах мы показали, что каротиноиды в комплексах LH2 некоторых пурпурных серных бактерий могут при освещении вызывать окисление БХл, и этот процесс связан с генерацией синглетного кислорода каротиноидами (Махнева и соавт., 2007, 2019a, 2019b, 2020, 2022; Makhneva et al., 2021; Кленина и соавт., 2022). В недавнем исследовании было установлено, что фотоокисление БХл у *Alc. vinosum* происходит именно при возбуждении каротиноидов, а не самих молекул БХл. Однако этот процесс протекает с очень низким квантовым выходом около 0.0003 (Кленина и соавт., 2022). Дополнительное подтверждение возможности генерации синглетного кислорода бактериальными каротиноидами было получено при исследовании их аэрированных растворов (Ашихмин и соавт., 2020, 2022) с использованием нового спектрометра флуоресценции синглетного кислорода, недавно собранного группой А. А. Красновского (Красновский и соавт., 2019). Изучение фотосенсибилизированной флуоресценции синглетного кислорода при 1270 нм в растворах фитоина, фитофлуина и ζ -каротина показало, что квантовый выход генерации синглетного кислорода у ζ -каротина и фитофлуина может достигать 0.015 и 0.4 соответственно (Ашихмин и соавт., 2022). Следует отметить, что ранее о высоком квантовом выходе генерации синглетного кислорода среди фотосинтетических пигментов впервые сообщалось только для хлорофиллов, БХл и феофитинов (Krasnovskii, 1977; Krasnovsky, 1979; Borland et al., 1987; Егоров и соавт., 1990).

Биологический смысл генерации синглетного кислорода изолированными каротиноидами и каротиноидами в бактериальных комплексах LH2 на данный момент до конца не ясен. Возможно, что синглетный кислород может выступать в роли сигнальной молекулы, которая позволяет регулировать работу отдельных генов и сопутствующие биохимические процессы или запускать процессы апоптоза клетки в условиях избытка освещения.

ВКЛАД АВТОРОВ

ААМ — концепция, руководство работой; написание текста статьи и подготовка рисунков; ЗКМ — проведение экспериментов, редактирование текста статьи, обсуждение результатов исследования;

ААА — выделение родопина, редактирование текста статьи, МАБ — выделение комплексов LH2, подготовка статьи к печати.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (№ 122041100204-3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ашихмин А. А. Каротиноиды светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Ect. haloalkaliphila*. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 17.07.2014. Пушкино: Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 2014. 22 с.
- Ашихмин А. А., Бендикис А. С., Москаленко А. А., Красновский А. А. мл. Фитофлуин – эффективный фотосенсибилизатор образования синглетного кислорода под действием УФ-А излучения // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 907–915.
<https://doi.org/10.31857/S0320972520070052>
- Ashikhmin A., Benditkis A., Moskalenko A., Krasnovsky Jr A. A. Phytofluene as a highly efficient UV-A photosensitizer of singlet oxygen generation // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 773–780.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920070056>
- Ашихмин А., Махнева З., Большаков М., Москаленко А. Влияние количества сопряженных двойных связей в молекулах каротиноидов на эффективность переноса энергии на бактериохлорофилл в светособирающих комплексах LH2 из *Allochrochromatium vinosum*, штамм МГУ // ДАН. 2018. Т. 483. С. 332–336.
- Ashikhmin A. A., Makhneva Z. K., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A. The influence of the number of conjugated double bonds in carotenoid molecules on the energy transfer efficiency to bacteriochlorophyll in light-harvesting complexes LH2 from *Allochrochromatium vinosum* strain MSU // Dokl. Biochem. Biophys. 2018. V. 483. P. 321–325.
- Ашихмин А. А., Бендикис А. С., Москаленко А. А., Красновский (мл.) А. А. ζ -Каротин: генерация и тушение синглетного кислорода, сравнение с фитофлуином // Биохимия. 2022. V. 87. P. 1471–1482.
<https://doi.org/10.31857/S0320972522100128>
- Ashikhmin A. A., Benditkis A. S., Moskalenko A. A., Krasnovsky Jr A. A. ζ -Carotene: generation and quenching of singlet oxygen, comparison with phytofluene //

- Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. P. 1169–1178. <https://doi.org/10.1134/S0006297922100108>
- Большаков М. А.* Роль каротиноидов в процессе фотоокисления бактериохлорофилла *in vivo*. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 20.12.2012. Пушкино: Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 2012. 22 с.
- Bolshakov M. A.* The role of carotenoids in the photooxidation of bacteriochlorophyll *in vivo*. PhD thesis. 20.12.2012. Pushchino: Institute of Fundamental Problems of Biology Russian Academy of Sciences. P. 22.
- Большаков М. А., Ашихмин А. А., Махнева З. К., Москаленко А. А.* Влияние интенсивности освещения и ингибирования биосинтеза каротиноидов на сборку периферийных светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Allochrochromatium vinosum* ATCC17899 // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 403–414.
- Bolshakov M. A., Ashikhmin A. A., Makhneva Z. K., Moskalenko A. A.* Effect of illumination intensity and inhibition of carotenoid biosynthesis on assembly of peripheral light-harvesting complexes in purple sulfur bacteria *Allochrochromatium vinosum* ATCC17899 // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 420–429.
- Егоров С. Ю., Красновский А. А., Вычегжанина И. В., Дроздова Н. Н.* Фотосенсибилизированное образование и тушение синглетного молекулярного кислорода мономерными и агрегированными молекулами пигментов фотосинтезирующих бактерий // Доклады Академии наук. 1990. Т. 310. С. 471–474.
- Egorov S. Y., Krasnovskii, Jr. A. A., Vychezhnina I. V., Drozdova N. N., Krasnovskii A. A.* Generation and quenching of molecular single oxygen by pigment molecules in photosynthetic bacteria // Doklady Biophysics. 1990. V. 310. № 2. P. 6–10.
- Кленина И. Б., Махнева З. К., Москаленко А. А., Проксураков И. И.* Селективное возбуждение каротиноидов светособирающих комплексов LH2 *Allochrochromatium vinosum* приводит к окислению бактериохлорофилла // Биохимия. 2022. Т. 87. С. 1425–1433. <https://doi.org/10.31857/S0320972522100086>
- Klenina I. B., Makhneva Z. K., Moskalenko A. A., Proskuryakov I. I.* Selective excitation of carotenoids of the *Allochrochromatium vinosum* Light-Harvesting LH2 complexes leads to oxidation of bacteriochlorophyll // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. P. 1130–1137. <https://doi.org/10.1134/S0006297922100066>
- Кондратьева Е. Н.* Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез. М.: Изд-во МГУ, 1972. 75 с.
- Красновский А. А., Бендиткис А. С., Козлов А. С.* Кинетические измерения фосфоресценции синглетного кислорода методом разрешенного во времени счета фотонов в растворителях, не содержащих водородных атомов // Биохимия. 2019. Т. 84. С. 240–251.
- Krasnovsky A. A., Jr., Benditkis A. S., Kozlov A. S.* Kinetic measurements of singlet oxygen phosphorescence in the solvents lacking hydrogen atoms using the method of time resolved photon counting // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. 153–163.
- Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А.* Образование 3-ацетил-хлорофилла в светособирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении // Биохимия. 2016. Т. 81. С. 282–294.
- Makhneva Z. K., Ashikhmin A. A., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* 3-Acetyl-chlorophyll formation in light-harvesting complexes of purple bacteria by chemical oxidation // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 176–86.
- Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А.* Взаимодействие бактериохлорофилла с синглетным кислородом в мембранах пурпурных фотосинтезирующих бактерий: существует ли защитная функция каротиноидов? // ДАН. 2019а. Т. 486. С. 504–508. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524864504-508>
- Makhneva Z. K., Ashikhmin A. A., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* Bacteriochlorophyll interaction with singlet oxygen in membranes of purple photosynthetic bacteria: does the protective function of carotenoids exist? // Dokl. Biochem. Biophys. 2019a. V. 486. P. 216–219. <https://doi.org/10.1134/S1607672919030141>
- Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А.* Выделение синглетного кислорода мембранами пурпурных фотосинтезирующих бактерий при облучении светом происходит при возможном участии каротиноидов // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 169–179. <https://doi.org/10.31857/S0026365620010097>
- Makhneva Z. K., Ashikhmin A. A., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* Carotenoids are probably involved in singlet oxygen generation in the membranes of purple photosynthetic bacteria under light irradiation // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 164–173.
- Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А.* Защита BChl850 от действия синглетного кислорода в мембранах серной фотосинтезирующей бактерии *Allochrochromatium vinosum* с помощью тушителей // Микробиология. 2019б. Т. 88. С. 91–99. <https://doi.org/10.1134/S0026365619010129>
- Makhneva Z. K., Ashikhmin A. A., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* Quenchers protect BChl850 from action of singlet oxygen in the membranes of a sulfur photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum* strain MSU // Microbiology. 2019b. V. 88. P. 79–86.
- Махнева З. К., Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А.* Фотосенсибилизированное каротиноидами окисление димеров бактериохлорофилла светособирающих комплексов B800–850 в клетках *Allochrochromatium minutissimum* // ДАН. 2007. Т. 416. С. 408–411.
- Makhneva Z. K., Erokhin Yu. E., Moskalenko A. A.* Carotenoid-photosensitized oxidation of bacteriochlorophyll dimers in light-harvesting complexes B800–850 in *Allochrochromatium minutissimum* cells // Dokl. Biochem. Biophys. 2007. V. 416. № 1–6. P. 256–259. <https://doi.org/10.1134/S1607672907050080>
- Махнева З. К., Москаленко А. А.* Каротиноиды в комплексах LH2 из *Allochrochromatium vinosum* способны при

- освещении генерировать синглетный кислород, который окисляет BChl850 // *Микробиология*. 2022. Т. 91. С. 466–474.
<https://doi.org/10.31857/S0026365622300218>
- Makhneva Z. K., Moskalenko A. A.* Carotenoids in LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum* under illumination are able to generate singlet oxygen which oxidizes BChl850 // *Microbiology (Moscow)*. 2022. V. 91. P. 409–416.
<https://doi.org/10.1134/S002626172230021X>
- Махнева З. К., Смолова Т. Н., Большаков М. А., Москаленко А. А.* Комплекс LH2 из серной бактерии *Allochrochromatium vinosum* – природный сенсор синглетного кислорода // *Биохимия*. 2022. Т. 87. С. 1459–1470.
<https://doi.org/10.31857/S0320972522100116>
- Makhneva Z. K., Smolova T. N., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* LH2 complex from sulfur bacteria *Allochrochromatium vinosum* – natural singlet oxygen sensor // *Biochemistry (Moscow)*. 2022. V. 87. P. 1159–1168.
<https://doi.org/10.1134/S0006297922100091>
- Москаленко А. А., Ерохин Ю. Е.* Выделение пигмент-липопротеиновых комплексов из пурпурных бактерий методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле // *Микробиология*. 1974. V. 43. С. 654–657.
- Москаленко А. А.* Изучение пигмент-липопротеиновых комплексов из *Chromatium minutissimum*. Дисс. ... канд. биол. наук. Пушино, 1974. 189 с.
- Москаленко А. А., Кузнецова Н. Ю., Ерохин Ю. Е.* Выделение, спектральные и фотохимические характеристики трех типов пигмент-белковых комплексов из *Chromatium* с подавленным синтезом каротиноидов // *ДАН СССР*. 1983. Т. 269. С. 1248–1251.
- Торопыгина О. А., Махнева З. К., Москаленко А. А.* Встраивание каротиноидов в светособирающий комплекс B800–850 из *Chromatium minutissimum* // *Биохимия*. 2003а. Т. 68. С. 1101–1112.
- Торопыгина О. А., Мakhneva Z. K., Moskalenko A. A.* Reconstitution of carotenoids into the light-harvesting complex B800–850 of *Chromatium minutissimum* // *Biochemistry (Moscow)*. 2003а. V. 68. P. 901–911.
<https://doi.org/10.1023/A:1025755116593>
- Ashikhmin A., Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A.* Incorporation of spheroidene and spheroidenone into light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2017. V. 170. P. 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.020>
- Borland C. F., McGarvey D.J., Truscott T. G., Cogdell R. J., Land E. J.* Photophysical studies of bacteriochlorophyll *a* and bacteriopheophytin *a* – singlet oxygen generation // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 1987. V. 1. P. 93–101.
[https://doi.org/10.1016/1011-1344\(87\)80009-X](https://doi.org/10.1016/1011-1344(87)80009-X)
- Britton G.* Functions of intact carotenoids // *Carotenoids. Natural Functions* / Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfanger H. Birkhauser Verlag, Switzerland, 2008. P. 265–308.
- Calvin M.* Function of carotenoids in photosynthesis // *Nature*. 1955. V. 176. P. 1215.
- Cogdell R. J., Frank H. A.* How carotenoids function in photosynthetic bacteria // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V. 895. P. 63–79.
- Frank H. A., Cogdell R. J.* Photochemistry and function of carotenoids in bacteria // *The photochemistry of carotenoids* / Eds. Frank H. A., Young A. J., Britton G., Cogdell R. J. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. P. 36–69.
- Frank H. A., Cogdell R. J.* Carotenoids in photosynthesis // *Photochem. Photobiol.* 1996. V. 63. P. 257–264.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022.x>
- Freer A., Prince S., Sauer K., Papiz M., Hawthornthwaite-Lawless A., McDermott G., Cogdell R., Isaacs N. W.* Pigment–pigment interactions and energy transfer in the antenna complex of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila* // *Structure*. 1996. V. 4. P. 449–462.
- Gabrielsen M., Gardiner A. T., Cogdell R. J.* Peripheral complexes of purple bacteria // *The purple phototrophic bacteria*. 2009. V. 28. P. 135–153.
- Griffiths M., Sistrom W., Cohen-Bazire G., Stanier R.* Functions of carotenoids in photosynthesis // *Nature*. 1955. V. 176. P. 1211–1215.
- Krasnovskii A. A.* Photoluminescence of singlet oxygen in solutions of the chlorophylls and pheophytins // *Biophysics*. 1977. V. 22. P. 960–962.
- Krasnovsky Jr. A. A.* Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions // *Photochem. Photobiol.* 1979. V. 29. P. 960–962.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb09255.x>
- Leiger K., Linnanto J. M., Rätsep M., Timpmann K., Ashikhmin A. A., Moskalenko A. A., Fufina T. Y., Gabdulkhakov A. G., Freiberg A.* Controlling photosynthetic excitons by selective pigment photooxidation // *J. Phys. Chem. B*. 2019. V. 123. P. 29–38.
- Löhner A., Carey A. M., Hacking K., Picken N., Kelly S., Cogdell R., Köhler J.* The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum* // *Photosynth. Res.* 2015. V. 123. P. 23–31.
- Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A.* Heterogeneity of carotenoid content and composition in LH2 of the purple sulphur bacterium *Allochrochromatium minutissimum* grown under carotenoid-biosynthesis inhibition // *Photosynth. Res.* 2008. V. 98. P. 633–641.
- Makhneva Z. K., Bolshakov M. A., Moskalenko A. A.* Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen // *Molecules*. 2021. V. 26. Art. 5120.
<https://doi.org/10.3390/molecules26175120>
- Moskalenko A. A., Karapetyan N. V.* Structural role of carotenoids in photosynthetic membranes // *Z. Naturforsch.* 1996. V. 51. P. 763–771.
- Papiz M. Z., Prince S. M., Howard T., Cogdell R. J., Isaacs N. W.* The structure and thermal motion of the B800–850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å resolution and 100K: New structural features and functionally relevant motions // *Mol. Biol.* 2003. V. 326. P. 1523–1538.

- Moskalenko A. A., Makhneva Z. K., Fiedor L., Scheer H. Effects of carotenoid inhibition on the photosynthetic RC–LH1 complex in purple sulphur bacterium *Thiorhodospira sibirica* // Photosynth. Res. 2005. V. 86. P. 71–80. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-4473-9>
- Polívka T., Frank H. A. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids // Acc. Chem. Res. 2010. V. 43. P. 1125–1134. <https://doi.org/10.1021/ar100030m>
- Prince S. M., Howard T. D., Myles D. A., Wilkinson C., Papiz M. Z., Freer A. A., Cogdell R. J., Isaacs N. W. Detergent structure in crystals of the integral membrane light-harvesting complex LH2 from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050 // J. Mol. Biol. 2003. V. 326. P. 307–315.
- Prince S. M., Papiz M. Z., Freer A. A., McDermott G., Hawthornthwaite-Lawless A. M., Cogdell R. J., Isaacs N. W. Apoprotein structure in the LH2 complex from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050: modular assembly and protein pigment interactions // J. Mol. Biol. 1997. V. 268. P. 412–423.
- Uragami C., Sato H., Yukihiro N., Fujiwara M., Kozumi D. Photoprotective mechanisms in the core LH1 antenna pigment-protein complex from the purple photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* // J. Photoch. Photobiol. A: Chemistry. 2020. V. 400. Art. 112628. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112628>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Rhodopin Incorporated into the *Allochrochromatium vinosum* LH2 Complex Is Able to Generate Singlet Oxygen under Illumination

Z. K. Makhneva¹, M. A. Bolshakov¹, A. A. Ashikhmin¹, and A. A. Moskalenko^{1, *}

¹*Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: andrey-moskalenko@rambler.ru

Received July 6, 2023; revised October 24, 2023; accepted October 26, 2023

Abstract—DPA membranes from *Allochrochromatium vinosum* cells, in which carotenoid biosynthesis was inhibited using diphenylamine (DPA) were obtained, into which rhodopin was incorporated. The LH2 complex with rhodopin content of 85% was isolated. Using a test for the thermal stability of LH2 complexes (DPA and with incorporated rhodopin), it was established that carotenoids of the early stages of biosynthesis (≤ 1 molecules per complex) did not interfere with rhodopin incorporation. It was found that when the LH2 complex with incorporated rhodopin was irradiated with light at the wavelength of 502 nm, BChl850 was photobleached at a rate close to that in the control LH2 complex. This indicates that rhodopin, after being incorporated into the DPA LH2 complex, is capable of generating singlet oxygen under illumination. Previously obtained data on heterogeneity of the carotenoid composition in DPA LH2 complexes (variation in the number of individual carotenoids molecules per complex in the general population) and our earlier suggestion about the structural role of carotenoids, namely, their ability to stabilize the LH2 complexes, were confirmed. Based on analysis of our results, as well as of the literature data, the interaction of singlet oxygen and carotenoids is discussed.

Keywords: photosynthetic bacteria, photosynthesis, carotenoids, LH2 complex, singlet oxygen, 3-acetyl-chlorophyll

УДК 579.222.4+57.083+57.042:574.24

БИОДЕГРАДАЦИЯ Н-АЛКАНОВ В НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ПРИ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ© 2024 г. А. А. Самков^{а, *}, Н. Н. Волченко^а, Т. Н. Мусорина^а, М. Н. Круглова^а,
С. М. Самкова^а, А. А. Худокормов^а^аФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, 350040, Россия

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Поступила в редакцию 01.09.2023 г.

После исправления 20.10.2023 г.

Принята к опубликованию 28.10.2023 г.

Для биоэлектрохимической системы безмембранного (илового) типа исследована деградация углеводородов нефти, искусственно внесенной в донные отложения. Обнаружено, что пассивная биоэлектрохимическая стимуляция посредством электродов, соединенных внешней цепью с сопротивлением 1 кОм, при среднем электрическом токе около 85 мкА, за два месяца обеспечила прирост деградации от 23.0 до 57.9%. Загрязнение донных отложений нефтью в концентрации около 1.32 г/кг незначительно снижало ток во внешней цепи биоэлектрохимической системы. Выявлена связь степени деградации нефти с преимущественной утилизацией более легких н-алканов в ряду C₁₄H₃₀–C₃₀H₆₂ по сравнению как с исходной нефтью, так и с остаточными углеводородами в контроле. Рост относительной, к гену 16s рРНК, представленности генов алканмонооксигеназ *alkB* в тотальной ДНК, выделенной из донных отложений, был в сходной мере индуцирован внесением гексадекана как при биоэлектрохимической стимуляции, так и в контроле. Результаты могут представлять интерес для разработки новых методов биоэлектрохимической очистки анаэробных сред от органических загрязнений.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, микробные топливные элементы, биоэлектродокатализ, алканы, биодegradация, алканмонооксигеназа, *alkB*, нефть, биоремедиация

DOI: 10.31857/S0026365624030066

Биоэлектрохимические системы на базе микробных топливных элементов в настоящее время все более широко исследуются как инструмент экологической биотехнологии, поскольку позволяют качественно и количественно изменить катаболический потенциал микроорганизмов-деструкторов, что было подтверждено многими исследованиями (Li et al., 2015; Idris et al., 2022).

Деградация ксенобиотиков чистой культурой *Shewanella oneidensis* MR-1, исследованная в условиях микробных топливных элементов мембранного типа, показала взаимосвязь между электрической стимуляцией системы через внешнюю цепь и удельной скоростью обесцвечивания трифенилметанового красителя кристаллического фиолетового, а также составом продуктов его трансформации. Аналогичный эффект был обнаружен для азокрасителя конго красного. В качестве механизма взаимосвязи было предположено сопряжение электрохимических реакций, происходящих на аноде, и ферментативных реакций деградации красителя, благодаря высокой экзоэлектрогенной активности использованной культуры рода *Shewanella* (Самков и соавт., 2023). Микроорганизмы с экзоэлектрогенной

активностью, в том числе данного рода, часто представлены в микробиоценозах донных отложений, так как имеют приспособительные механизмы функционирования в условиях дефицита конечных акцепторов электронов, за счет эффективного восстановления внешних акцепторов (Fe³⁺ и др.) (Bose et al., 2009; Voeikova et al., 2013). Обнаружено присутствие больших титров электроактивных микроорганизмов рода *Geobacter* в микробиоценозах, осуществляющих деструкцию углеводородов в почвах (Wang et al., 2019a).

К настоящему моменту разработаны и активно используются многочисленные технологии биологической очистки углеводород-загрязненных почв и грунтов, созданы бактериальные препараты, однако эти методы основаны на использовании микроорганизмов в преимущественно аэробных или микроаэрофильных условиях. Известно, что нефть и тяжелые нефтепродукты, попадая в водоемы, в смеси со взвешенными твердыми частицами оседают на дно и становятся частью донных отложений. С учетом больших объемов нефтяных загрязнений, актуальность данной экологической проблемы очевидна. Это связано с тем, что,

достаточно интенсивно окисляясь в аэробных условиях, углеводороды нефти в донных отложениях способны гораздо дольше сохранять свои опасные свойства. Известно, что недостаток кислорода накладывает некоторые ограничения на скорость биodeградации. В условиях недостатка акцепторов электронов значительную проблему может представлять избыток восстановительных эквивалентов, образующихся при электронтранспортом фосфорилировании. Ряд исследователей поддерживает гипотезу о том, что в анаэробной среде, при наличии искусственного акцептора электронов, например, анода микробного топливного элемента, осуществляющие начальные стадии катаболизма углеводородного поллютанта бактерии способны взаимодействовать с электроактивными бактериями (Tucci et al., 2021). Высказываются гипотезы о формировании “биоэлектрохимических трубопроводов”, обеспечивающих перенос электронов на большие расстояния между бескислородными донными отложениями и богатой кислородом вышележащей водой, стимулируя разложение нефти (Marzocchi et al., 2020).

Для нужд экологической биотехнологии большой интерес представляет возможность повышения интенсивности биodeградации нефтяных углеводородов в донных отложениях путем электрохимической стимуляции. Принципиальная возможность такого усиления биodeградации показана в целом ряде исследований и обзоров. В работе Mohanakrishna et al. (2020) показано, что в биоэлектрохимической системе проточного типа в условиях добавления в нефтезагрязненный почвогрунт сточной воды и ацетата убыль общих нефтепродуктов возрастала от 503 до 525–560 мг/л соответственно. Наиболее распространенной схемой внешней цепи считается резистор 1 кОм, обеспечивающий поляризацию электрода и возможность переноса электронов на катод; при этом в работе Cabrega et al. (2021) акцентируется внимание на деградации в биоэлектрохимической системе с пластовой водой большой доли углеводородов с использованием сульфатов в качестве конечного акцептора, альтернативного аноду. В ряде работ упоминается о роли дополнительных проводящих материалов в анодной зоне, как влияющих на межвидовой перенос электронов. При использовании активированного угля упоминается увеличение биodeградации пентахлорфенола в присутствии представителей *Desulfitobacterium* и *Geobacter* (Wang et al., 2021), либо интенсификация (при размещении углеродного войлока в анаэробном реакторе) синтрофии между гомоацетогенными бактериями *Tepidanaerobacter* и *Defluviitoga*, способными к прямой передаче электрона, и метаногенами, прежде всего, *Methanotherx* (Zhuravleva et al., 2023). В обзоре Lan et al. (2023) показаны многочисленные примеры прироста деградации нефти, дизельного топлива, моторного масла в простых почвенных

биоэлектрохимических системах на десятки процентов, при начальной концентрации в десятки г/кг. Таким образом, интенсификация катаболизма микробного сообщества в условиях, приближенных к анаэробным, происходит как за счет вывода электрона через внешнюю цепь, так и за счет перераспределения электронов между членами сообщества, разделенными пространственно, через инертный проводник и способность микроорганизмов к прямому транспорту электронов на него.

Несмотря на значительно более широкую распространенность алканмонооксигеназ, использующих молекулярный кислород в аэробной среде, гены *alkB* распространены также и в донных отложениях, где происходит биodeградация углеводородов (Wasmund et al., 2009; Paisse et al., 2011). В работе Venkidusamy et al. (2016) биопленки, формирующиеся на аноде биоэлектрохимической системы, где происходила биodeградация дизельного топлива, демонстрировали нарастание генов алканмонооксигеназ, в том числе *alkB*. При этом результаты секвенирования продуктов ПЦР с праймерами к генам *alkB* из образцов длительно функционировавшего в биоэлектрохимической системе анода показали большое сходство с последовательностями *alkB* у известных экзоэлектрогенов *Rhodopseudomonas*, *Shewanella* и *Stenotrophomonas*, а также сульфатредукторов *Catenulispora*, *Patulibacter*, *Marinobacter*, в то время как на ранних стадиях доминировали актинобактерии. Авторы исследования предположили, что произошел отбор экзоэлектрогенов бактерий, разлагающих дизельное топливо (Venkidusamy et al., 2016). Таким образом, возможность экзоэлектрогенных микроорганизмов деградировать алканы в условиях недостатка конечных акцепторов компенсировалось использованием анода для вывода электронов.

Известно, что анаэробная деградация углеводородов, в частности, алканов, предполагает начальную активацию молекулы несколькими путями, в конечном итоге ведущим к образованию карбоновой кислоты, а именно присоединением алкилсукцинатсинтазой к углеводородной цепи сукцината, образующегося через восстановление фумарата, либо присоединением к третьему углеродному атому цепи карбоксильной группы от неорганического донора, либо иными путями, сопряженными с нитратредукцией, сульфатредукцией или дисмутацией хлорит-аниона ClO_2^- с выделением молекулярного кислорода. Сопряжение анаэробной деградации алканов с метаногенезом обеспечивается ассоциативными с метаногенами синтрофными бактериями, трансформирующими алканы до ацетата и водорода, предположительно, с использованием неорганических доноров кислорода; при этом в качестве акцептора электронов выступает протон (Mbadinda et al., 2011). Образующиеся жирные

кислоты, в зависимости от наличия акцепторов, могут утилизироваться как через бета-окисление, так и через классическую анаэробную трофическую цепь, с выделением метана и углекислоты. Таким образом, наличие в среде искусственного акцептора электронов их электропроводящего материала может оказывать влияние как на удаление из среды избытка электронов через внешнюю цепь, так и через интенсификацию синтрофных взаимодействий между гомоацетогенами и метаногенами (Zhuravleva et al., 2023). В работе Liang et al. (2023) было обнаружено, что микробные консорциумы из гидротермальных отложений в различных регионах бассейна Гуаймас способны к сопряженному с сульфатредукцией анаэробному биологическому разложению *n*-алканов C_6 - C_{12} и C_{16} - C_{18} , а также сырой нефти. При этом в сообществе доминировали гены, ответственные за активацию через сукцинат алканов и аренов алкилсукцинатсинтазой и бензилсукцинатсинтазой соответственно (Liang et al., 2023). Таким образом, для оценки возможности биоэлектрохимической стимуляции деградации углеводородов в условиях донных отложений важно понимание баланса между классическим путем, за счет монооксигеназ, и альтернативными, не связанными с *alkB*.

Было предположено, что разница между начальными путями катаболизма алканов через прямое окисление монооксигеназами (алкангидроксилазной системы) и альтернативными вариантами анаэробного катаболизма проявится через разницу спектра остаточных углеводородов, а сравнение степени деструкции нефти с относительной представленностью генов *alkB* позволит сделать вывод о возможном вкладе монооксигеназного пути в процесс в условиях донных отложений.

Целью настоящей работы было изучение влияния условий безмембранной биоэлектрохимической системы с разностью потенциалов между электродами, обусловленной естественными процессами в донных отложениях, на биодеградацию нефти и качественный состав остаточных *n*-алканов, а также на относительную представленность копий генов бактериальных алканмонооксигеназ *alkB*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы. Нефтеоокисляющий штамм *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д (Самков и соавт., 2015), ранее выделенный и поддерживаемый на кафедре генетики, микробиологии и биохимии, был использован для валидации результатов количественной ПЦР.

Условия биоэлектрохимической стимуляции. В качестве биоэлектрохимической системы использовали безмембранные (иловые) микробные топливные элементы, представляющие собой анод

и катод, размещенные в донных отложениях (иле из озера Карасунское (г. Краснодар); координаты 45.022208, 39.034746) и в слое воды над ним, соответственно, соединенные внешней электрической цепью. Ил находился в емкостях диаметром 30 см слоем 6 см, в 1 см от дна размещали квадратный анод со стороной 8 см, изготовленный из углеродного войлока НТМ-100М. Над донными отложениями в зоне проекции анода на поверхность воды, налитой слоем 5 см, был размещен катод аналогичного размера и материала. Электрические провода от анода и катода были соединены через резистор сопротивлением 1 кОм. В донные отложения предварительно вносили нефть российскую в количестве 0.625 г на 1 л ила естественной влажности, что соответствовало концентрации 1.32 г/кг сухого ила. Использовали малосернистую (0.434%) нефть, фракционный состав которой приведен на рис 2а. В контрольном образце, в нефтезагрязненных донных отложениях, электроды не размещали. Также был подготовлен вариант с электродами, но без внесения нефти. Отдельную линию аналогичных экспериментов делали с внесением в донные отложения вместо нефти *n*-гексадекана либо нафталина в концентрации 0.3 г/л. Измерение разности потенциалов выполняли при помощи прецизионного цифрового мультиметра Актаком АММ-1139 (“НПП Эликс”, Россия). Ток вычисляли по закону Ома для участка цепи, с учетом сопротивления.

Измерение окислительно-восстановительного потенциала. Окислительно-восстановительный потенциал в донных отложениях контролировали при помощи рН-метра/ОВП-метра Hanna HI8424 с ОВП-электродом HI3230.

Количественный анализ нефтепродуктов. Определение концентрации остаточных нефтепродуктов проводили флуоресцентным методом на приборе Флюорат-02 (“Люмэкс”, Россия). Хлороформный экстракт из воздушно-сухого образца перерастворяли в гексане и очищали на колонке с оксидом алюминия перед измерением.

Хроматографический анализ. Оценку состава остаточных углеводородов проводили методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ/ПИД) на хроматографе Shimadzu GC2010 (Япония) с кварцевой капиллярной колонкой Quadrex длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина фазы Silphenylene polysiloxane – 0.25 мкм.

Молекулярно-генетические анализы. Для выделения ДНК из донных отложений использовали набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из образцов, содержащих гуминовые кислоты МетаГен EW-002 (ООО “НПФ Синтол”, Россия), с вариантом ручной пробоподготовки с жидким азотом.

Аmplификацию с детекцией в реальном времени проводили на Rotor-Gene Q (“QIAGEN GmbH”, Германия), используя набор реагентов R-402 для

проведения рвПЦР в присутствии SYBRGreen I (ООО “НПФ Синтол”, Россия). Использовали универсальные олигонуклеотидные праймеры к гену 16s рРНК (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG и 805R5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT), а также вырожденные праймеры к генам бактериальных алканмонооксигеназ *alkB* F 5'-AАСТАСМТСGARСAYTACGG и *alkB* R5'-TGAMGATGTGGTYRCTGTTCC (Powell et al., 2006). Относительную представленность генов алканмонооксигеназы вычисляли как отношение предварительно полученных показателей эффективности ПЦР с праймерами для гена 16s рРНК к таковой величине для гена *alkB*, в степенях соответствующих значений циклов количественной оценки *Cq* для референсного и целевого генов (Yuan et al., 2006; Bustin et al., 2009). Для построения стандартной кривой и определения эффективности ПЦР с праймерами для генов 16s рРНК и *alkB* в качестве контроля использовали штамм *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д, содержащий оба указанных гена.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверным считали различие при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биоэлектрохимическая стимуляция деградации обеспечивалась размещением в донных отложениях анода, соединенного электрической цепью сопротивлением 1 кОм с расположенным на поверхности воды катодом. Разность потенциалов между электродами такой системы, в режиме разомкнутой цепи, составляла 0.94 В и была связана с естественной поляризацией, теоретически способной достигать величины около 1.105 В. Размещение в цепи резистора обеспечивало замыкание внешней цепи и перемещение электронов от анода к катоду, а также возможность учета количества генерируемого электричества для оценки, в том числе, токсического воздействия нефти на микробиоценоз. Величина окислительно-восстановительного потенциала в околоанодной зоне биоэлектрохимической системы и аналогичном горизонте донных отложений в контроле была сходна и варьировалась около величины -289.7 мВ.

Динамика электрического тока во внешней цепи биоэлектрохимических систем (БЭС), различающихся присутствием и отсутствием нефтяного загрязнения донных отложений, показала некоторое ингибирование электрогенеза данной концентрацией загрязнителя (рис. 1), при которой показатель стабилизировался на величине более 100 мкА, что практически в два раза меньше контроля.

При этом, в течение первых 20 сут эксперимента, углеводороды не оказывали негативного влияния.

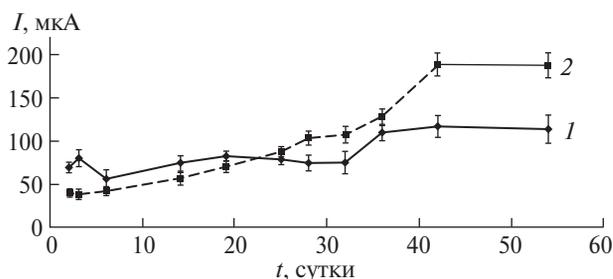


Рис. 1. Электрический ток во внешней цепи биоэлектрохимической системы в зависимости от наличия (1) или отсутствия (2) нефтяного загрязнения.

Снижение электрогенеза, предположительно, могло быть вызвано изменением микробиоценоза донных отложений, ведущим к уменьшению поступления электронов на анод, с задействованием иных конечных акцепторов. В работах со сходными условиями экспериментов обнаруживаются примеры преимущественно негативного (при высоких концентрациях порядка граммов на литр) влияния углеводородов на электрогенез. Например, в работе Chandrasekhar, Venkata Mohan (2012) в режиме разомкнутой цепи наблюдались следующие сочетания концентрации общих нефтяных углеводородов в шламе и напряжения: 1.11 г/л — 356 мВ, 3.34 г/л — 304 мВ, 5.56 г/л — 180 мВ и 11.10 г/л — 140 мВ. При этом максимальная убыль углеводородов наблюдалась именно в варианте с наименьшим электрогенезом (Chandrasekhar, Venkata Mohan, 2012).

После двух месяцев эксперимента был проведен отбор проб нефтезагрязненных донных отложений из приэлектродных зон опытных устройств, а также контрольных. Приэлектродной зоной считали ил между анодом, размещенным на дне сосуда на глубине около 6 см, и катодом. Отбор проб производили с глубины 1–4 см от дна. В контролях отбирали аналогичный по глубине слой донных отложений. Исследование концентрации остаточных углеводородов в донных отложениях показало значительную стимуляцию биодеградации в приэлектродной зоне. Степень деградации исходно внесенной нефти составила 57.9%. В то же время в контроле она составляла 23.0%.

Хроматографический анализ исходной сырой нефти и остаточных углеводородов показал значительные различия соотношения различных индивидуальных *n*-алканов в образцах из биоэлектрохимической системы и контроля. Сравнение хроматограмм нефтепродуктов приведено на рис. 2.

Разница в соотношении площадей пиков индивидуальных углеводородов, различающихся длиной цепи, для приведенного варианта опытного образца и контроля демонстрировала выраженную тенденцию к убыли, в случае пробы из зоны наиболее активной биоэлектрохимической деградации, преимущественно легких фракций *n*-алканов (в районе $C_{14}H_{30}$ и выше) при сохранении тяжелых.

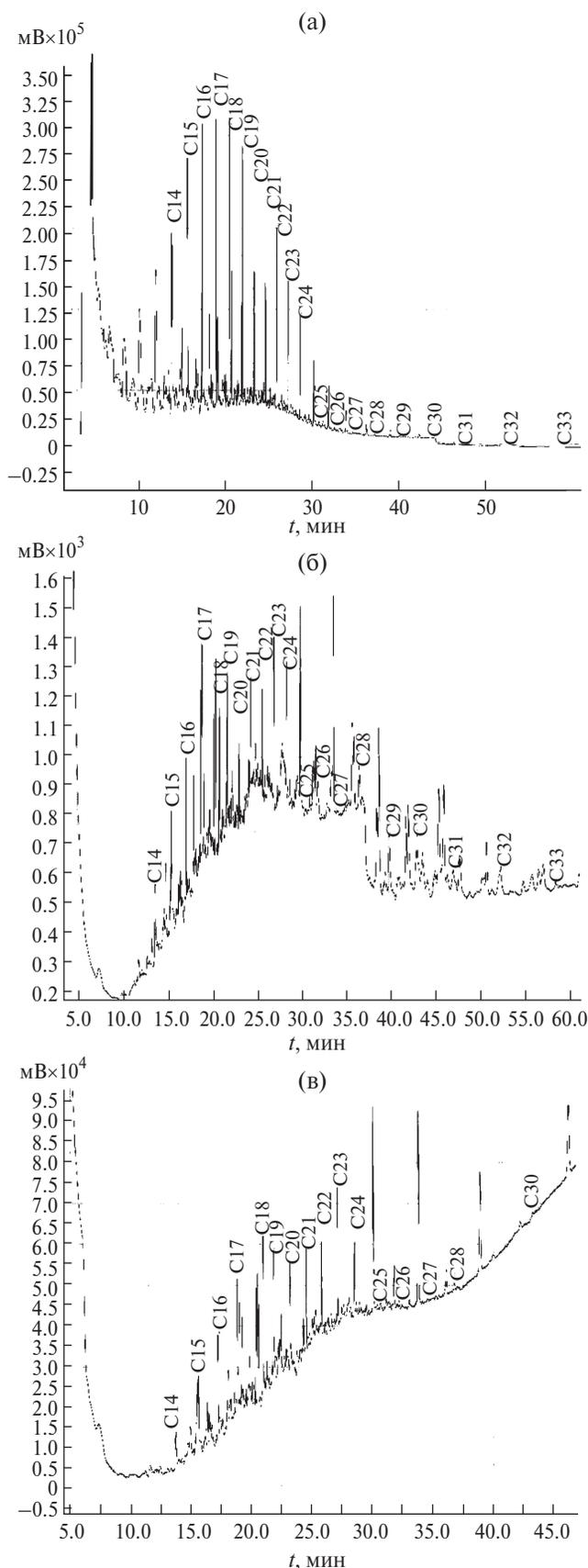


Рис. 2. Хроматограммы исходной сырой нефти (а), остаточных углеводородов в контроле (б) и биоэлектрохимической системе (в).

Для изучения характера влияния условий биоэлектрохимической системы на качественные параметры деструкции было проведено сравнение с исходной нефтью состава остаточных n-алканов, в диапазоне от C₁₄H₃₀ до C₃₀H₆₂ включительно. Для всех образцов были определены и сопоставлены площади соответствующих пиков хроматограмм. Приведенные в виде долей единицы значения показаны на рис. 3, для демонстрации баланса индивидуальных углеводородов на каждом графике приведены линии трендов. Процентные доли гомологов приведены в табл. 1.

Исходная сырая нефть, использованная для внесения в донные отложения (рис. 3а), продемонстрировала значительное преобладание легких гомологов n-алканов с постепенным практически линейным убыванием до C₃₀H₆₂. Остаточные углеводороды, после двухмесячной деградации без

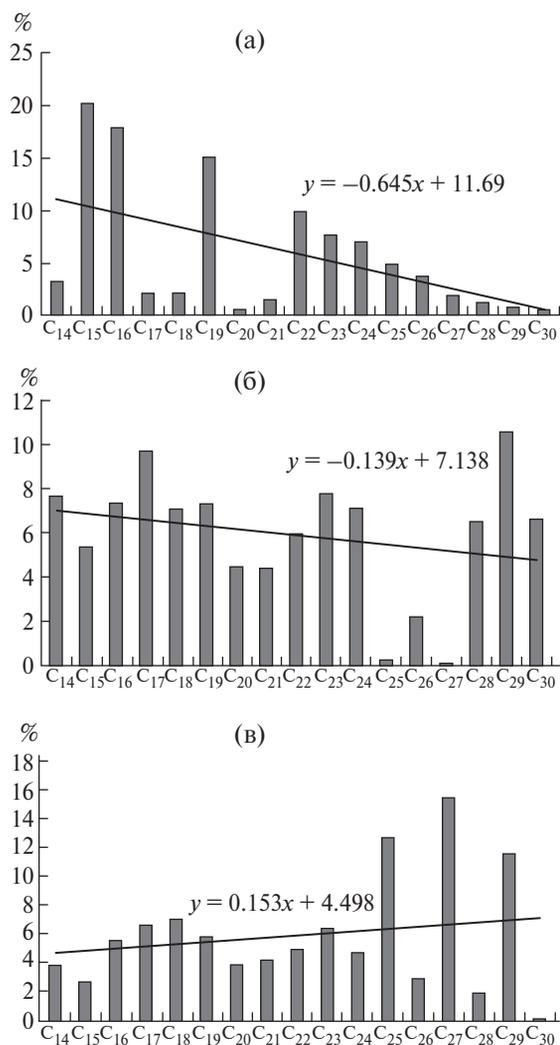


Рис. 3. Процентные доли площадей пиков n-алканов C₁₄H₃₀–C₃₀H₆₂ в зависимости от наличия биоэлектрохимического воздействия: а – нефть сырая; б – контроль; в – опыт.

Таблица 1. Процентное соотношение н-алканов C₁₄H₃₀–C₃₀H₆₂

Гомолог	Нефть сырая	Биоэлектрохимическая система	Контроль
C ₁₄ H ₃₀	3.22	3.79	7.62
C ₁₅ H ₃₂	20.20	2.66	5.32
C ₁₆ H ₃₄	17.86	5.55	7.34
C ₁₇ H ₃₆	2.09	6.63	9.66
C ₁₈ H ₃₈	2.11	7.04	7.06
C ₁₉ H ₄₀	14.98	5.79	7.30
C ₂₀ H ₄₂	0.56	3.89	4.44
C ₂₁ H ₄₄	1.51	4.16	4.38
C ₂₂ H ₄₆	9.86	4.90	5.94
C ₂₃ H ₄₈	7.65	6.34	7.74
C ₂₄ H ₅₀	7.02	4.70	7.08
C ₂₅ H ₅₂	4.86	12.67	0.26
C ₂₆ H ₅₄	3.72	2.92	2.19
C ₂₇ H ₅₆	1.7	15.43	0.08
C ₂₈ H ₅₈	1.20	1.90	6.47
C ₂₉ H ₆₀	0.78	11.55	10.52
C ₃₀ H ₆₀	0.52	0.08	6.58

биоэлектрохимической стимуляции в контроле (рис. 3б), имели уже более сходную представленность практически всех гомологов относительно таковых в исходной нефти, что может быть объяснено более высокой биологической доступностью и, соответственно, интенсивной деградацией легких соединений исследованного диапазона при сохранении более тяжелых алканов. Образцы из биоэлектрохимически активной приэлектродной зоны микробного топливного элемента отличались балансом остаточных фракций, уже заметно смещенным в сторону преобладания более длинноцепочечных углеводородов, что хорошо иллюстрируется противоположным наклоном линий тренда (рис. 3в) по сравнению с контролем (рис. 3б). Баланс гомологов также иллюстрируется знаками при коэффициентах наклонов урavnений линий трендов, отрицательных в случае сырой нефти, контроля и положительных в биоэлектрохимически активной приэлектродной зоне.

Таким образом, обнаружена биоэлектрохимическая стимуляция деградации углеводородов в микробном топливном элементе на основе донных отложений, что проявилось в почти двукратном увеличении убыли тотальных углеводородов, а также в преимущественном разложении более легких, биологически более доступных фракций н-алканов.

Было предположено, что в биоэлектрохимической системе стимуляция деградации легких фракций алканов могла быть связана либо с количественным ростом деградирующих углеводород

ферментных систем или ростом титра деструкторов, либо с качественным изменением протекания процессов катаболизма в микробном сообществе. В частности, с вовлечением в биodeградацию других микроорганизмов и ферментных систем, при отсутствии в донных отложениях электропроводящего анода и внешней цепи не проявляющихся. Например, анаэробных путей, связанных с сульфатредукцией, метаногенезом, восстановлением фумарата и др. (Mbadinga et al., 2011; Liang et al., 2023).

Известно, что ключевым ферментом бактериального окисления алканов является алкан-1-монооксигеназа (Bukliarevicha et al., 2023); *alkB* – хорошо изученная ферментная система терминального гидроксилирования алканов, катализирующая начальную стадию окисления углеродной цепи, а именно окисление метильной или метиленовой групп (Хмелевцова и соавт., 2017). Исследования показали широкую распространенность гена *alkB* и его гомологов в микробиоценозах, члены которых участвуют в начальных стадиях разложения алканов (Соляникова, Головлёва., 2019; Турова и соавт., 2018). Известны упоминания связи экспрессии генов деградации, в частности *alkB*, величин биodeградации углеводородов и электрохимических условий (Tao et al., 2023; Venkidusamy et al., 2016; Wang et al., 2019b).

Предварительно при помощи ПЦР в реальном времени и вырожденных праймеров, выявляющих гомологи гена алканмонооксигеназы у представителей разных филумов, в том числе *Proteobacteria*

(Powell et al., 2006), было обнаружено, что в тотальной ДНК, выделяемой из использованных в эксперименте донных отложений, стабильно присутствуют гены группы *alkB*.

Для оценки влияния биоэлектрохимической стимуляции на относительную представленность (Taylor et al., 2010) генов, ответственных за начальные стадии деградации алканов, был проведен аналогичный эксперимент, где в донные отложения были искусственно внесены типичные индивидуальные алифатические и ароматические углеводороды, присутствующие в нефти: н-гексадекан и нафталин. С использованием вырожденных праймеров (Powell et al., 2006) в тотальной ДНК, выделенной из донных отложений после двухмесячной инкубации, оценивали относительную представленность (относительное число копий) гена *alkB*, используя в качестве гена сравнения 16s рРНК (рис. 4).

Использованный метод вычисления отношения величин эффективностей ПЦР гена сравнения и целевого гена, в степенях циклов количественной оценки, в настоящее время используется все более широко (Shvets et al., 2022). Предварительно для каждой пары праймеров и матрицы, в качестве которой использовали ДНК из тест-культуры *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д, были получены кривые зависимости цикла количественной оценки от десятичного логарифма числа копий ДНК-матрицы. Для праймеров к 16s рРНК эффективность составила 1.92, для *alkB* – 1.87, что находится в оптимальном для ПЦР диапазоне, равном 1.8–2.2 (Taylor et al., 2010).

Прирост показателя по отношению к контролю (донные отложения без поллютанта) в наибольшей степени обеспечивался внесением гексадекана, внесение же нафталина достоверно не меняло относительную представленность гомологов алканмонооксигеназы, не превышавшую значение 3.0. При внесении гексадекана биоэлектрохимическая стимуляция обеспечивала незначительный прирост показателя с 5.9 до 6.6. Катаболический путь, связанный с *alkB*, по данным ряда авторов, также связан с деградацией углеводородов в условиях, приближенных к анаэробным (Wasmund et al., 2009; Paisse et al., 2011), но в данных экспериментальных условиях электрическая стимуляция обеспечивала значительную повышенную деструкцию нефти без выраженного увеличения в сходной степени представленности данного гена в тотальной ДНК микробиома. Таким образом, имел место иной механизм стимуляции. Известно, что система *alkB* нуждается в различных, связанных с цитохромами кофакторах, обеспечивающих изменение степени окисления углеродного атома. Бактериальные цитохромы обладают монооксигеназной активностью в отношении различных органических низкомолекулярных субстратов, при этом также нуждаясь

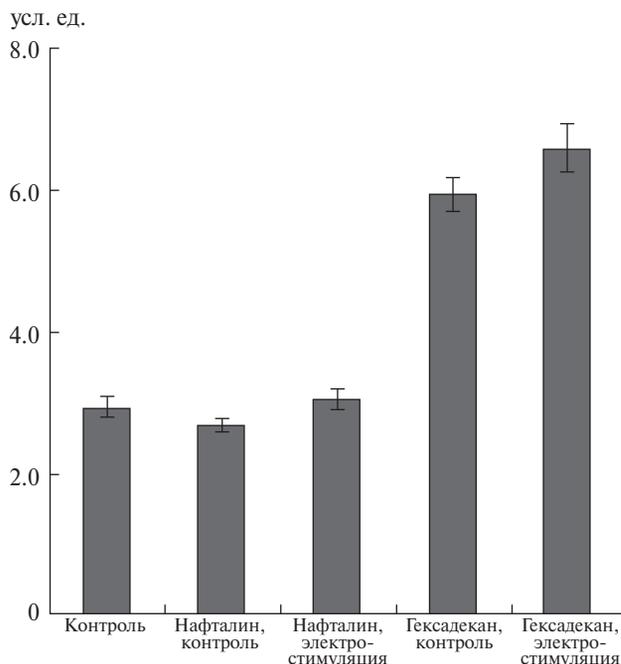


Рис. 4. Относительная представленность генов *alkB* в зависимости от вносимого углеводорода и наличия биоэлектрохимической стимуляции.

в электронах от сторонних доноров. Известно, что цитохромы P450 могут катализировать монооксигеназные реакции при отсутствии молекулярного кислорода, но при условии наличия органических или неорганических пероксидов (Хмелевцова и соавт., 2017). Отсутствие прироста относительной представленности генов алканмонооксигеназ *alkB* при увеличении фактической деструкции углеводородов могло свидетельствовать, в том числе об использовании микроорганизмами-деструкторами альтернативных ферментов. Например, цитохромоксидазы CYP153-гидроксилазы, обычной для деструкторов алканов, у которых отсутствуют *alkB* (Хмелевцова и соавт., 2017).

Важнейшей особенностью биоэлектрохимической системы является формирование потока электронов на анод, выполняющий функцию искусственного акцептора электронов, и протонов на катод, что решает проблему регенерации окисленных форм внутриклеточных окислительно-восстановительных эквивалентов, задействованных в энергетическом метаболизме прокариот. В природных анаэробных микробиоценозах межвидовой перенос электронов расширяет жизненные возможности синтрофными связями членов сообществ (Ноженикова и соавт., 2020). Известно, что микробиоценозы анодных зон биоэлектрохимических систем способны к межклеточному переносу электронов, как контактному (непосредственному), через клеточные стенки или обладающие металлической электропроводимостью пили IV типа (Lovley et al., 2017), так и опосредованному различными

внеклеточными медиаторами (Prathiba et al., 2022). Связь биodeградации нефти в анаэробных или микроаэрофильных условиях, в переувлажненных почвах и донных осадках, с наличием неорганических акцепторов электронов, диспергированных в среде (Водяницкий и соавт., 2015), согласуется с концепцией формирующихся в биоэлектрохимических системах “биоэлектрохимических трубопроводов”, обеспечивающих межвидовой перенос электронов на большие расстояния, стимулируя энергетический метаболизм электрон-транспортного типа (Marzocchi et al., 2020). Повышенная активность бактериальных окислительно-восстановительных систем, связанных с деградацией углеводов, в условиях биоэлектрохимической стимуляции может быть связана с формированием в приближенной к аноду и расположенной в межэлектродном пространстве области пула восстановленных и окисленных микробных медиаторов, а также клеточных структур, передающих электроны на искусственный акцептор – анод.

Полученные данные об отсутствии прямой связи между уровнем представленности *alkB* и степенью биodeградации углеводов согласуются с результатами Paise et al. (2011), показавшими, что гены *alkB*, исходно присутствовавшие в микрофлоре донных отложений, их экспрессия и относительная копияность хотя и реагировали ростом на искусственное внесение поллютанта без использования биоэлектрохимических условий, не были связаны строго функционально с биodeградацией (Paise et al., 2011). Можно сделать вывод о том, что значительный вклад в наблюдающееся усиление деградации углеводов играют анаэробные пути разложения алканов, сопряженные на более поздних этапах с классической анаэробной трофической цепью углерода. Поскольку она предполагает вывод из системы избыточных восстановительных эквивалентов, в конечном итоге посредством метаногенеза с выделением в атмосферу метана и CO_2 , то роль внешней электрической цепи биоэлектрохимической системы, отводящей электроны, в случае углеводородного загрязнения – вторична, и основным фактором является наличие в иле электропроводящей матрицы, интенсифицирующей синтрофные взаимодействия (Zhuravleva et al., 2023).

Таким образом, экспериментально подтверждено увеличение деструкции углеводов нефти в условиях искусственно загрязненных анаэробных донных отложений при биоэлектрохимической стимуляции – наблюдалось увеличение деструкции до 57.9%. Хроматографический анализ остаточных углеводов, в частности, н-алканов $\text{C}_{14}\text{H}_{30}$ – $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$, показал разницу в соотношении гомологов с разными длинами цепей, при этом повышенная деструкционная активность, за счет биоэлектрохимической стимуляции, была связана с преимущественной убылью более легких

соединений. Обнаружено, что внесение в донные отложения н-гексадекана, в отличие от нафталина, увеличивало относительную представленность бактериальных алканомоноксигеназ *alkB*, однако в данных экспериментальных условиях биоэлектрохимическая стимуляция не оказывала значительного влияния, способного объяснить прирост деструкции. Предположено, что формирование в межэлектродном пространстве системы дальнего переноса электронов, выразившейся в протекании через внешнюю цепь стабильного электрического тока величиной около 80–100 мкА, могло оказывать влияние на работу цитохромных систем микроорганизмов-деструкторов, опосредующих начальные реакции окисления алканов. После исчерпания в системе кислорода и иных конечных акцепторов, присутствовавших там на начальных этапах эксперимента, на поверхности электропроводящего анода с развитой поверхностью могло происходить формирование синтрофных ассоциаций, имеющих преимущество в катаболической активности по сравнению с контролем, за счет возможности обмена электронами через прямой транспорт электронов на проводник и обратно (Zhuravleva et al., 2023). Известно, что классической анодной полуреакцией, обеспечивающей протекание тока во внешней цепи, является разложение органического субстрата и передача на анод электрона, с переносом на катод, а также образование протонов, диффундирующих к катоду, где с привлечением O_2 происходит образование воды. Внесение в донные отложения дополнительного источника углерода и энергии в виде нефти не сопровождалось ростом продуцируемого системой электричества, что видно из сравнения площадей под кривыми зависимости электрического тока от времени опыта и контроля. С учетом параллельного увеличения деградации можно сделать вывод, что выход электронов из бескислородной зоны мог происходить не только через внешнюю цепь биоэлектрохимической системы, но и альтернативными путями, например, за счет активизации передачи электронов между членами анаэробной трофической цепи углерода с образованием газообразных продуктов, покидающих систему: анаэробное окисление алканов с образованием алкилсукцинатов, высших жирных кислот и спиртов, последующие брожения с образованием бутирата, пропионата, ацетата, формиа и т.п., гомоацетогенез и синтрофное окисление ацетата, метаногенез с выделением метана и CO_2 (Mbadinga et al., 2011; Ножевникова и соавт., 2020).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00401, <https://rscf.ru/project/22-24-00401/>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хроматографические исследования выполнены в Центре коллективных исследований “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

Авторы благодарят проф. Э. В. Карасеву за любезное предоставление штамма *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д.

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

- Водяницкий Ю. Н., Трофимов С. Я., Шоба С. А. Влияние Fe (III) на биodeградацию нефти в переувлажненных почвах и осадках // Почвоведение. 2015. № 7. С. 877–886.
- Vodyanitskii Y. N., Trofimov S. Y., Shoba S. A. The influence of Fe (III) on oil biodegradation in excessively moistened soils and sediments // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 764–772.
- Ножевникова А. Н., Русскова Ю. И., Литти Ю. В., Паришина С. Н., Журавлева Е. А., Никитина А. А. Синтрофия и межвидовой перенос электронов в метаногенных микробных сообществах // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 131–151.
- Nozhevnikova A. N., Russkova Y. I., Litt Y. V., Parshina S. N., Zhuravleva E. A., Nikitina A. A. Syntrophy and interspecies electron transfer in methanogenic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 129–147.
- Самков А. А., Джимаков С. С., Барышев М. Г., Волченко Н. Н., Худокормов А. А., Самкова С. М., Карасева Э. В. Влияние изотопного состава воды на продукцию биомассы *Rhodococcus erythropolis* // Биофизика. 2015. Т. 60. С. 136–142.
- Samkov A. A., Dzhimak S. S., Barishev M. G., Volchenko N. N., Khudokormov A. A., Samkova S. M., Karaseva E. V. The effect of water isotopic composition on *Rhodococcus erythropolis* biomass production // Biophysics. 2015. V. 60. P. 107–112.
- Самков А. А., Чугунова Ю. А., Круглова М. Н., Моисеева Е. В., Волченко Н. Н., Худокормов А. А., Самкова С. М., Карасева Э. В. Обесцвечивание красителей в биоэлектротехнической системе при иммобилизации клеткок *Shewanella oneidensis* MR-1 на поверхности анода и электрической стимуляции внешней цепи // Прикл. биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. С. 191–199.
- Samkov A. A., Chugunova Yu. A., Kruglova M. N., Moiseeva E. V., Volchenko N. N., Khudokormov A. A., Samkova S. M., Karaseva E. V. Decolorization of dyes in a bioelectrochemical system depending on the immobilization of *Shewanella oneidensis* MR-1 cells on the anode surface and electrical stimulation of an external circuit // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. P. 198–205.
- Соляникова И. П., Головлёва Л. А. Гексадекан и бактерии-деструкторы: механизмы взаимодействия // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 19–31.
- Solyanikova I. P., Golovleva L. A. Hexadecane and hexadecane-degrading bacteria: mechanisms of interaction // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 15–26.
- Турова Т. П., Соколова Д. Ш., Семенова Е. М., Полтараус А. Б., Назина Т. Н. Разнообразие генов биодеградации n-алканов *AlkB* у термофильных углеводородокисляющих бактерий родов *Geobacillus*, *Parageobacillus* и *Aeribacillus* // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 225–232.
- Tourova T. P., Sokolova D. Sh., Semenova E. M., Poltarau A. B., Nazina T. N. Diversity of the *AlkB* genes of n-alkane biodegradation in thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the *Geobacillus*, *Parageobacillus*, and *Aeribacillus* // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 301–307.
- Хмелевцова Л. Е., Сазыкин И. С., Сазыкина М. А., Селиверстова Е. Ю. Цитохромы P450 прокариот (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 363–372.
- Khmelevtsova L. E., Sazykin I. S., Sazykina M. A., Seliverstova E. Y. Prokaryotic cytochromes P450 (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 401–409.
- Bose S., Hochell M. F. Jr., Gorby Y. A., Kennedy D. W., McCready D. E., Madden A. S., Lower B. H. Bioreduction of hematite nanoparticles by the dissimilatory iron reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1 // Geochim. Cosmochim. Acta 2009. V. 73. I. 4. P. 962–976.
- Bukliarevich H. A., Gurinovich A. S., Filonov A. E., Titok M. A. Molecular genetic and functional analysis of the genes encoding alkane 1-monoxygenase synthesis in members of the genus *Rhodococcus* // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 242–255.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments // Clin. Chem. 2009. V. 55. P. 611–622.
- Cabrera J., Irfan M., Dai Y., Zhang P., Zong Y., Liu X. Bioelectrochemical system as an innovative technology for treatment of produced water from oil and gas industry – a review // Chemosphere. 2021. V. 285. Art. 131428.
- Chandrasekhar K., Venkata Mohan S. Bio-electrochemical remediation of real field petroleum sludge as an electron donor with simultaneous power generation facilitates biotransformation of PAH: effect of substrate concentration // Bioresour. Technol. 2012. V. 110. P. 517–525.

- Idris M. O., Kim H.-C., Yaqoob A. A., Ibrahim M. N. M.* Exploring the effectiveness of microbial fuel cell for the degradation of organic pollutants coupled with bio-energy generation // *Sustain. Energy Technol. Assess.* 2022. V. 52. Art. 102183.
- Kondaveeti S., Govindarajan D., Mohanakrishna G., Thatikayala D., Abu-Reesh I.M., Min B., Nambi I. M., Al-Raoush R.I., Aminabhavi T. M.* Sustainable bioelectrochemical systems for bioenergy generation via waste treatment from petroleum industries // *Fuel.* 2023. V. 331. Art. 125632.
- Lan J., Wen F., Ren Y., Liu G., Jiang Y., Wang Z., Zhu X.* An overview of bioelectrokinetic and bioelectrochemical remediation of petroleum-contaminated soils // *Environ. Sci. Technol.* 2023. V. 16. Art. 100278.
- Li W.-W., Yu H.-Q.* Stimulating sediment bioremediation with benthic microbial fuel cells // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1–12.
- Liang R., Davidova I. A., Teske A., Sufliata J. M.* Evidence for the anaerobic biodegradation of higher molecular weight hydrocarbons in the Guaymas Basin // *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2023. V. 181. Art. 105621.
- Lovley D. R.* Electrically conductive pili – biological function and potential applications in electronics // *Curr. Opin. Electrochem.* 2017. V. 4. P. 190–198.
- Marzocchi U., Palma E., Rossetti S., Aulenta F., Scoma A.* Parallel artificial and biological electric circuits power petroleum decontamination – the case of snorkel and cable bacteria // *Water Res.* 2020. V. 173. Art. 115520.
- Mbadinga S. M., Wang L.-Y., Zhou L., Liu J.-F., Gu J.-D., Mu B.-Z.* Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes // *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2011. V. 65. P. 1–13.
- Mohanakrishna G., Al-Raoush R.I., Abu-Reesh I. M.* Sewage enhanced bioelectrochemical degradation of petroleum hydrocarbons in soil environment through bioelectro-stimulation // *Biotechnol. Rep.* 2020. V. 27. Art. e00478.
- Paisse S., Duran R., Coulon F., Goni-Urriza M.* Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments? // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 92. P. 835–844.
- Powell S. M., Ferguson S. H., Bowman J. P., Snape I.* Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in antarctic soil during bioremediation // *Microb. Ecol.* 2006. V. 52. P. 523–532.
- Prathiba S., Kumar P. S., Vo D.-V.N.* Recent advancements in microbial fuel cells: a review on its electron transfer mechanisms, microbial community, types of substrates and design for bio-electrochemical treatment // *Chemosphere.* 2022. V. 286. Art. 131856.
- Shvets D., Vinogradova S.* Occurrence and genetic characterization of grapevine Pinot Gris virus in Russia // *Plants.* 2022. V. 11. Art. 1061. P. 1–15.
- Tao L., Song M., Jiang G.* Enhanced depolluting capabilities of microbial bioelectrochemical systems by synthetic biology // *Synth. Syst. Biotechnol.* 2023. V. 8. P. 341–348.
- Taylor S., Wakem M., Dijkman G., Alsarraj M., Nguyen M.* A practical approach to RT-qPCR – publishing data that conform to the MIQE guidelines // *Methods.* 2010. V. 50. P. S1–S5.
- Tucci M., Viggì C. C., Núñez A. E., Schievano A., Rabaey K., Aulenta F.* Empowering electroactive microorganisms for soil remediation – challenges in the bioelectrochemical removal of petroleum hydrocarbons // *Chem. Eng. J.* 2021. V. 419. Art. 130008.
- Venkidasamy K., Megharaj M., Marzorati M., Lockington R., Naidu R.* Enhanced removal of petroleum hydrocarbons using a bioelectrochemical remediation system with pre-cultured anodes // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 539. P. 61–69.
- Voelikova T. A., Emel'yanova L.K., Novikova L. M., Shakulov R. S., Sidoruk K. V., Smirnov I. A., Il'in V.K., Soldatov P. E., Tyurin-Kuz'min A. Yu., Smolenskaya T. S., Debabov V. G.* Intensification of bioelectricity generation in microbial fuel cells using *Shewanella oneidensis* MR-1 mutants with increased reducing activity // *Microbiology (Moscow).* 2013. V. 82. P. 410–414.
- Wang H., Lu L., Mao D., Huang Z., Cui Y., Jin S., Zuo Y., Ren Z. J.* Dominance of electroactive microbiomes in bioelectrochemical remediation of hydrocarbon-contaminated soils with different textures // *Chemosphere.* 2019a. V. 235. P. 776–784.
- Wang H., Xing L., Zhang H., Gui C., Jin S., Lin H., Li Q., Cheng C.* Key factors to enhance soil remediation by bioelectrochemical systems (BESs): a review // *Chem. Eng. J.* 2021. V. 419. Art. 129600.
- Wang X., Wan G., Shi L., Gao X., Zhang X., Li X., Zhao J., Sha B., Huang Z.* Direct micro-electric stimulation alters phenanthrene-degrading metabolic activities of *Pseudomonas* sp. strain DGYH-12 in modified bioelectrochemical system // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019b. P. 31449–31462.
- Wasmund K., Burns K. A., Kurtböke D. I., Bourne D. G.* Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 7391–7398.
- Yuan J. S., Reed A., Chen F., Stewart Jr C. N.* Statistical analysis of real-time PCR data // *BMC Bioinform.* 2006. V. 7. Art. 85.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
- Zhuravleva E., Kovalev A., Kovalev D., Kotova I., Shekhurdina S., Laikova A., Krasnovsky A., Pygamov T., Vivekanand V., Li L., He C., Littl Y.* Does carbon cloth really improve thermophilic anaerobic digestion performance on a larger scale? Focusing on statistical analysis and microbial community dynamics // *J. Environ. Manage.* 2023. V. 341. Art. 118124.

Biodegradation of *n*-Alkanes in Oil-Contaminated Bottom Sediments under Bioelectrochemical Stimulation

A. A. Samkov^{1,*}, N. N. Volchenko¹, T. N. Musorina¹, M. N. Kruglova¹, S. M. Samkova¹,
and A. A. Khudokormov¹

¹Kuban State University, Krasnodar, 350040 Russia

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Received September 1, 2023; revised October 20, 2023; accepted October 28, 2023

Abstract—Degradation of oil hydrocarbons artificially introduced into bottom sediments in a bioelectrochemical system of a membrane-free (silt) type was studied. Passive bioelectrochemical stimulation by means of electrodes connected by an external circuit with a resistance of 1 k Ω , with an average electric current of $\sim 85 \mu\text{A}$ was found to cause an increase in degradation during two months from 23.0 to 57.9%. Contamination of bottom sediments with oil (1.32 g/kg) slightly decreased the current in the external circuit of the bioelectrochemical system. The relationship was revealed between the degree of oil degradation and predominant utilization of the lighter *n*-alkanes in the C₁₄H₃₀–C₃₀H₆₂ series, compared with both the original oil and the residual hydrocarbons of the control. An increase in the representation of the *alkB* alkane monooxygenase genes relative to the 16S rRNA gene in the total DNA isolated from the sediments was induced by the introduction of hexadecane, both in the case of electrochemical stimulation and in the control. The results may be of interest for the development of new methods of bioelectrochemical removal of organic pollutants from anaerobic environments.

Keywords: bioelectrochemical system, microbial fuel cell, bioelectrocatalysis, bottom sediments, alkanes, biodegradation, alkane monooxygenase, *alkB*, oil, bioremediation

ИСТОЧНИК ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В ХОЛОДНЫХ ОСАДКАХ ОЗЕРА БАЙКАЛ – ГИДРОТЕРМЫ НА ПОБЕРЕЖЬЕ ОЗЕРА ИЛИ ГЛУБИННЫЕ ФЛЮИДЫ?

© 2024 г. О. Н. Павлова^{а, *}, С. М. Черницына^а, С. В. Букин^а, А. В. Ломакина^а,
О. В. Шубенкова^а, Д. К. Смирнова^а, Т. И. Земская^а

^аЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

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

Поступила в редакцию 11.10.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 08.11.2023 г.

Рассмотрены возможные источники появления термофильных бактерий в холодных осадках озера Байкал. Для этого проведен сравнительный анализ таксономической принадлежности выявленных термофильных микроорганизмов в 4-х наземных горячих источниках, расположенных на побережье оз. Байкал и в донных осадках, ассоциированных с разгрузкой углеводородов. Исследования показали, что как в горячих источниках, так и в донных осадках обнаруживаются последовательности термофильных микроорганизмов, имеющих одинаковую таксономическую принадлежность. Определенные виды микроорганизмов встречались только в образцах из гидротерм, либо только в образцах из донных отложений. Источником термофильных микроорганизмов в донных осадках, вероятно всего, являются газонасыщенные флюиды, поступающие из зоны генерации углеводородов с глубины ~4–6 км.

Ключевые слова: оз. Байкал, термофилы, микробное разнообразие, горячие источники, Котельниковский, Хакусский, Давшинский, Змеиный

DOI: 10.31857/S0026365624030079

Термофильные микроорганизмы — прокариоты, способные существовать и развиваться при температуре выше 50°C. Ранее, термофильные бактерии были обнаружены в холодных осадках оз. Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводородов (Ханаева и соавт., 2017; Павлова и соавт., 2019). Из накопительных культур, содержащих донные осадки из метанового сипа, были получены чистые культуры анаэробных микроорганизмов, оптимальная температура роста которых составляет 60°C (Pavlova et al., 2023). В Мировом океане обнаружение в поверхностных донных осадках некультивируемых групп микроорганизмов, называемых микробной “темной материей” (Jiao et al., 2021), и эндоспор термофильных микроорганизмов обусловлено их поступлением вместе с потоками углеводородсодержащих флюидов из глубинной биосферы (Chakraborty et al., 2020; Gittins et al., 2022). Озеро Байкал, расположенное в зоне активного рифта, характеризуется разгрузкой минерализованных газосодержащих флюидов, естественными выходами нефти и залежами газовых гидратов (Конторович и соавт., 2007; Khlystov et al., 2022). Выходы углеводородов

приурочены к разрывным нарушениям, имеющим глубокие корни, активность которых во многом связана с сейсмической активностью байкальской впадины и, как правило, в них регистрируются повышенные тепловые потоки (Khlystov et al., 2013).

Нами было высказано две гипотезы появления термофильных прокариот в холодных осадках оз. Байкал. Первая — поступление микроорганизмов с минерализованными газонасыщенными флюидами из зоны генерации углеводородов, аналогично морским осадкам; вторая — поступление из термальных источников, расположенных на побережье оз. Байкал, последующее их распределение с помощью сложной системы градиентно-конвективных течений в водной толще и захоронение в поверхностных донных отложениях. Для подтверждения одной из гипотез нами был проведен сравнительный анализ таксономической принадлежности выявленных термофильных микроорганизмов в наземных горячих источниках (Котельниковский, Хакусский, Давшинский, Змеиный), расположенных на побережье оз. Байкал,

и донных осадков, ассоциированных с разгрузкой углеводородов.

Пробы воды были отобраны в гидротермах в 2020 году. Котельниковский источник — единственный установленный выход горячих вод на западном побережье оз. Байкал (Борисенко, Замана, 1978). Пробы отобраны в самом источнике с температурой 82°C (Kot_1), в естественном пруду (59°C, Kot_2) и в месте впадения источника в оз. Байкал (32°C, Kot_3). Давшинский источник (37.5°C) находится в устье р. Давши, на территории Баргузинского заповедника. Пробы отобраны в источнике (D_1) и устье (D_2). Хакусский источник расположен в бухте Хакусы на северо-восточном побережье оз. Байкал, в 210 м от его берега. Пробы отобраны в двух источниках с различной температурой: Kh_1 (44.8°C) и Kh_2 (24°C). Змеиный источник находится на полуострове Святой нос на западном берегу Чивыркуйского залива, в бухте Змеиной, в 10–15 м от уреза воды (Борисенко, Замана, 1978). Два выхода термальных вод каптированы деревянными срубками (ваннами). Пробы отобраны в большой ванне (42.6°C, Zm_1), малой ванне (39°C, Zm_2) и устье источника Змеиный (18.8°C, Zm_3). Полученные образцы воды (5 л) фильтровали и транспортировали в лабораторию согласно (Chernitsyna et al., 2023). Состав микробных сообществ определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования вариабельных участков V2–V3 гена 16S рРНК. Выделение ДНК, набор праймеров, амплификацию, секвенирование, анализ фрагментов гена 16S рРНК, кластеризацию последовательностей в оперативные таксономические единицы (ОТЕ), удаление химерных последовательностей и таксономическую идентификацию ОТЕ проводили в соответствии с (Chernitsyna et al., 2023). Таксономия дана по базе данных SILVA 138.1. Полученные нуклеотидные последовательности доступны через BioProject PRJNA801752: SAMN25378416, SAMN25378417, SAMN25378418. Для сравнения разнообразия сообществ горячих источников на уровне филума и рода построены пузырьковые диаграммы для таксономических единиц с относительной численностью $\geq 1\%$ с использованием программных пакетов *ggplot2* и *reshape2* для языка R (R Core Team, 2022 г.) в среде Rstudio (<https://www.R-project.org/>). Для сравнения разнообразия термофильных микроорганизмов в донных отложениях (ДО) оз. Байкал и горячих источников использованы результаты секвенирования донных отложений, ассоциированных с разгрузкой углеводородов (38 образцов). ДО были отобраны в 2020–2022 гг. с глубины 0–30 и 50–200 см из нефтяных сипов (н/с) Горевой Утес (GU) и Большая Зеленовская (BZ), грязевых вулканов (г/в) Кукуй (КУ), Кедр (KR) и Маленький (М). В качестве фоновых — станции в Южном Байкале п. Листвянка (L) и Северный Байкал (NB). Библиотеки анализировали с использованием стандартного набора

Иllumina MiSeq v.3 (Illumina) в ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ. Сравнительный анализ таксономического разнообразия выявленных термофильных микроорганизмов в ГИ и ДО оз. Байкал выполнен на основе построения матрицы дистанций Брея–Кертиса и представлен в виде тепловой карты с использованием программных пакетов *cluster*, *vegan* и *heatmap* для языка R в среде Rstudio. Все ресурсоемкие операции были выполнены с использованием высокопроизводительного кластера “Академик В. М. Матросов” Центра коллективного пользования “Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН”.

Филогенетическое разнообразие прокариот в горячих источниках. Во всех микробных сообществах абсолютное большинство микроорганизмов составляли бактерии. Неклассифицируемые представители домена *Archaea* выявлены в изливах источников Давшинский и Хакусский, где их доля не превышала 0.02%. Микробное сообщество источника Давшинский представлено одним доминирующим филумом — *Proteobacteria* (98.5% всех последовательностей генов 16S рРНК), в котором более 95% последовательностей принадлежали хемолитотрофным сера/сульфид/тиосульфат-окисляющим бактериям рода *Thiovirga* (рис. 1).

Представители филумов *Candidatus Patescibacteria*, *Nitrospirota*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Deinococcota* и *Bacteroidota* составляли менее 1%. В изливе источника Котельниковский (Kot_1) основную часть микробного сообщества составляли *Deinococcota* — 53.2%, *Aquificota* — 26.2%, *Proteobacteria* — 9.1%, не классифицируемые *Bacteria* — 6.4%, *Firmicutes* — 1.7% и *Cyanobacteria* — 1.4%. Филумы *Deinococcota* и *Aquificota* представлены ОТЕ, принадлежащим родам *Thermus* и *Hydrogenobacter* соответственно. К минорным компонентам микробного сообщества относились представители филума *Desulfobacterota* (р. *Caldimicrobium* — факультативно литоавтотрофные, анаэробные бактерии с оптимальным ростом 75°C), *Ca. Acetithermota* и *Armatimonadota* (Oren, Goker, 2023). В микробном сообществе Kot_2, в сравнении с изливом источника, увеличилась доля представителей рода *Hydrogenobacter* (50%) и уменьшилась рода *Thermus* (28%). Термофильные и гипертермофильные бактерии, обнаруживаемые в геотермальных системах, нефтяных резервуарах, анаэробных реакторах и очистных сооружениях, относящиеся к родам *Fervidobacterium* (*Thermotogota*), *Caldisericum* (*Caldisericotota*), JS1_ge (в н.в. *Atribacterota*) (Oren, Garrity, 2021), находились в числе минорных представителей. В месте впадения источника Котельниковский в оз. Байкал (Kot_3) увеличивается доля *Proteobacteria* (57%) и *Firmicutes* (4.8%). В сообществе Kot_3 выявлены ОТЕ, отнесенные к *Bacteroidota* (28.2%), *Campylobacterota* (4%), *Fusobacteriota* (3%)

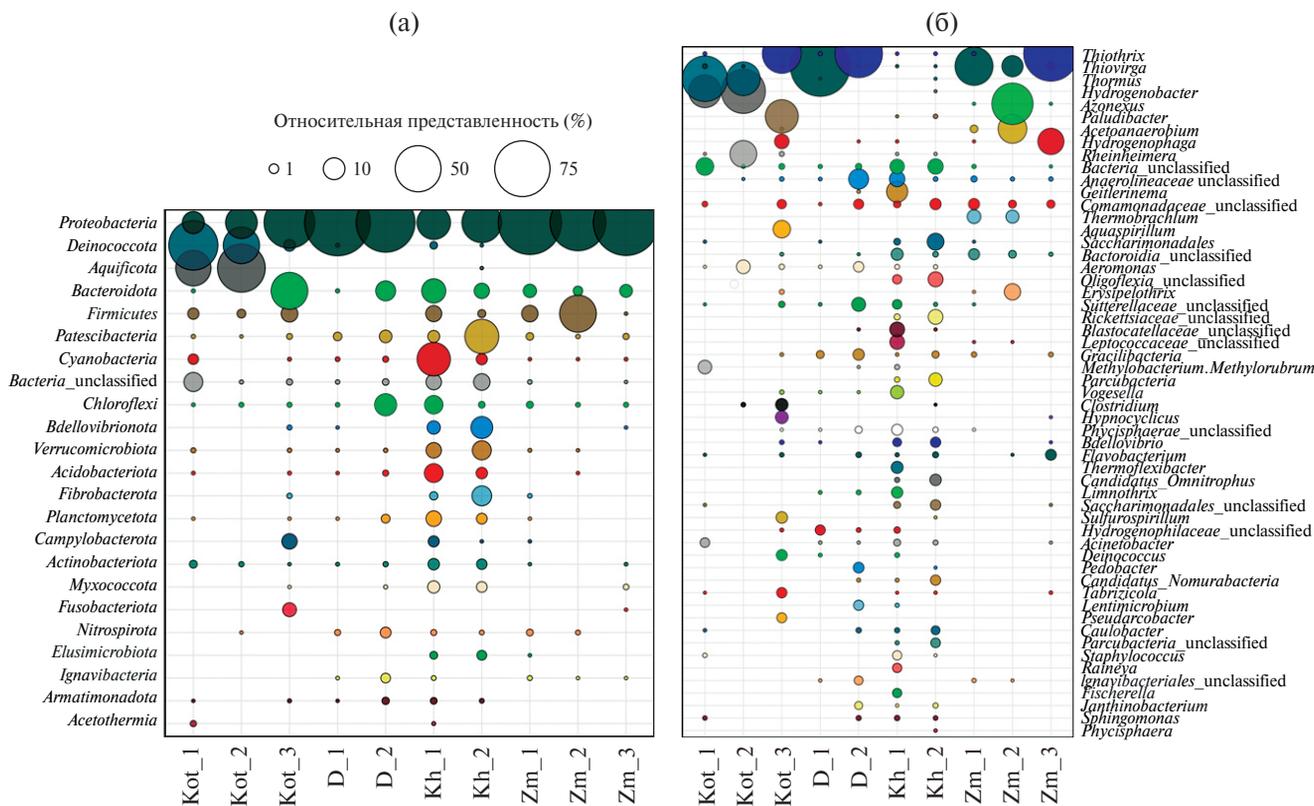


Рис. 1. Относительная доля последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий, представленных на уровне филумов (а) и родов (б) в библиотеках из горячих источников. Перечислены таксоны, составляющие >1% в каждой библиотеке. Для сравнения приведены данные по составу микробных сообществ горячего источника Змеиный (Chernitsyna et al., 2023).

и *Deinococcota* (2%). Менее 1% составляли последовательности представителей *Ca. Patescibacteria*, *Fibrobacterota*, *Bdellovibrionota* и *Chloroflexi*.

Последовательности микроорганизмов, составляющие более 1%, выявлены в 13 высших таксонах домена *Bacteria* (*Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidota*, *Acidobacteriota*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Bdellovibrionota*, *Muxococcota*, *Ca. Patescibacteria*, *Actinobacteriota*, *Campylobacterota*) в составе микробного сообщества источника Хакусский с температурой 44.8°C (Kh_1). Представители *Spirochaetota*, *Desulfobacterota*, *Armatimonadota*, *Ca. Dependientiae*, GAL15 составляли менее 1%. В микробном сообществе Kh_2 доминировали представители пяти филумов: *Proteobacteria* (33.7%), *Ca. Patescibacteria* (24%), *Bdellovibrionota* (8.8%), *Fibrobacterota* (7%), *Verrucomicrobiota* (6.5%). Не классифицируемые *Bacteria*, *Bacteroidota*, *Acidobacteriota*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetota*, *Muxococcota*, *Actinobacteriota*, *Elusimicrobiota* составляли 1.2–4.6%. Представленность *Ca. Dependientiae*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadota*, *Armatimonadota*, *Desulfobacterota*, *Ca. PAUC34f*, *Ca. SAR324_clade* (Marine_group_B), *Ca. WPS-2*, *Spirochaetota* была менее 1%.

Микробное сообщество источника Змеиный (Zm_1–Zm_3), так же как и источника Давшинский, характеризовалось невысоким разнообразием на уровне филумов, где 91% последовательностей генов 16S рРНК принадлежало филуму *Proteobacteria*. Представители филумов *Bacteroidota* и *Firmicutes* составляли 2.6–4.6%. В минорном количестве (менее 1%) выявлены представители филумов *Desulfobacterota*, *Spirochaetota*, *Synergistota*, *Ca. Caldatribacteriota* (*Atribacterota*), *Hydrogenedentes*, Sva0485, TA06, WS2 (Chernitsyna et al., 2023).

Таким образом, представители филумов *Proteobacteria*, *Ca. Patescibacteria* и *Chloroflexi* обнаружены в сообществах всех источников. Представители филума *Aquificota* и *Deinococcota* в значительном количестве детектированы только в источнике и пруде Котельниковский. За исключением источника Котельниковский, микробные сообщества исследованных горячих источников представлены в основном мезофильными микроорганизмами, где основная доля принадлежит бактериям родов *Thiiothrix*, *Thiovirga*, *Paludibacter*, *Azonexsus*, *Acetoanaerobium*, *Hydrogenophaga* и др. (рис. 1б).

Сравнительный анализ таксономического разнообразия термофильных микроорганизмов

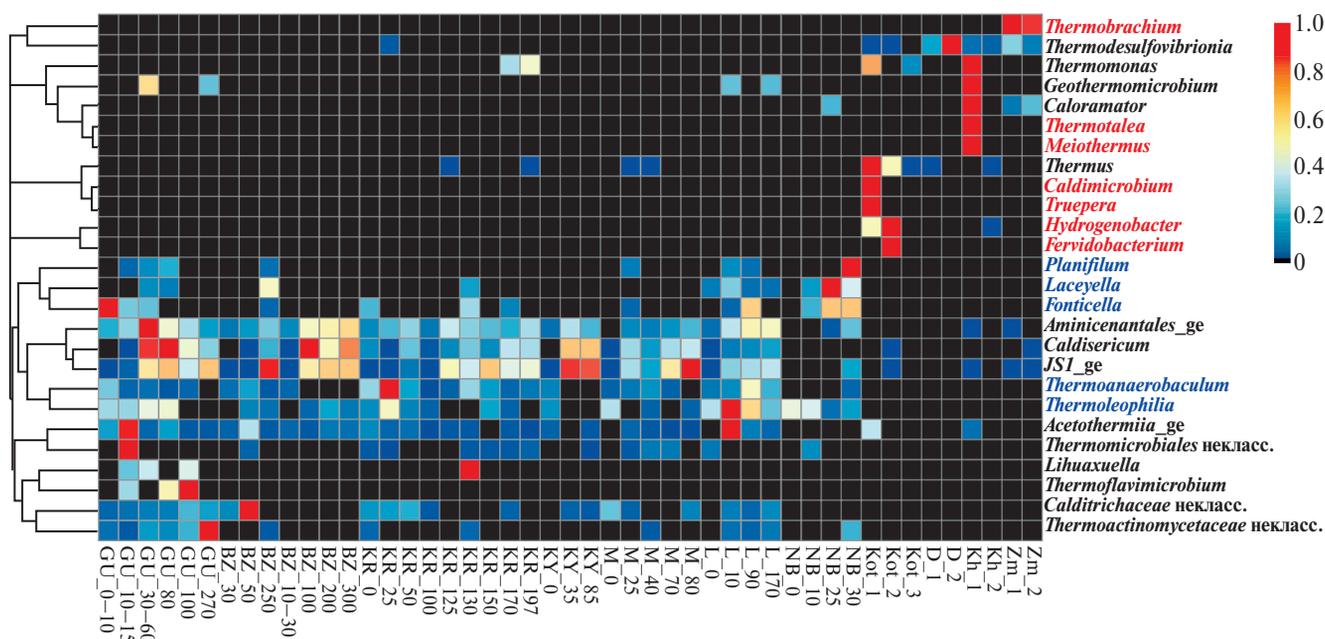


Рис. 2. Тепловая карта (heat map) распределения последовательностей термофильных бактерий на уровне рода в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК микробных сообществ воды горячих источников и донных осадков оз. Байкал. Данные об относительной численности ОТЕ нормализованы путем унификации с нулевым минимумом [(x-min)/range]. Последовательности, обнаруженные только в горячих источниках, выделены красным цветом; только в донных осадках — синим; и в донных осадках, и в горячих источниках — черным.

в горячих источниках и донных осадках оз. Байкал.

В горячих источниках обнаружены последовательности бактерий, способных к росту при температуре $\geq 50^\circ\text{C}$, отнесенных к роду *Hydrogenobacter*¹, *Caldimicrobium*, *Fervidobacterium*, *Truepera*, *Thermotalea*, *Thermobrachium*, *Meiothermus*, *Thermus*, *Caldisericum*, *Thermomonas*, *Geothermomicrobium*, *Caloramator*, *JS1_ge* (*Atribacterota*), *Acetothermia_ge* (*Ca. Acetithermota*), *Aminicenantales_ge* (*Ca. Aminicenantota*) и некласс. *Thermodesulfovibrionia*. Доля *Hydrogenobacter*, *Thermus* составляла 0.008–53.1%, *Thermobrachium* — 3.2–3.6%, некласс. *Thermodesulfovibrionia* — 0.003–1.48%. Доля каждой из остальных бактерий не превышала 1%.

В сообществах ДО выявлено большее разнообразие микроорганизмов, способных к росту в термофильных условиях, чем в ГИ (рис. 2). В числе доминирующих выявлены ОТЕ, принадлежащие *Aminicenantales_ge*, *JS1_ge* и р. *Caldisericum*. В числе минорных — последовательности бактерий родов *Thermoanaerobaculum*, *Thermoleophilia*, *Laceyella*, *Lihuaxuella*, *Planifilum*, *Thermoflavimicrobium*, *Fonticella* и некласс. *Calditrichaceae*, *Thermoactinomycetaceae* и *Thermomicrobiales* (рис. 2). Представители *JS1_ge* (*Atribacterota*) составляли от 0.03 до 1% в поверхностных донных осадках и до 46% в глубинных, во всех исследуемых образцах, ассоциированных

с разгрузкой углеводородов. Доля последовательностей, отнесенных к *Aminicenantales_ge*, варьировала от 0 до 5% в поверхностных осадках, и до 15% — в глубинных. Наибольшее число ОТЕ, отнесенных к *Aminicenantales_ge* выявлено в образцах из нефте-метановых сипов Горевой Утеc (GU) и Большая Зеленая (BZ). Последовательности *Atribacterota* и *Ca. Aminicenantota* наиболее часто выявляются в биотопах, обогащенных углеводородами — в геотермальных системах, нефтяных резервуарах, анаэробных морских отложениях и метановых сипах (Liu et al., 2019). Представители этих филумов доминировали в микробиоме осадков Мексиканского залива, ассоциированных с непрерывным адвективным переносом термогенных алкановых газов (Chakraborty et al., 2020). Представители рода *Caldisericum*, обнаруживаемые чаще всего в горячих источниках (Mori, 2018), в основном были выявлены в глубинных осадках нефте-метановых сипов GU и BZ, а также в г/в Кукуй (KY). Последовательности бактерий, выявленные только в сообществе донных осадков, отнесенные к филуму *Firmicutes* (некласс. *Thermoactinomycetaceae*, *Laceyella*, *Lihuaxuella*, *Planifilum*, *Thermoflavimicrobium*, *Fonticella*) преобладали в глубинных слоях осадков г/в Кедр (KR) и г/в Маленький (M).

Необходимо отметить обнаружение последовательностей термофильных бактерий в донных осадках “фоновых” районов, напрямую не связанных с разгрузкой углеводородов. В этих районах

¹ Подчеркнуты рода бактерий, обнаруженные только в бактериальных сообществах горячих источников; жирным шрифтом обозначены таксоны, обнаруженные только в бактериальных сообществах донных осадков

предполагается влияние газосодержащих флюидов из донных отложений во время землетрясений (Cabello-Yeves et al., 2020), что может быть обусловлено значительным количеством близкорасположенных гидратоносных структур в донных осадках озера Байкал. Отсутствие проведенных сейсмических исследований и измерений тепловых потоков в данных районах не позволяет достоверно подтвердить данную гипотезу.

Проведенные исследования показали, что как в горячих источниках, так и в донных осадках обнаруживаются последовательности термофильных микроорганизмов, имеющих одинаковую таксономическую принадлежность. Вместе с тем, большинство таксонов микроорганизмов встречались только в образцах из ГИ, либо только в образцах из ДО, что позволяет предположить разные источники поступления. Структура последовательностей в библиотеках генов 16S рРНК из горячих источников не была идентичной таковой из библиотек этого гена из донных осадков, водной толщи Байкала и горячих источников, расположенных на территории Байкальской рифтовой зоны (Алла, Кучигер, Умхей, Гарга), что выражается в формировании отдельных ветвей на филогенетическом дереве (данные не приведены).

Гидротермы БРЗ формируются из метеогенных вод, которые по субвертикальным разломам горного обрамления Байкала опускаются на глубину 4–6 км (средняя глубина формирования гидротерм БРЗ), далее смещаются в сторону региональной дрены (в сторону озера) и затем, восходя по разломам на его дне и берегах, разгружаются (Ломоносов, 1974; Плюснин и соавт., 2013). Нагреваясь под хребтами в поле регионального теплового потока, эти воды разгружаются через днища рифтовых впадин уже в качестве термальных. Совершая конвекционный цикл, воды приходят в контакт, в химическое и тепловое равновесие с окружающими нагретыми породами кристаллического фундамента и нагреваются сами, насыщаясь различными химическими соединениями (Ломоносов, 1974). И вероятно, при вступлении в контакт с окружающими нагретыми породами кристаллического фундамента, поднимающиеся воды обогащаются не только различными химическими соединениями и газами (метан, азот), но и микроорганизмами другой биосферы – глубинной. Имеющие единое происхождение глубинные термальные воды, после излива на поверхность земли в различных географических точках Прибайкалья, могут претерпевать изменения в зависимости от геохимических факторов, сложившихся на определенной территории, формируя, тем самым, наземные гидротермы, различные по химическому составу и составу микробных сообществ.

Основываясь на существующей схеме градиентно-конвективных течений в водной толще

(Верболов, 1996), микроорганизмы, обнаруживаемые в ГИ, расположенных на побережье оз. Байкал, могут попадать с их стоками в водную толщу и распространяться по акватории озера на длительные расстояния. Низкая температура *in situ* воды и ДО озера Байкал не может обеспечить рост и развитие термофильных прокариот. В ГИ выявлены в основном аспорогенные микроорганизмы, которые погибают, попадая в воду оз. Байкал, либо даже не поступают в нее, так как не обнаруживаются в местах впадения источников в озеро. Выявление представителей некоторых родов спорообразующих термофильных представителей филума *Firmicutes* только в донных осадках может свидетельствовать о том, что они привнесены не со стоками из ГИ, а с флюидами из глубинных донных осадков. Полученные в чистую культуру изоляты, образующие споры и отнесенные к роду *Thermaerobacter*, обладали нехарактерным для типовых видов метаболизмом (Pavlova et al., 2023). Новые свойства закреплены в геноме и позволяют осуществлять хемолитотрофный рост в глубинных донных осадках, используя неорганические доноры и акцепторы электронов, поступающие с глубинными минерализованными флюидами. К такой экологической специализации микроорганизмов могли привести геологические особенности озера Байкал, но не условия, создаваемые в горячих источниках. О поступлении флюидов с глубины более 300 м свидетельствует также нахождение в голоценовых осадках диатомей плиоценового возраста (Клерк и соавт., 2003). Вероятнее всего, в донных осадках оз. Байкал, действует механизм, описанный для Мирового океана, где спорообразующие микроорганизмы глубинной биосферы выносятся на поверхность вместе с потоками газонасыщенных флюидов, пассивно разносятся течениями (Chakraborty et al., 2020) и оседают в донных отложениях, где сохраняются в течение многих лет и постепенно захораниваются. При благоприятных температурных условиях, которые формируются в глубоких донных отложениях, микроорганизмы прорастают на подходящих субстратах, завершая геологическую микробную петлю жизнеспособных клеток, циркулирующих из глубинной биосферы и обратно в нее (Gittins et al., 2022).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Борисенко И. М., Замана Л. В. Минеральные воды Бурятской АССР. Улан-Удэ: Бурятское книгоиздательство, 1978. 162 с.

Верболов В. И. Течения и водообмен в Байкале // Водные ресурсы. 1996. Т. 23. С. 413–423.

Клеркс Я., Земская Т. И., Матвеева Т. В., Хлыстов О. М., Намсараев Б. Б., Дагурова О. П., Голобокова Л. П., Воробьева С. С., Погодаева Т. П., Гранин Н. Г., Калмычков Г. В., Пономарчук В. А., Шоджи Х., Мазуренко Л. Л., Каулио В. В., Соловьев В. А., Грачев М. А. Гидраты метана в поверхностном слое глубоководных осадков озера Байкал // ДАН. 2003. Т. 393. С. 822–826.

Конторович А. Э., Каширцев В. А., Москвин В. И., Бурштейн Л. М., Земская Т. И., Калмычков Г. В., Костырева Е. А., Хлыстов О. М. Нефтегазоносность отложений оз. Байкал // Геология и геофизика. 2007. Т. 48. С. 1346–1356.

Kontorovich A. E., Kashirtsev V. A., Moskvina V. I., Burshtein L. M., Zemskaya T. I., Kostyreva E. A., Kalmychikov G. V., Khlystov O. M. Petroleum potential of Baikal deposits // Russ. Geol. Geophys. 2007. V. 48. P. 1046–1053.

Ломоносов И. С. Геохимия и формирование современных гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Наука, 1974. 166 с.

Павлова О. Н., Ломакина А. В., Новикова А. С., Черницына С. М., Ханаева Т. А., Погодаева Т. В., Хабеев А. В., Земская Т. И. Термофильные бактерии в донных осадках озера Байкал, ассоциированных с разгрузкой углеводородов // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 358–366.

Pavlova O. N., Lomakina A. V., Novikova A. S., Chernitsyna S. M., Khanaeva T. A., Pogodaeva T. V., Khabuev A. V., Zemskaya T. I. Thermophilic bacteria in Lake Baikal bottom sediments associated with hydrocarbon discharge // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 335–342.

Плюснин А. М., Замана Л. В., Шварцев С. Л., Токаренко О. Г., Чернявский М. К. Гидрогеохимические особенности состава азотных терм Байкальской рифтовой зоны // Геология и геофизика. 2013. Т. 54. С. 647–664.

Plyusnin A. M., Zamana L. V., Shvartsev S. L., Tokarenko O. G., Chernyavskii M. K. Hydrogeochemical peculiarities of the composition of nitric thermal waters in the Baikal rift zone // Russ. Geol. Geophys. 2013. V. 54. P. 495–508.

Ханаева Т. А., Павлова О. Н., Черницына С. М., Халызов И. А., Хабеев А. В., Никонова А. А., Новикова А. С., Земская Т. И. Термофильная факультативно анаэробная бактерия р. *Geobacillus* из донных осадков озера Байкал // Acta Biologica Sibirica. 2017. Т. 3. С. 39–46.

Cabello-Yeves P. J., Zemskaya T. I., Zakharenko A. S., Sankirko M. V., Ivanov V. G., Ghai R., Rodriguez-Valera

F. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat // Limnol. Oceanogr. 2020. V. 65. P. 1471–1488.

Chakraborty A., Ruff S. E., Dong X., Ellefson E. D., Li C., Brooks J. M., McBee J., Bernard B. B., Hubert C. R. J. Hydrocarbon seepage in the deep seabed links subsurface and seafloor biospheres // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. P. 11029–11037.

Chernitsyna S., Elovskaya I., Pogodaeva T., Bukin S., Zakharenko A., Zemskaya T. Bacterial communities in a gradient of abiotic factors near a sulfide thermal spring in Northern Baikal // Diversity. 2023. V. 15. Art. 298. P. 1–15.

Gittins D. A., Desiage P. A., Morrison N., Rattray J. E., Bhatnagar S., Chakraborty A., Zorz J., Li C., Horanszky O., Cramm M. A., Bisiach F., Bennett R., Webb J., MacDonald A., Fowler M., Campbell D. C., Hubert C. R. J. Geological processes mediate a microbial dispersal loop in the deep biosphere // Sci. Adv. 2022. V. 8. Art. 3485.

Jiao J. Y., Liu L., Hua Z. S., Fang B. Z., Zhou E. M., Salam N., Hedlund B. P., Li W. J. Microbial dark matter coming to light: challenges and opportunities // Natl. Sci. Rev. 2021. V. 8. Art. nwa280.

Khlystov O., De Batist M., Shoji H., Hachikubo A., Nishio S., Naudts L., Poort J., Khabuev A., Belousov O., Manakov A., Kalmychikov G. Gas hydrate of Lake Baikal: Discovery and varieties // J. Asian Earth Sci. 2013. V. 62. P. 162–166.

Khlystov O. M., Batist M., Minami H., Hachikubo A., Khabuev A. V., Kazakov A. V. The position of gas hydrates in the sedimentary strata and in the geological structure of Lake Baikal // World atlas of submarine gas hydrates in continental margins // Eds. Jürgen Mienert et al. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2022. P. 465.

Liu Y. F., Qi Z. Z., Shou L. B., Liu J. F., Yang S. Z., Gu J. D., Mu B. Z. Anaerobic hydrocarbon degradation in candidate phylum “Atribacteria” (JS1) inferred from genomics // ISME J. 2019. V. 13. P. 2377–2390.

Mori K. *Caldiserica* // Bergey’s manual of systematics of Archaea and Bacteria / Eds. Trujillo M. E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F. A., Whitman W. B. 2018.

<https://doi.org/10.1002/9781118960608.pbm00033>

Oren A., Garrity G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>

Oren A., Goker M. *Candidatus* List. Lists of names of prokaryotic *Candidatus* phyla // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2023. V. 73.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005821>

Pavlova O. N., Tupikin A. E., Chernitsyna S. M., Bukin Yu. S., Lomakina A. V., Pogodaeva T. V., Nikonova A. A., Bukin S. V., Zemskaya T. I., Kabilov M. R. Description and genomic analysis of the first facultatively lithoautotrophic, thermophilic bacteria of the genus *Thermaerobacter* isolated from low-temperature sediments of Lake Baikal // Microb. Ecol. 2023. V. 86. P. 1604–1619.

<https://doi.org/10.1007/s00248-023-02182-1>

The Source of Thermophilic Bacteria in Lake Baikal Cold Sediments – Coastal Hydrotherms or Deep Fluids?

O. N. Pavlova^{1, *}, S. M. Chernitsyna¹, S. V. Bukin¹, A. V. Lomakina¹, O. V. Shubenkova¹,
D. K. Smirnova¹, and T. I. Zemskaya¹

¹*Limnological Institute, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

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

Received October 11, 2023; revised November 7, 2023; accepted November 8, 2023

Abstract—The sources of thermophilic bacteria revealed in cold Lake Baikal sediments are considered. Comparative analysis of the taxonomic position of thermophilic microorganisms from four terrestrial hot springs at Lake Baikal coast and from the bottom sediments associated with hydrocarbon discharge was carried out. The sequences of thermophilic microorganisms with the same taxonomic position were revealed both in the hot springs and bottom sediments. Some microbial species occurred only in the hydrotherm samples or only in those from the sediments. Gas-saturated fluids from the hydrocarbon generation zone at the depth of 4–6 km are the most probable source of thermophilic microorganisms in the bottom sediments.

Keywords: Lake Baikal, thermophiles, microbial diversity, hot springs, Kotel'nikovsky, Khakussky, Davshinsky, Zmeiny

УДК 579.222+57.083+574.635

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ДОННЫХ ЭКОТОПОВ БАРЕНЦЕВА И ПЕЧОРСКОГО МОРЕЙ

© 2024 г. В. О. Пыркин^{а, *}, Л. А. Гавирова^а, А. Р. Строева^а, А. Ю. Меркель^б, О. Н. Видищева^а,
А. Г. Калмыков^а, Е. А. Бонч-Осмоловская^{а, б}

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

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

*e-mail: vladislw@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После исправления 14.11.2023 г.

Принят к опубликованию 17.11.2023 г.

Микроорганизмы, способные к утилизации углеводов, являются естественными компонентами микробных сообществ природных местообитаний и играют важную роль в самоочищении морских акваторий от нефтяных загрязнений. С помощью высокопроизводительного секвенирования переменного участка V4 гена 16S рРНК был проведен анализ микробных сообществ Баренцева и Печорского морей, а также микрокосмов, полученных на спектре углеводородных субстратов: нефть, n-нонан, n-ундекан и фенантрен. Сообщества углеводородоокисляющих микроорганизмов Баренцева моря характеризуются доминированием родов *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Porticoccus*, *Oleispira*, в то время как углеводородоокисляющие сообщества Печорского моря содержат бактерии родов *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus* и *Hyphomonas*. Чистые культуры этих организмов продемонстрировали способность к использованию основных углеводов нефти: n-алканов, циклоалканов и ароматических соединений.

Ключевые слова: Баренцево море, Печорское море, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, углеводородоокисляющие микроорганизмы

DOI: 10.31857/S0026365624030081

Арктические моря являются важным ресурсом с точки зрения имеющихся в них запасов углеводов: по данным геологоразведки в них находится большая часть мировых запасов нефти и газа (Патин, 2017). Акватории Баренцева, Печорского и Карского морей считаются самыми ресурсоемкими; в их пределах сосредоточено около 62.7% суммарных геологических ресурсов акватории РФ (Еремин и соавт., 2010). Перспектива разработки нефтяных месторождений в Баренцевом и Печорском морях делает актуальным исследование микробного разнообразия в этих местообитаниях, так как важно понимать, насколько природные микробные сообщества арктических морей способны справиться с нефтяными загрязнениями, неизбежно сопутствующими разработке месторождений углеводов. Баренцево море является самым западным морем Арктики и находится под значительным влиянием Атлантического океана, в результате чего более соленая и теплая вода Атлантики смешивается с холодной и более пресной водой Арктики. Печорское море является заливом Баренцева моря, образуемым впадением в него реки

Печоры, и характеризуется пониженной, по сравнению с Баренцевым морем, соленостью (Rogozhin et al., 2023).

Целью настоящей работы было изучение углеводородоокисляющих микроорганизмов Баренцева и Печорского морей и их потенциала к биоремедиации путем анализа микробных сообществ придонных экотопов и микрокосмов, полученных в присутствии различных углеводородных субстратов.

В работе анализировались образцы придонной воды и грунта из северной части Баренцева моря и центральной части Печорского моря. Пробоотбор в Баренцевом море осуществлялся в августе 2020 года и в сентябре–октябре 2021 года в ходе рейсов ТТР-19 и ТТР-20 НИС “Академик Николай Страхов”. Пробоотбор в Печорском море осуществлялся в августе 2020 года на ИС “Картеш”. Образцы придонной морской воды отбирали батометром Нискина (ИС “Картеш”), или из верхней части гравитационной трубы (НИС “Академик Николай Страхов”). Для концентрации клеток микроорганизмов и их последующего анализа морскую воду

в объеме 2 л после доставки на борт судна фильтровали через систему стекловолоконного предфильтра (Glass Fiber Filter Membrane Filters, “GVS”) и мембранного фильтра с диаметром пор 0.22 мкм (“Merck”). Образцы грунта отбирали из верхних слоев донных отложений глубиной 0–5 см, с помощью дночерпателя (ИС “Картеш”) или гравитационной трубы (НИС “Академик Николай Страхов”).

Сообщества углеводородокисляющих микроорганизмов были получены методом микрокосмов в два этапа. На первом этапе образцы придонной морской воды и грунта в количестве 5% от объема минеральной среды ONR7a (Dyksterhouse et al., 1995) культивировали в присутствии нефти 0.2% (Oil) и без внесения углеводородного субстрата (Control_oil) в течение 7 сут. На втором этапе полученную культуру пересеивали на индивидуальные углеводороды – н-нонан (Nonane), н-ундекан (Undecane), фенантрен (Phenantrene) и отдельно вели контрольную линию (Control_HC) (рис. 1). Культивирование проводили в орбитальном шейкере (“New Brunswick”, Германия) в пластиковых пробирках объемом 50 мл с закручивающимися крышками при 15°C и 180 об./мин. Выделение чистых культур проводили при температуре 15°C на твердых агаризованных средах: ONR7a с внесением углеводородов и Plate Count Agar (PCA) (г/л): K_2HPO_4 – 1.5; KH_2PO_4 – 0.75; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.0; $(NH_4)_2SO_4$ – 4.0; NaCl – 30; гидролизат казеина – 5.0; дрожжевой экстракт – 2.5; D(+)-глюкоза – 1.0; дистиллированная вода, pH 7.0. Концентрацию клеток микроорганизмов в образцах придонной воды оценивали методом люминесцентной микроскопии с окрашиванием акридином оранжевым. В грунте абсолютную численность бактерий оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием универсальных праймеров на V4 участок гена 16S рРНК: Pro515F и Pro-mod-805R (Hugerth et al., 2014, Меркель и соавт., 2019). Реакцию проводили с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) на приборе StepOnePlus (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для выделения образцов тотальной ДНК из природных образцов и микрокосмов использовали коммерческий набор FastDNA SPIN Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США). Библиотеки участка V4 генов 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq готовили по двухэтапной схеме ПЦР, описанной Gohl et al. (2016). Профили микробных сообществ придонной морской воды, донных отложений и микрокосмов по гену 16S рРНК были получены с помощью ПЦР и высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Illumina MiSeq). Для обработки нуклеотидных последовательностей был использован метод ASV (Caruso et al., 2019). ASV-таблица была создана с помощью ПО Dada2 (Callahan et al., 2016) и базы данных SILVA 138 (Quast et al., 2013). Последовательности фрагментов гена 16S рРНК были

депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA980746, PRJNA1005790. Для амплификации последовательности гена 16S рРНК выделенных чистых культур использовали праймеры 27F и 1492R. Анализ хроматограмм проводили в программе BioEdit. Для анализа полученных последовательностей использовали базу данных BLASTn. Степень деструкции углеводородов определяли с помощью газо-жидкостной хроматографии на газовом хроматографе Agilent 8890 (США), соединенном с масс-селективным детектором 5977В с высокоэффективным источником ионизации Inert plus.

Из 20 образцов придонной морской воды, 7 образцов донных отложений из Баренцева моря, 6 образцов придонной морской воды и 6 образцов донных отложений из Печорского моря была определена абсолютная численность клеток микроорганизмов, выделена ДНК и, методом NGS, по гену 16S рРНК проанализирован состав микробных сообществ.

Численность прокариот в 1 мл придонной морской воды составила от 1.36×10^5 до 4.5×10^7 кл./мл. В образцах грунта концентрация микроорганизмов варьировала 1.5×10^7 до 6×10^9 кл./см³. В микробных сообществах придонной воды Баренцева моря доминировали представители *Neptunomonas* от 6.4 до 50%, *SUP05 (Pseudomonadota)* от 1.8 до 15.5%, *Nitrosopumilus* от 1.6 до 13.9%, неидентифицированные представители семейства *Nitrincolaceae* от 2 до 13.3%, морские органогетеротрофы *Polaribacter* от 1.2 до 12.6%, *Luteolibacter* от 1.2 до 11%, *Clade Ia (Pseudomonadota)* от 1.7 до 10.6%, некультивируемые сульфатредукторы *Sva0081_sediment_group (Desulfobacterota)* от 1.1 до 9.8%. Микробные сообщества донных отложений Баренцева моря характеризовались преобладанием неидентифицированных бактерий из семейств *Hyphomicrobiaceae* от 7.4 до 22.3%, *Desulfocapsaceae* от 4.2 до 8.1%, *Desulfobulbaceae* от 1.4 до 5.9%, а также некультивируемых бактерий рода *Sva0081_sediment_group (Desulfobacterota)* от 2.3 до 10%.

Микробные сообщества придонной воды Печорского моря были представлены некультивируемыми бактериями *OM60(NOR5)_clade (Pseudomonadota)* от 3 до 23.8% во всех исследованных образцах, неидентифицированными представителями семейства *Nitrincolaceae* от 14 до 21.8% и *Amylibacter* от 12.8 до 16.6%. В грунтах Печорского моря доминировали миксобактерии из семейства *Sandaracinaceae* от 7.5 до 26.7%, органогетеротрофные бактерии рода *Woeseia* от 2.4 до 24% и неклассифицированные *Actinomarinales* от 4.5 до 10%.

Из 38 микрокосмов с нефтью и 32 с индивидуальными углеводородами (н-нонан, н-ундекан и фенантрен), добавленными в качестве источника углерода и энергии, была выделена и проанализирована ДНК (рис. 1).

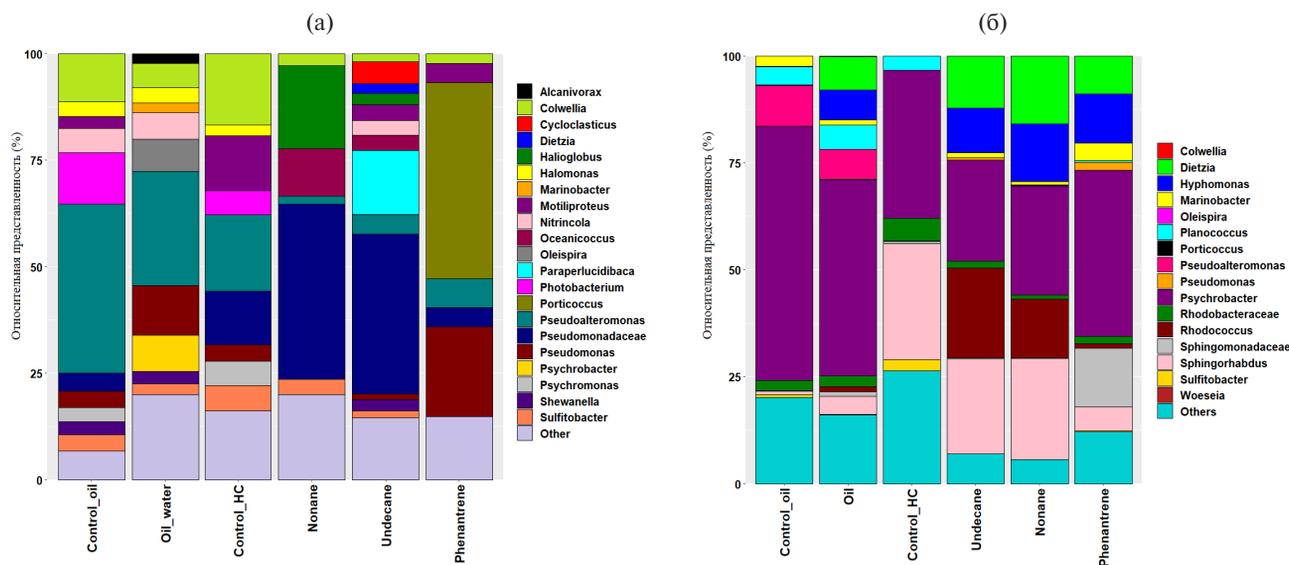


Рис. 1. Усредненный филогенетический состав сообществ микрокосмов из придонной воды и грунта Баренцева (а) и Печорского (б) морей, полученный путем NGS профилирования по гену 16S rPHK.

Также были проанализированы 22 микрокосма, культивируемых без внесения углеводородного субстрата. При культивировании придонной воды Баренцева моря в присутствии сырой нефти (рис. 1а, Oil) наблюдается увеличение, по сравнению с контролем (рис. 1а, Control_oil), относительного содержания бактерий родов *Pseudoalteromonas* с 5.4 до 33.16%, *Pseudomonas* с 0.48 до 15.57%, *Oleispira* с 0.94 до 10.04%. Добавление н-алканов привело к увеличению содержания неидентифицированных членов семейства *Pseudomonadaceae* с 8.1 до 41.14% в случае н-нонана (рис. 1а, Nonane) и до 37.63% (рис. 1а, Undecane). Использование фенантрена также стимулировало изменение состава микробного сообщества: было отмечено увеличение содержания бактерий родов *Porticoccus* с 0.32 до 46.01% и *Pseudomonas* с 5.02 до 21.09% (рис. 1а, Phenantrene).

Использование нефти в микрокосмах, полученных путем инкубирования смеси придонной воды и грунтов Печорского моря, приводило к доминированию, по сравнению с контролем, представителей рода *Dietzia* с 0.02 до 10.24%, *Hyphomonas* с 0.002 до 4.33%, *Sphingorhabdus* с 0.32 до 4.32% (рис. 1б, Oil). При посеве микробного сообщества на н-нонан и н-ундекан (рис. 1б, Nonane, Undecane) доминирующими таксонами были роды *Sphingorhabdus* (23.61 и 22.08%), *Rhodococcus* (13.76 и 20.97%), *Dietzia* (15.94 и 12.26%) и *Hyphomonas* (13.45 и 10.32%). В случае использования фенантрена микробными сообществами Печорского моря возрастало относительное количество бактерий родов *Dietzia* с 0.04 до 10.24% и *Hyphomonas* с 0.05 до 10.24% (рис. 1б, Phenantrene).

Таким образом, установлено, что при инкубировании придонной воды и грунта Баренцева и Печорского морей в присутствии углеводородных субстратов в микробных сообществах наблюдается существенное увеличение доли бактерий ряда таксонов. Не все перечисленные таксоны были представлены хотя бы в одной группе природных образцов, что могло быть связано с их предельно низким количеством в исследуемой пробе. В то же время в экспериментах с микрокосмами в присутствии углеводородных субстратов они оказались способными занимать доминирующее положение. Таксоны, доминирующие в микрокосмах, полученных из образцов Баренцева моря, помимо своей способности к утилизации углеводородов, ассоциированы с цветением фитопланктона. Фитопланктон, в свою очередь, может являться источником углеводов в мировом океане, в результате чего создается так называемый краткосрочный цикл углеводов (Lea-Smith et al., 2015). В микрокосмах из Печорского моря доминировали бактерии, которые исследователи обычно ассоциируют с территориями, хронически загрязненными нефтью (Carvalho et al., 2014; Wang et al., 2016; Nölvak et al., 2021).

Из полученных микрокосмов были выделены чистые культуры представителей родов *Pseudoalteromonas*, *Janibacter*, *Rhodoglobus*, *Rhodococcus*, *Psychrobacter*, для которых была изучена способность к утилизации углеводов нефти. Для оценки утилизации линейных алканов использовались соотношения пристана (Pr) к н-гептадекану (н-С₁₇) и фитана (Ph) к н-октадекану (н-С₁₈). Пристан и фитан слабо подвержены процессам биологического окисления, в то время как исчезновение н-С₁₇ и н-С₁₈ в нефтях является первым признаком биodeградации (Гордадзе и соавт., 2015).

Значения соотношений Pr/n-C₁₇ и Ph/n-C₁₈ в контроле (без внесения культуры бактерий) составляли 0.6 и 0.5. Соотношение пристана к фитану Pr/Ph, которое должно оставаться постоянным для исходной и подверженной микробному окислению нефти, как в контроле, так и в опытных образцах, составило 1.3–1.4. Установлено, что наиболее активно разлагали n-алканы бактерии родов *Rhodoglobus* (Pr/n-C₁₇ = 10 и Ph/n-C₁₈ = 10), *Dietzia* (4.2 и 4.2), *Rhodococcus* (2.3 и 2.7), *Pseudoalteromonas* (2.5 и 2.3); с меньшей интенсивностью — *Psychrobacter* (0.6 и 0.5) и *Janibacter* (0.7 и 0.5) (рис. 2а).

Биодеструкция ароматических соединений отслеживалась с помощью соотношения суммы метилнафталенов (MN) к диметилнафталенам (DMN) и триметилнафталенов (TMN): MN/(DMN + TMN); в контроле исследуемое соотношение составило 0.33. В процессе биодegradации значение данного индекса снижается за счет увеличения доли триметилнафталенов (Fisher et al., 1998). В деструкции алкильных нафталенов, входящих в состав нефти, активно участвовали бактерии родов *Janibacter*, соотношение MN/(DMN + TMN) = 0.04, *Rhodoglobus* — 0.06, *Dietzia* — 0.18,

Psychrobacter — 0.21, в то время как *Rhodococcus* — 0.36 и *Pseudoalteromonas* — 0.36 не показали активность утилизации ароматических соединений (рис. 2б).

Таким образом, таксоны, преобладавшие в составе микробных сообществ исследуемых донных экотопов Баренцева и Печорского морей, в целом являлись характерными для морских местообитаний, однако различались в случае образцов из двух исследованных морей. Отмеченные различия в составе микробных сообществ могут быть связаны как с флуктуационным характером солености, так и с большей близостью к берегу и возможной загрязненностью в местах отбора образцов в Печорском море. Последнее предположение подтверждается и составом микробных сообществ микрокосмов, использующих углеводородные субстраты. Микробные сообщества микрокосмов из образцов Баренцева моря характеризовались доминированием бактерий, ассоциированных с фитопланктоном, в то время как в микрокосмах из образцов Печорского моря преобладали представители родов с широким спектром потребления углеводородных субстратов. Выделенные в чистую культуру бактерии из сообществ микрокосмов способны

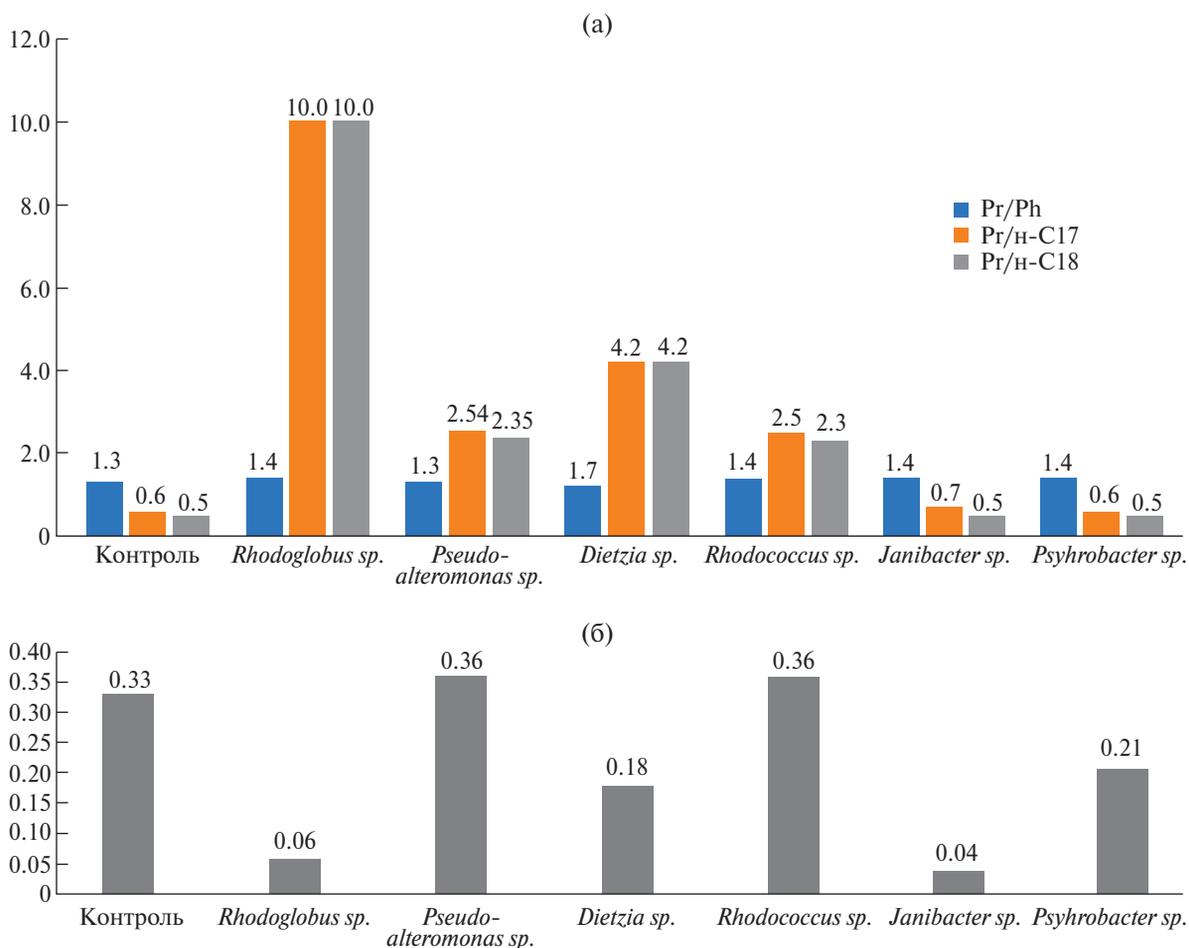


Рис. 2. Гистограмма значений соотношений маркеров биодegradации n-алканов (а) и ароматических соединений (б) исследованными чистыми культурами микроорганизмов.

окислять достаточно широкий спектр углеводородных субстратов, включающий n-алканы и ароматические соединения. Таким образом, установлено, что придонная вода Баренцева и Печорского морей обладает способностью к самоочищению от углеводородов нефти за счет утилизации компонентов нефти участниками микробных сообществ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарности Центру морских исследований МГУ имени М. В. Ломоносова за предоставление образцов грунта и воды Баренцева и Печорского морей, а также командам экспедиций ТТН19 и ТТН20 и экипажу НИС «Академик Николай Страхов» за помощь в пробоотборе донных отложений и морской воды Баренцева моря.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке проекта РФФИ № 20-54-20001 Норв_т.

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

Гордадзе Г. Н., Гируц М. В., Пошибаева А. Р., Кошелев В. Н. Химия нефти с основами органической геохимии. М.: РГУ нефти и газа имени И. М. Губкина, 2015. 80 с.

Еремин Н. А., Кондратюк А. Т., Еремин А. Н. Ресурсная база нефти и газа арктического шельфа России // Георесурсы, геоэнергетика, геополитика. 2010. № 1 (1). С. 23.

Меркель А. Ю., Тарновецкий И. Ю., Подосокорская О. А., Тошчаков С. В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655–664.

Merkel A. Yu., Tarnovetskii I. Yu., Podosokorskaya O. A., Toshchakov S. V. Analysis of 16S rRNA primer systems

for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–681.

Патин С. А. Нефть и экология континентального шельфа. М.: Издательство ВНИРО, 2017. 284 с.

Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // Nature Methods. 2016. V. 13. P. 581–583.

Caruso V., Song X., Asquith M., Karstens L. Performance of microbiome sequence inference methods in environments with varying biomass // MSystems. 2019. V. 4. <https://doi.org/10.1128/msystems.00163-18>.

De Carvalho C. C. R., Costa S. S., Fernandes P., Couto I., Viveiros M. Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* // Front. Physiol. 2014. V. 5. Art. 133.

Fisher S. J., Alexander R., Kagi R. I., Oliver G. A. Aromatic hydrocarbons as indicators of biodegradation in north Western Australian reservoirs // Sedimentary Basins of Western Australia: West Australian Basins Symposium / Ed. Purcell P. G., Purcell R. R. Perth, 1998. P. 185–194.

Gohl D. M., Vangay P., Garbe J., MacLean A., Hauge A., Becker A., Beckman K. B. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies // Nature Biotechnol. 2016. V. 34. P. 942–949.

Hugerth L. W., Wefer H. A., Lundin S., Jakobsson H. E., Lindberg M., Rodin S., Andersson A. F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116–5123.

Lea-Smith D. J., Biller S. J., Davey M. P., Cotton C. A., Perez Sepulveda B. M., Turchyn A. V., Howe C. J. Contribution of cyanobacterial alkane production to the ocean hydrocarbon cycle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 13591–13596.

Nölvak H., Dang N. P., Truu M., Peeb A., Tiirik K., O'Sadnick M., Truu J. Microbial community dynamics during biodegradation of crude oil and its response to biostimulation in Svalbard seawater at low temperature // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 2425.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Glöckner F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // Nucl. Acids Res. 2012. V. 41. D1. P. D590–D596.

Rogozhin V., Osadchiev A., Konovalova O. Structure and variability of the Pechora plume in the southeastern part of the Barents Sea // Front. Mar. Sci. 2023. V. 10. Art. 1052044.

Wang X. B., Chi C. Q., Nie Y., Tang Y. Q., Tan Y., Wu G., Wu X. L. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. P. 7755–7761.

Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria of the Bottom Ecotopes of the Barents and Pechora Seas

V. O. Pyrkin¹, *, L. A. Gavirova¹, A. R. Stroeve¹, A. Yu. Merkel², O. N. Vidishcheva¹,
A. G. Kalmykov¹, and E. A. Bonch-Osmolovskaya^{1, 2}

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

²*Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

**e-mail: vladislw@yandex.ru*

Received October 14, 2023; revised November 14, 2023; accepted November 17, 2023

Abstract—Microorganisms capable of degrading hydrocarbons are regular components of natural microbial communities and play an important role in self-purification of marine environments from oil contamination. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene V4 variable region was used to analyze microbial communities of the Barents and Pechora seas and of the microcosms with a spectrum of hydrocarbon substrates: oil, *n*-nonane, *n*-undecane, and phenanthrene. The Barents Sea communities of hydrocarbon-oxidizing microorganisms were characterized by predominance of the genera *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Porticoccus*, and *Oleispira*, while those of the Pechora Sea contained members of the genera *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus*, and *Hyphomonas*. Pure cultures of these microorganisms were shown to utilize the major oil hydrocarbons: *n*-alkanes, cycloalkanes, and aromatic compounds.

Keywords: Barents Sea, Pechora Sea, microbial diversity, 16S rRNA gene, hydrocarbon-oxidizing microorganisms

УДК 57.083:578.347+578.233.22

ИЗУЧЕНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ВИРИОНА Stx-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО БАКТЕРИОФАГА ϕ 24В МЕТОДАМИ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2024 г. А. С. Кузнецов^{a, *}, А. В. Моисеенко^b, Е. Е. Куликов^a, А. В. Летаров^{a, b}

^aФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

*e-mail: alexbluesking@gmail.com

Поступила в редакцию 06.10.2023 г.

После доработки 28.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Разработана модифицированная методика культивирования, концентрирования и очистки препаратов фага ϕ 24В. В частности, использован новый лизогенный штамм-продуцент фага, лишенный жгутиков, оптимизированы условия индукции, применены очистка в градиенте сахарозы и концентрирование осаждением на подушку из фреона 113. При помощи данного метода был получен препарат Stx-конвертирующего бактериофага ϕ 24В, пригодный для прямого анализа методом крио-ЭМ. На основании данных крио-ЭМ для данного фага впервые произведена первичная трехмерная реконструкция вирионов. Описана структура хвоста фага ϕ 24В. Показано, что адсорбционный аппарат данного вируса представлен шестью тонкими боковыми фибриллами и расположенной на конце хвоста осевой фибриллой. Такое устройство хвостовой структуры согласуется с ранее выдвинутой гипотезой, основанной на анализе рецептор-распознающих белков этого бактериофага.

Ключевые слова: Stx-фаги, крио-ЭМ, структура вириона, рецептор-распознающие белки, *Escherichia coli*, STEC, ультрацентрифугирование

DOI: 10.31857/S0026365624030095

На сегодняшний день набирают актуальность работы по изучению патогенных вариантов *Escherichia coli*. Наравне с бактериями клинически значимой группы ESKAPE, многие штаммы *E. coli* также характеризуются наличием множественной лекарственной устойчивости, что послужило основанием для введения их в группу ESKAPE (Blake, Choi и соавт., 2021). Патогенность *E. coli* может варьировать от штамма к штамму и обычно связана как со способностью клеток к адгезии на слизистой кишечника и инфильтрации эпителия, так и с продукцией термолабильного или термостабильного энтеротоксинов, либо шигаподобного токсина (Riley, 2014). Шигатоксигенные *E. coli* (Shiga toxinogenic *E. coli*, STEC) вызывают опасные токсикоинфекции у людей, являясь распространенной причиной диарей, геморрагического колита и гемолитико-уремического синдрома (Trachtman et al., 2012). Обнаружение STEC у сельскохозяйственных животных, которые могут быть бессимптомными носителями, приводит к значительным экономическим потерям в животноводстве (Callaway et al., 2009; Todd, 1989).

Бактерии группы STEC приобрели способность синтезировать шигаподобный токсин вследствие лизогенной конверсии. Умеренные бактериофаги, несущие гены токсина *stxA* и *stxB*, включены в группу Stx-конвертирующих фагов (Stx-фагов). Stx-фаги принадлежат к классу *Caudoviricetes*, при этом их вирионы могут быть представлены морфотипами сифовирусов, подовирусов и миовирусов (Muniesa et al., 2004). Большинство Stx-конвертирующих бактериофагов обладает лямбдоидным типом организации генома (Muniesa et al., 2004), однако сообщается и о нелямбдоидных *Eru1*-фагах, также кодирующих гены группы *stx* (Llarena et al., 2021). Для лямбдоидных Stx-фагов характерно расположение генов токсина в кластере поздних генов, что подразумевает экспрессию шигаподобного токсина в ходе литической инфекции и его высвобождения вместе с фаговым потомством при лизисе клеток (Sausset et al., 2020). Большинство Stx-фагов присутствует в виде профагов в геномах различных STEC, периодически распространяясь в виде вирусных частиц при индукции профагов из лизогенов. Индукция Stx-профагов иногда является спонтанной, но часто вызвана

воздействием стрессовых факторов. В связи с этим применение антибиотиков для терапии STEC-инфекций не рекомендовано, поскольку оно вызывает сильный стресс у лизогенов, приводя к их массовому лизису и резкому повышению количества токсина Stx в кишечнике (Freedman et al., 2016; Sausset et al., 2020).

Бактериофаг ф24В, длина генома которого составляет 57677 п.н. (Smith et al., 2012) (GenBank: NM208303.1), и его близкие родственники представляют наиболее часто встречающиеся Stx-профаги. Частицы фага ф24В имеют морфологические особенности, характерные для подовирусов, поскольку имеют короткий хвост (Allison et al., 2003). Показано, что этот фаг *in vitro* инфицирует широкий спектр лишенных полноценного О-антигена (т.н. rough) штаммов *E. coli*, поскольку распознает в качестве конечного рецептора консервативный и жизненно важный белок внешней мембраны BamA (Rollauer et al., 2015; Smith et al., 2007). Также для ряда исследованных О-серотипов *E. coli* продемонстрировано, что наличие О-антигена, напротив, подавляет адсорбцию данного бактериофага на поверхности клетки, препятствуя лизогенизации и литической инфекции (Golomidova et al., 2021). Это может быть объяснено тем, что исследованные варианты О-антигена экранируют доступ фаговых рецептор-распознающих белков к конечному рецептору фага в составе внешней мембраны (Kulikov et al., 2019).

Несмотря на множество исследований в области биологии STEC, механизмы адсорбции Stx-конвертирующих бактериофагов, являющейся первопричиной формирования шигатоксигенного фенотипа *E. coli*, остаются пока не выясненными. Установление механизма адсорбции бактериофага ф24В на поверхности чувствительных к фагу клеток хозяев, в частности, механизма распознавания консервативного белка *E. coli* BamA, представляет собой важную задачу фундаментального значения. Эти знания, в совокупности с получением вирулентных мутантов данного вируса или рекомбинацией с другими вирулентными фагами, использующими идентифицированные первичные рецепторы, откроет возможности для инженерии терапевтических колифагов широкого спектра.

Одним из наиболее прогрессивных методов анализа структуры высокомолекулярных комплексов, в частности, вирусных частиц, сегодня оказывается трехмерная реконструкция на основе криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) (de Oliveira, Silva, 2021). Одним из серьезных ограничений метода оказывается то, что препараты вирусов, используемые в крио-ЭМ, должны содержать морфологически интактные и однородные фаги в высоких концентрациях, свободные от других субмикроскопических объектов.

Для бактериофага ф24В данный метод долгое время не мог быть использован в связи с трудностями получения высококонцентрированного и при этом достаточно чистого препарата частиц данного вируса, пригодного для крио-ЭМ. Благодаря оптимизации способов получения фаговых лизатов и введению

новых стадий в процесс их концентрирования и очистки, мы преодолели технические затруднения. Ранние попытки получения нами препарата фага показали, что очистка данного бактериофага путем ультрацентрифугирования в градиенте хлорида цезия приводит к понижению биологического титра в препарате на несколько порядков и нежелательным морфологическим изменениям вирионов (данные не приведены). В дальнейшем вместо градиента хлористого цезия мы применили очистку в градиенте сахарозы, которая является более биосовместимой. Также для ф24В было показано, что вирусные частицы из лизатов обычно соочищаются с бактериальными жгутиками, поэтому в рамках новой методики фаговые лизаты мы получали индукцией профагов из лизогенного штамма *E. coli* 4sR:24В, подготовленного нами на основе лабораторного штамма фага ф24В:Cat, полученного от Н. Е. Allison, и лишенного жгутиков бактериального штамма *E. coli* 4sR из нашей коллекции.

Индукцию профагов производили с использованием митомицина С и при низкой аэрации среды, что позволило не только увеличить выход фага, но и уменьшить содержание в образце мембранных везикул, мешавших сбору данных крио-ЭМ. Далее фаговые лизаты осветляли путем центрифугирования при 15000 g в течение 20 мин. Все последующие стадии ультрацентрифугирования проводили при 75000 g, максимальных параметрах ускорения при разгоне и остановке центрифуги и температуре 20°C в течение часа. Осветленные лизаты сначала концентрировали ультрацентрифугированием в угловом роторе Beckman 45Ti. Далее сконцентрированные образцы ресуспендировали в SM-буфере (8 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) и наслаивали на ступенчатый градиент плотности-вязкости сахарозы (20–30–40–50–60%) в буфере (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 50 mM NaCl), после чего подвергали ультрацентрифугированию в бакетном роторе Beckman SW50.1. После центрифугирования отбирали очищенный фаг на границе слоев, соответствующих 40 и 50% сахарозы, предварительно удаляя все верхние слои, содержащие примеси и поврежденные вирионы. После очистки в градиенте сахарозы биологический титр фага составлял порядка 5×10^{11} БОЕ/мл. Далее препарат подвергался диализу против SM-буфера и дополнительной стадии концентрирования на фреоне: очищенный препарат разводили в SM-буфере и наносили на слой фреона CFC-113 (плотность 1.56 г/см³), после чего центрифугировали при тех же параметрах в бакетном роторе Beckman SW50.1. Значения биологического титра фага в сконцентрированном таким образом препарате достигали 6.5×10^{12} БОЕ/мл. Фреон, практически не растворимый в воде и обладающий высокой плотностью, служил амортизирующей подушкой, предотвращающей агрегацию и поломку вирионов в центрифужном поле.

Полученный таким образом препарат фага ф24В обладал всеми необходимыми характеристиками

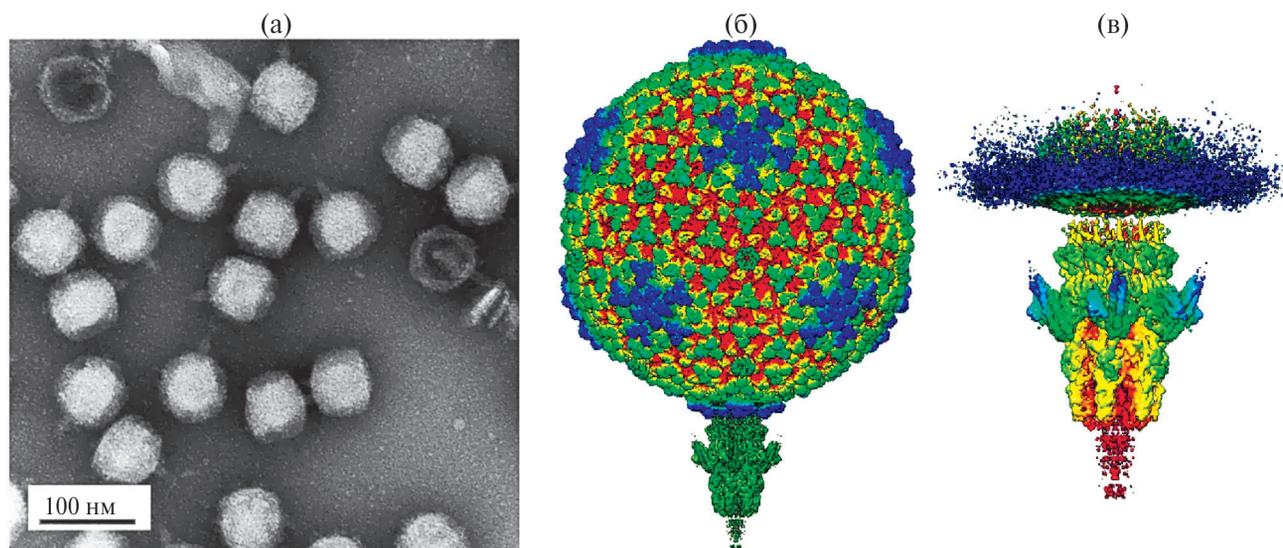


Рис. 1. Структурные особенности бактериофага φ24B: а — изображение вирионов, полученное при помощи ПЭМ; б — трехмерная реконструкция целого вириона; в — трехмерная реконструкция хвоста (градиент цвета от красного к синему отражает расстояние от центральной оси хвоста).

для успешного применения в крио-ЭМ. Перед непосредственным анализом фаговых частиц методом крио-ЭМ нами были получены при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) изображения вирионов с высоким разрешением (рис. 1а).

Препарат был нанесен на сеточки с пористой углеродной подложкой Quantifoil R1.2/1.3 и витрифицирован в жидком этане на установке Vitrobot IV (“ThermoScientific”, Нидерланды). Наборы крио-ЭМ данных были получены с использованием просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios (“ThermoScientific”, Нидерланды), оснащенного детектором K3 (“Gatan”, США). Обработка данных производилась методом анализа единичных частиц в программном обеспечении cryoSPARC. На основе результатов крио-ЭМ получены предварительные реконструкции капсида и адсорбционного аппарата с разрешением 4.0–6.0 Å (рис. 1б, 1в).

Полученная трехмерная реконструкция вирионов φ24B демонстрирует особенности морфологии фаговых частиц в целом (рис. 1б) и его хвостовой структуры в частности (рис. 1в). Фаговый капсид обладает икосаэдрической симметрией и образован белками гексамеров (в областях граней) и белками пентамеров (в областях вершин). Также заметно наличие пока не идентифицированных в геноме фага декорирующих белков.

В геноме бактериофага φ24B аннотированы гены потенциальных рецептор-распознающих белков 56 и 61. Мы полагаем, что белок gp61 образует хвостовые шипы, ответственные за распознавание пока не установленного первичного рецептора. Это предположение подтверждается наличием значительной гомологии (идентичность 81.55%, в основном в областях С-концевых рецептор-распознающих участков;

покрытие 93%) между последовательностями аминокислотных остатков белков gp61 фага φ24B и боковых фибрилл бактериофага λ_2B8 (Mathieu et al., 2020) (GenBank: LR595859.1). Дополнительным свидетельством в пользу нашей гипотезы является то, что адсорбция фага λ_2B8, любезно предоставленного М. А. Petit, не зависела от наличия на поверхности клеток-хозяев белка BamA исходного “дикого” типа конечного рецептора фага φ24B (данные не приведены).

По распределению электронной плотности в области адсорбционного аппарата можно говорить о наличии шести хвостовых шипов и осевой фибриллы, по своей форме напоминающей предсказанную при помощи алгоритма AlphaFold2 структуру тримера gp56. Это может указывать на возможное участие белка gp56 в необратимой адсорбции фага φ24B. Структура осевой фибриллы фага φ24B также напоминает хвостовую иглу цианофага Pam1 (Zhang et al., 2022) (GenBank: ON014753.1), чей адаптерный белок gp8 является отдаленным гомологом адаптерного белка gp57 фага φ24B. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения об участии белка gp56 в необратимой адсорбции фага φ24B.

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

- Allison H. E., Sergeant M. J., James C. E., Saunders J. R., Smith D. L., Sharp R. J., Marks T. S., McCarthy A. J. Immunity profiles of wild-type and recombinant shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens // *Infect. Immun.* 2003. V. 71. P. 3409–3418.
- Blake K. S., Choi J., Dantas G. Approaches for characterizing and tracking hospital-associated multidrug-resistant bacteria // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 78. P. 2585–2606.
- Callaway T. R., Carr M. A., Edrington T. S., Anderson R. C., Nisbet D. J. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years // *Curr. Iss. Mol. Biol.* 2009. V. 11. P. 67–79.
- de Oliveira G. A., Silva J. L. Cryo-EM to visualize the structural organization of viruses // *Curr. Opin. Virol.* 2021. V. 49. P. 86–91.
- Freedman S. B., Xie J., Neufeld M. S., Hamilton W. L., Hartling L., Tarr P. I., Alberta Provincial Pediatric Enteric Infection T., Nettel-Aguirre A., Chuck A., Lee B., Johnson D., Currie G., Talbot J., Jiang J., Dickinson J., Kellner J., MacDonald J., Svenson L., Chui L., Louie M., Lavoie M., Eltorki M., Vanderkooi O., Tellier R., Ali S., Drews S., Graham T., Pang X. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, antibiotics, and risk of developing hemolytic uremic syndrome: a meta-analysis // *Clin. Infect. Dis.* 2016. V. 62. P. 1251–1258.
- Golomidova A. K., Efimov A. D., Kulikov E. E., Kuznetsov A. S., Belalov I. S., Letarov A. V. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B // *Sci Rep.* 2021. V. 11. Art. 3035.
- Kulikov E. E., Golomidova A. K., Prokhorov N. S., Ivanov P. A., Letarov A. V. High-throughput LPS profiling as a tool for revealing of bacteriophage infection strategies // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 2958.
- Llarena A. K., Aspholm M., O'Sullivan K., Wegrzyn G., Lindback T. Replication region analysis reveals non-lambdaoid Shiga toxin converting bacteriophages // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 640945.
- Mathieu A., Dion M., Deng L., Tremblay D., Moncaut E., Shah S. A., Stokholm J., Krogfelt K. A., Schjorring S., Bisgaard H., Nielsen D. S., Moineau S., Petit M. A. Virulent coliphages in 1-year-old children fecal samples are fewer, but more infectious than temperate coliphages // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. Art. 378.
- Muniesa M., Serra-Moreno R., Jofre J. Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* genes appeared conserved // *Environ. Microbiol.* 2004. V. 6. P. 716–725.
- Riley L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* // *Clin. Microbiol. Infect.* 2014. V. 20. P. 380–390.
- Rollauer S. E., Sooreshjani M. A., Noinaj N., Buchanan S. K. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2015. V. 370. Art. 1679.
- Sausset R., Petit M. A., Gaboriau-Routhiau V., De Paepe M. New insights into intestinal phages // *Mucosal Immunol.* 2020. V. 13. P. 205–215.
- Smith D. L., James C. E., Sergeant M. J., Yaxian Y., Saunders J. R., McCarthy A. J., Allison H. E. Short-tailed stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among enterobacteria // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 7223–7233.
- Smith D. L., Rooks D. J., Fogg P. C., Darby A. C., Thomson N. R., McCarthy A. J., Allison H. E. Comparative genomics of Shiga toxin encoding bacteriophages // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. Art. 311.
- Todd E. C. D. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in Canada and costs to reduce salmonellosis // *J. Food Prot.* 1989. V. 52. P. 586–594.
- Trachtman H., Austin C., Lewinski M., Stahl R. A. Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS // *Nat. Rev. Nephrol.* 2012. V. 8. P. 658–669.
- Zhang J. T., Yang F., Du K., Li W. F., Chen Y., Jiang Y. L., Li Q., Zhou C. Z. Structure and assembly pattern of a freshwater short-tailed cyanophage Pam1 // *Structure.* 2022. V. 30. P. 240–251. e244.

SHORT COMMUNICATIONS

CryoEM Investigation of Three-Dimensional Structure of the Stx-Converting Bacteriophage ϕ 24BA. S. Kuznetsov^{1, *}, A. V. Moiseenko², E. E. Kulikov¹, and A. V. Letarov^{1, 2}¹Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

*e-mail: alexbluesking@gmail.com

Received October 6, 2023; revised November 28, 2023; accepted November 29, 2023

Abstract—A modified method for culturing, concentrating, and purifying phage ϕ 24B preparations was developed. In particular, a new lysogenic phage-producing strain lacking flagella was used, induction conditions were optimized, and purification in a sucrose gradient and concentration by deposition on a Freon 113 cushion were used. Using this method, a preparation of the Stx-converting bacteriophage ϕ 24B was obtained, which was suitable for direct analysis by the cryoEM method. Based on cryoEM data for this phage, the first primary three-dimensional reconstruction of its virions was performed. The structure of the phage ϕ 24B tail is described. It was shown that the adsorption apparatus of this virus is represented by six thin lateral fibrils and an axial fibril located at the end of the tail. This arrangement of the tail structure is consistent with the previously proposed hypothesis based on analysis of the receptor binding proteins (RBPs) of this bacteriophage.

Keywords: Stx phages, cryoEM, virion structure, RBPs, *Escherichia coli*, STEC, ultracentrifugation

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ И ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

© 2024 г. К. В. Моисеенко^а, О. А. Глазунова^а, О. С. Савинова^а, Т. В. Федорова^а, *

^аИнститут биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к публикации 25.10.2023 г.

Штаммы *Streptococcus thermophilus* широко используются как заквасочные культуры. Поиск новых безопасных штаммов с желаемыми производственными и пробиотическими свойствами является актуальным. Проведено полногеномное секвенирование, установлены основные характеристики геномов двух новых штаммов *S. thermophilus* 16t (Str16t) и 159 (Str159). *In silico* анализ геномов показал отсутствие трансмиссивных генов антибиотикорезистентности, генов патогенности и вирулентности, интегрированных плазмид, а также обнаружены генные кластеры бактериоцинов I и II класса. В *in vitro* тестах оба штамма показали фосфатазную, пептидазную, β-галактозидазную и эстеразную активности, а также ферментировали глюкозу, лактозу, сахарозу и рибозу, штамм Str16t дополнительно метаболизировал маннозу. Str16t и Str159 являются перспективными для использования как заквасочные и пробиотические культуры.

Ключевые слова: *Streptococcus thermophilus*, пробиогеномика, антибиотикорезистентность, углеводный профиль, метаболизм углеводов

DOI: 10.31857/S0026365624030106

Streptococcus thermophilus — грамположительная молочнокислая бактерия, широко используемая в качестве заквасочной культуры в молочной промышленности для изготовления йогуртов и ряженки, а также многих традиционных ферментированных продуктов. Этот вид молочнокислых бактерий в последние десятилетия привлекает широкий интерес исследователей из-за его широкого промышленного использования. Помимо своей технологической важности, в последние годы термофильный стрептококк вызывает интерес и как пробиотическая культура благодаря своим функциональным свойствам, способствующим укреплению здоровья человека. Показано, что некоторые штаммы *S. thermophilus* обладают различными пробиотическими свойствами (Vitetta et al., 2019), включая антиоксидантную (Roux et al., 2022), антимикробную (Evivie et al., 2017; Uriot et al., 2017), гипотензивную (Sebastián-Nicolas et al., 2021) активности. Тем не менее, многие из описанных сегодня в литературе свойств являются штамм специфичными характеристиками.

Целью данного исследования было инвентаризировать безопасность и пробиотические свойства

двух штаммов *S. thermophilus* и изучить их внутри-видовые различия на геномном уровне.

В работе использовали 2 штамма термофильного стрептококка *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 16t (MN994627) и 159 (MN994626) из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ). Для культивирования использовали стерильное восстановленное обезжиренное молоко, микробиологические среды М17-бульон и М17-агар (“HiMedia”, Индия). Штаммы культивировали в аэробных условиях при температуре 37°C.

Для выделения ДНК штаммы *S. thermophilus* статически культивировали в 20 мл жидкой среды М17 при температуре (37 ± 1)°C до появления видимой опалесценции. Тотальную ДНК выделяли с использованием набора DNeasy mericon Food Kit (“Qiagen”, Валенсия, Калифорния, США), согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной ДНК проверяли с помощью Agilent Bioanalyzer 2100 (“Agilent Technologies”, Фостер-Сити, Калифорния, США) и флуориметра Qubit (“Thermo Fisher Scientific”, Уолтем, Массачусетс, США).

Библиотеки ДНК получали с использованием набора Ion AmpliSeq 2.0 (“Thermo Fisher Scientific”, Массачусетс, США) и индексировали с помощью набора адаптеров (штрих-кодов) Ion Xpress 1–16 (“Thermo Fisher Scientific”, Массачусетс, США). Качество и количество полученных ДНК-библиотек проверяли с помощью Agilent Bioanalyzer 2100. Секвенирование геномов (эквивалентно смешанным ДНК-библиотекам) проводили с использованием персональной геномной машины Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (“Thermo Fisher Scientific”, Массачусетс, США).

Сборку геномов *de novo* осуществляли с помощью CLC Genomics Workbench 11.0 (“Qiagen”, Валенсия, Калифорния, США). После сборки аннотации геномов были выполнены с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP), а также с использованием eggNOG, SignalP и SecretomeP онлайн интернет-сервисов. Геномы были депонированы в базу данных GenBank: *S. thermophilus* 16t (BioProject: PRJNA824719; JAMWGM01; ASM2389367v1) и *S. thermophilus* 159 (BioProject: PRJNA736961; JAH LXJ01; ASM1896690v1). Сравнительный геномный анализ проводили с использованием программного пакета Anvi'o.

Поиск мобильных генетических элементов осуществлялся с помощью программы ISfinder, поиск профагов — с помощью программы PHASTER, поиск плазмид — с помощью программы PlasmidFinder. Анализ наличия переносимых генов антибиотикорезистентности в полученных геномах проводился с помощью программ Resistance Gene Identifier и ResFinder 4.1. Анализ наличия генов факторов вирулентности проводился с помощью программ VirulenceFinder и PathogenFinder. Анализ наличия бактериоцин-кодирующих генов в полученных геномах проводился с помощью программы BAGEL4. Аннотацию метаболических путей проводили с помощью базы данных KEGG Pathway.

Углеводный и ферментативный профили исследовали с использованием тест-систем API 50CHL и API ZYM соответственно (“Bio-Merieux”, Франция).

Антибиотическую резистентность штаммов лактобактерий анализировали дискодиффузным методом с помощью набора дисков (“DI-PLS-50-01, NICF”, Санкт-Петербург, Россия), пропитанных различными видами антибиотиков. Диски накладывались на плотную питательную среду, засеянную культурой исследуемого штамма, после чего осуществляли культивирование в течение 24–48 ч при температуре 37°C и последующее измерение диаметра зоны задержки роста вокруг дисков.

Секвенирование и аннотирование геномов. С помощью технологии Ion Torrent были получены черновые геномные последовательности (ЧГП),

Таблица 1. Данные по секвенированию и аннотированию геномов *Streptococcus thermophilus* 16t (Str16t) и 159 (Str159)

Параметр	Str16t GCA_023893675.1	Str159 GCA_018966905.1
Секвенирование		
Число прочтений	4247 270	2851 726
Среднее прочтение	208 п.о.	209 п.о.
Сборка		
Размер сборки, п.о.	1810 221	1805 641
Среднее покрытие	100×	100×
Число контигов	76	75
Самый длинный контиг, п.о.	219248	217358
N50, п.о.	91841	100972
Средний размер контига, п.о.	23519	27766
Структурная аннотация		
Гены (всего):	1909	1914
Кодирующие белки	1619	1607
Кодирующие РНК	63	61
Псевдогены	227	246
CRISPR-регион	2	2

англ. draft genome sequences) *S. thermophilus* 16t и *S. thermophilus* 159 (табл. 1).

Для обеих ЧГП покрытие составляло более 100×, а конечное число контигов 76 и 75 соответственно. Несмотря на отличающиеся почти в два раза число полученных прочтений, в целом характеристики обеих ЧГП были сходны — N50 контигов составляли около 100 к.п.о., а самые длинные контиги были в районе 220 к.п.о. В целом, полученные ЧГП имели сопоставимое качество с ранее опубликованными ЧГП других штаммов *S. thermophilus*.

Стабильность геномов. Стабильность генома заквасочных и пробиотических культур лактобактерий является крайне важным параметром для их успешного промышленного применения. Чем стабильней геном микроорганизма, тем меньше вероятность вырождения его культуры, проявляющаяся в утере ряда пробиотических свойств и технически полезных качеств. В связи с вышесказанным, в полученных геномах *S. thermophilus* был проведен поиск таких основных маркеров стабильности генома, как мобильные генетические элементы, профаги и плазмиды. Результаты проведенного поиска основных маркеров стабильности генома суммированы в табл. 2. В целом оба штамма показали сходную стабильность геномов.

Сравнение геномов. Для выявления специфических геномных особенностей изучаемых штаммов *S. thermophilus*, был проведен сравнительный геномный анализ (рис. 1). Было обнаружено 3083

Таблица 2. Маркеры геномной стабильности в геномах *S. thermophilus* 16t и 159

Штамм	Число мобильных элементов IS, шт.	Число профагов, шт.			Плазмиды, шт.
		Полные	Под вопросом	Неполные	
16t	41	0	0	1	0
159	41	0	0	2	0

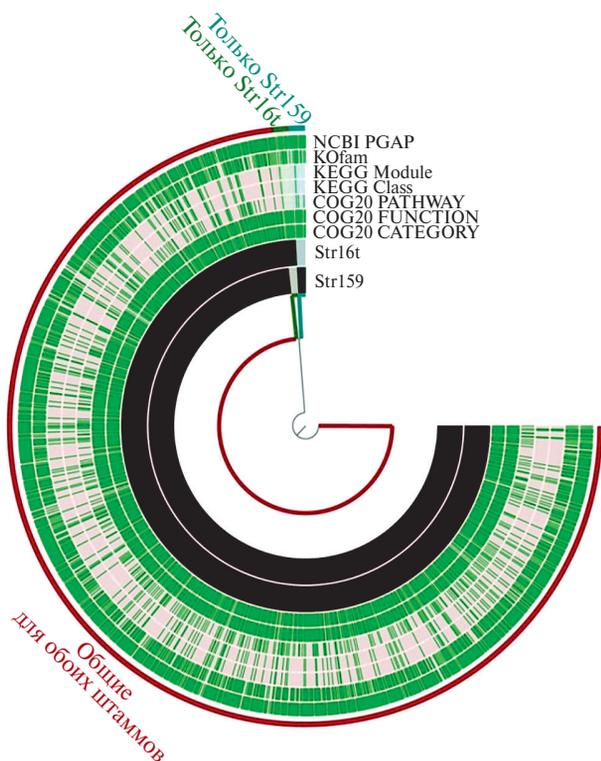


Рис. 1. Диаграмма Anvi'o, представляющая сравнительный геномный анализ штаммов *S. thermophilus* 16t (Str16t) и *S. thermophilus* 159 (Str159). Кластеры генов (два внутренних кольца) были упорядочены (внутренняя дендрограмма) в зависимости от их присутствия (сплошной цвет) или отсутствия (серый цвет) в геномах каждого штамма. Наличие у каждого кластера генов функциональных аннотаций указано зеленым цветом на кольце, подписанном в соответствии с типом аннотации.

генных кластера, общих для обоих геномов. Для штамма *S. thermophilus* 16t было выявлено 18 штаммоспецифических генных кластеров, а для штамма *S. thermophilus* 159—19.

Гены факторов вирулентности. Анализ факторов вирулентности показал, что вероятность анализируемых штаммов *S. thermophilus* стимулировать развитие патогенных процессов в организме человека, как непосредственно, так и опосредовано, через обмен генами с другими микроорганизмами оценивается ниже 0.1%.

Антибиотикорезистентность. Анализ антибиотикорезистентности штаммов *S. thermophilus*, при тестировании диско-диффузионным методом (ДДМ), показал наличие резистентности к фосфомицину у штамма 16t и к амоксицилину с канамицином у штамма 159, к остальным группам антибиотиков была показана либо чувствительность, либо промежуточная чувствительность (рис. 2).

В результате *in silico* анализа драфта геномов *S. thermophilus* не выявлено наличия известных трансмиссивных генов антибиотикорезистентности (AR), способных передаваться путем горизонтального генетического транспорта, таких как AR-гены устойчивости к: аминогликозидам (*aac(6')-aph(2'')*) и *aad(E)*); тетрациклинам (*tet(M)*, *tet(W)*, *tet(T)*, *tet(K)* и *tet(L)*); амфениколам (*cat*); макролидам и линкозамидам (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, *erm(T)* и *mef(A)*). В обоих геномах обнаружены детерминанты антибиотикорезистентности к β-лактамам. Они распознаны как β-лактамазы классов А (PenP) и С (AmpC), являющихся

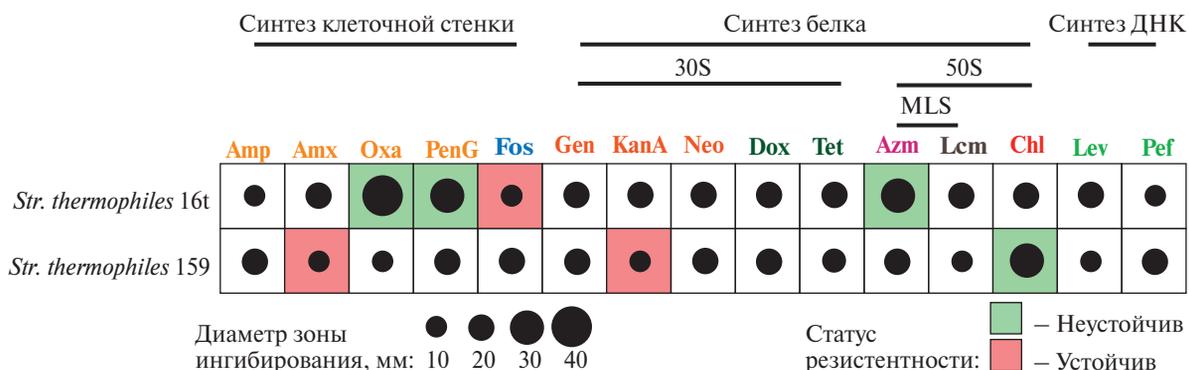


Рис. 2. Устойчивость штаммов *S. thermophilus* к различным группам антибиотиков: β-лактамы (Amp — ампициллин, Amx — амоксицилин, Oxa — оксациллин, PenG — пенициллин G); Fos — фосфомицин; Аминогликозиды (Gen — гентамицин, KanA — канамицин А, Neo — неомицин); Тетрациклины (Dox — доксицилин, Tet — тетрациклин); Макролиды (Azm — азитромицин); Линкозамиды (Lcm — линкомицин); Амфениколы (Chl — хлорамфеникол); Фторхинолоны (Lev — левофлоксацин, Pef — пefлоксацин).

сериновыми β -лактамазами, а также различные металл- β -лактамазы класса В. В тоже время устойчивость к фосфомицину у штамма Str16t и к канамицину А у Str159, показанная методом ДДМ, обусловлена, вероятно, наличием молекулярных эффлюксных помп семейства MacB, а также эффлюксных помп семейств MATE (1 ген только в геноме 16t), SMR (по 1 гену в обоих геномах) и MFS (9 и 10 генов в геномах Str16t и Str159 соответственно), которые могут обуславливать устойчивость бактерий к различным антимикробным препаратам.

Кластеры бактериоцинов. Антимикробная активность является одним из наиболее хорошо известных свойств потенциально пробиотических штаммов. Бактериоцины представляют собой рибосомально-синтезируемые пептиды, обладающие антимикробной активностью. Известно, что штаммы *S. thermophilus* могут продуцировать бактериоцины с ингибирующей активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, включая такие, как *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Clostridium butyricum*, *C. botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus cereus*, *Gardnerella vaginalis* и *Escherichia coli* (Evivie et al., 2017, Uriot et al., 2017, Roux et al., 2022).

In silico анализ показал наличие четырех одинаковых генных кластеров бактериоцинов в геномах *S. thermophilus* (табл. 3).

Они были аннотированы как: (1) *Lab* — кластер, кодирующий бактериоцин лантипептид из класса лантибиотиков; (2) *Blp* — кодирующий 5 циклических бактериоциноподобных пептидов II класса, включая *blpD*, *blpU* и *blpK*; (3) кластер генов, участвующих в биосинтезе сактипептида, характеризующегося наличием связей между атомом серы цистеинового остатка и α -углеродным атомом другой аминокислоты из группы RiPPs (рибосомно синтезируемые посттрансляционно модифицированные пептиды); (4) кластер генов, кодирующих биосинтез стрептида также из группы RiPPs, который представляет собой макроциклический пептид, образующийся в результате внутримолекулярной

сшивки Lys-Trp с участием фермента (KxxxW cyclic peptide radical SAM maturase, kwcM) из семейства rSAM (radical SAM enzymes), катализирующих радикальные реакции с участием S-аденозилметионина (SAM). Наличие в геномах ST16t и ST159 кластеров бактериоцинов свидетельствует о потенциальных противомикробных свойствах штаммов, но в дальнейшем необходимы эксперименты *in vitro* для демонстрации подобной активности.

Углеводный профиль и гены углеводного метаболизма. Углеводный обмен способствует колонизации лактобактерий в пищеварительном тракте организма хозяина, что является важным пробиотическим фактором. Предполагается, что утилизация глюкозы и лактозы является общей характеристикой изученных на сегодняшний день штаммов *S. thermophilus*, в то время как утилизация галактозы, рибозы, маннозы, мальтозы, мелибиозы, раффинозы и сахарозы имеет варибельный профиль (Zhao et al., 2023). В нашем исследовании оба штамма *S. thermophilus* сбраживали глюкозу, лактозу, сахарозу и рибозу, и были не способны утилизировать остальные сахара, за исключением маннозы, которую Str16t утилизировал, в отличие от Str159 (рис. 3а).

Детальный анализ кластеров геномов, отвечающих за утилизацию лактозы/галактозы, позволил выявить некоторые структурные особенности: (1) наличие генов, кодирующих ферменты Лелуар-пути — β -галактозидазу *lacZ*, оперон *GalkTEM* (галактокиназа *galk*, галактозо-1-фосфат уридилилиз-трансфераза *galT*, УДФ-глюкозо-4-эпимераза *galE* и галактозмутаротаза *GalM*), фосфоглюкомутазу *PgmA*; (2) отсутствие генов тагатоза-6-фосфатного пути (Т6Р). При этом в геномах Str16t и Str159 обнаружена специфичная для лактозы пермеаза *LacS* и отсутствуют специфичные транспортные системы для лактозы/галактозы, такие как фосфоенолпируватная транспортная система (PTS) *LacEF* и пермеаза *GalP*. Также обнаружены гены PTS для сахарозы (*ScrA*), маннозы (*ManXYZ*) и фруктозы (*FruA/B*). Интересно, что при наличии генов транспортных систем и ферментов для утилизации маннозы и фруктозы, фенотип обоих штаммов Str16t и Str159 Mal⁻, а у штамма Str159 также

Таблица 3. Кластеры бактериоцинов, предсказанные в геномах *S. thermophilus* 16t и 159

Кластер	Бактериоцин	Класс*
<i>Blp</i>	ComC/Бактериоцин	Пс
	ComC/Бактериоцин BlpD	Пс
	ComC/Бактериоцин	Пс
	ComC/Бактериоцин BlpU	Пс
	ComC/Бактериоцин BlpK	Пс
<i>Str</i> (Streptide LMD-9)	Стрепид	I (RiPPs)
Sactipeptide	Сактипептид	I (RiPPs)
<i>Lab</i>	Лантипептид	I (RiPPs)

*Классификация бактериоцинов в соответствии с (Soltani et al., 2021).

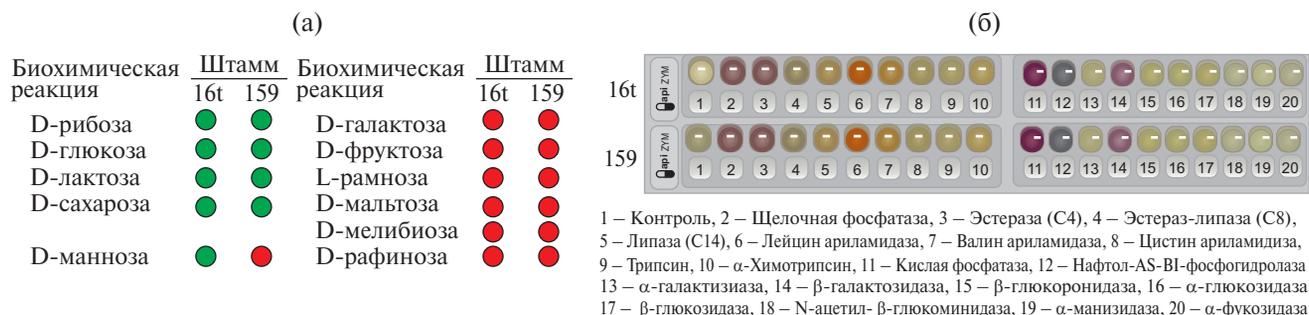


Рис. 3. Биохимическая характеристика *S. thermophilus* 16t и 159: а – оценка способности к ферментации углеводов (зеленый цвет – реакция положительная, красный – отрицательная); б – ферментативный профиль.

фенотип Map– (рис. 3а). Слабовыраженная сахаролитическая активность исследуемых штаммов *S. thermophilus* коррелирует с отсутствием активности соответствующих гликозид гидролаз (рис. 3б). Также не было установлено наличие в геномах *S. thermophilus* 16t и 159 известных специфичных для моно- и олигосахаридов ABC-транспортеров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 22-16-00108.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evivie S. E., Li B., Ding X., Meng Y., Yu S., Du J., Xu M., Li W., Jin D., Huo G., Liu F.* Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* KLDS3.1003, a strain with high antimicrobial potential against foodborne and vaginal pathogens // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 1238. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01238>
- Roux E., Nicolas A., Valence F., Siekaniec G., Chuat V., Nicolas J., Le Loir Y., Guédon E.* The genomic basis of the *Streptococcus thermophilus* health-promoting properties // *BMC Genomics.* 2022. V. 23. Art. 210. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08459-y>
- Sebastián-Nicolas J.L., Contreras-López E., Ramírez-Godínez J., Cruz-Guerrero A.E., Rodríguez-Serrano G.M., Añorve-Morga J., Jaimez-Ordaz J., Castañeda-Ovando A., Pérez-Escalante E., Ayala-Niño A., González-Olivares L. G.* Milk fermentation by *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102: proteolytic profile and ACE-inhibitory activity // *Fermentation.* 2021. V. 7. Art. 215. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040215>
- Soltani S., Hammami R., Cotter P. D., Rebuffat S., Ben Said L., Gaudreau H., Bédard F., Biron E., Drider D., Fliss I.* Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations // *FEMS Microbiol. Rev.* 2021. V. 45. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- Uriot O., Denis S., Junjua M., Roussel Y., Dary-Mouroit A., Blanquet-Diot S.* *Streptococcus thermophilus*: from yogurt starter to a new promising probiotic candidate? // *J. Funct. Foods.* 2017. V. 37. P. 74–89.
- Vitetta L., Llewellyn H., Oldfield D.* Gut dysbiosis and the intestinal microbiome: *Streptococcus thermophilus* a key probiotic for reducing uremia // *Microorganisms.* 2019. V. 7. Art. 228. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080228>
- Zhao R., Chen Z., Liang J., Dou J., Guo F., Xu Z., Wang T.* Advances in genetic tools and their application in *Streptococcus thermophilus* // *Foods.* 2023. V. 12. Art. 3119. <https://doi.org/10.3390/foods12163119>

Comparative Genome Analysis and Assessment of the Functional Properties of *Streptococcus thermophilus* Strains

K. V. Moiseenko¹, O. A. Glazunova¹, O. S. Savinova¹, and T. V. Fedorova^{1, *}

¹*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: fedorova_tv@mail.ru*

Received October 13, 2023; revised October 24, 2023; accepted October 25, 2023

Abstract—*Streptococcus thermophilus* are commonly used as starter cultures. Search for new safe strains with desired industrial and probiotic properties is an important issue. Complete genome sequencing was carried out, and the main genome characteristics of two new strains, *S. thermophilus* 16t (Str16t) and 159 (Str159), were determined. *In silico* analysis of the genomes revealed the absence of transmissible antibiotic resistance genes, virulence genes associated with pathogenicity, and integrated plasmids; gene clusters encoding class I and class II bacteriocin were found. *In vitro* tests showed phosphatase, peptidase, β -galactosidase, and esterase activity of both strains, as well as their ability to ferment glucose, lactose, sucrose, and ribose. Strain Str16t metabolized mannose as well. Str16t and Str159 are promising strains for application as starter and probiotic cultures.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, probiogenomics, antibiotic resistance, carbohydrate profile, carbohydrate metabolism

ВВЕДЕНИЕ “НАТРИЕВОЙ ПОДПИСИ” В СУБЪЕДИНИЦЫ *a* И *c* ПРОТОННОЙ F-АТФазы *BACILLUS* SP. PS3 НЕ ПРИВОДИТ К ПОЯВЛЕНИЮ НАТРИЕВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

© 2024 г. С. М. Бруман^{a, b, c}, А. В. Литвин^{d, c}, А. С. Лапашина^{a, b, c}, Б. А. Фенюк^{a, b, *}

^aНИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

^bФакультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

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

^dСколковский институт науки и технологий, Москва, 121205, Россия

*e-mail: feniouk@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 14.11.2023 г.

Принята к публикации 18.11.2023 г.

У бактерий АТФаза F-типа (F-АТФаза) играет ключевую роль в биоэнергетике и сопрягает синтез/ гидролиз АТФ с транспортом ионов (H^+ или Na^+) через мембрану. Ионная специфичность фермента определяется аминокислотной последовательностью субъединиц *c* и *a*. С помощью мутагенеза в ферменте термофильной бактерии *Bacillus* sp. PS3 были сделаны замены аминокислотных остатков (7 в субъединице *c* и 6 в субъединице *a*) с целью изменить ионную специфичность фермента с протонной на натриевую. Мутации не повлияли на АТФазную активность фермента, но привели к потере протонной проводимости и нарушению связывания субъединицы *a* с олигомером *c*-субъединиц, а не к изменению ионной специфичности.

Ключевые слова: роторные АТФазы, F-АТФазы, F_0F_1 , ионная специфичность, трансмембранный перенос ионов, мутагенез

DOI: 10.31857/S0026365624030119

Роторные F-АТФазы прокариот расположены в плазматической мембране и сопрягают реакцию синтеза или гидролиза АТФ с трансмембранным переносом ионов H^+ или Na^+ . Для синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата используется энергия трансмембранной разности электрохимических потенциалов H^+ или Na^+ ($\Delta\mu_{H^+}$ или $\Delta\mu_{Na^+}$ соответственно). При гидролизе АТФ фермент выступает в роли генератора $\Delta\mu_{H^+}$ или $\Delta\mu_{Na^+}$, работая как АТФ-зависимый ионный насос. F-АТФазы состоят из двух субкомплексов — расположенного в цитоплазме F_1 , несущего сайты связывания нуклеотидов, и мембранного F_0 , осуществляющего ионный транспорт. Ключевыми элементами F_0 , непосредственно участвующими в трансмембранном переносе ионов, являются олигомерное *c*-кольцо и прилегающая к нему субъединица *a*. Каждая субъединица *c*-кольца несет сайт связывания иона, а субъединица *a* образует два несоосных полуканала, которые открываются на разные стороны мембраны и обеспечивают доступ ионов к *c*-кольцу. Перенос ионов с одной стороны мембраны на

другую сопровождается вращением кольца относительно субъединицы *a* (Zubareva et al., 2020). В отсутствие *c*-кольца субкомплекс F_1 не связывается с мембраной (Schneider, Altendorf, 1985; Bietenhader et al., 2012).

Считается, что специфичность F-АТФазы к переносимому иону (H^+ или Na^+) зависит от строения сайта связывания иона на *c*-субъединице. В работе Мулкиджаняна и соавт. (Mulikidjanian et al., 2008) была предсказана “натриевая подпись” F-АТФаз — консенсусный мотив для связывания иона Na^+ *c*-субъединицей. Однако экспериментальные попытки введения “натриевой подписи” в *c*-субъединицу протонной F-АТФазы *Escherichia coli* не привели к появлению натриевой специфичности (Zhang et al., 2005). Мы предположили, что остатки субъединицы *a*, взаимодействующие с *c*-кольцом, также могут вносить вклад в ионную специфичность фермента. Анализ множественных выравниваний последовательностей субъединиц *a* и *c* из Na^+ - и H^+ -транслоцирующих F-АТФаз

Таблица 1. Частоты встречаемости (в %) аминокислотных остатков в позициях множественного выравнивания субъединиц *a* прокариотических F-АТФаз, построенного по данным базы COG. Нумерация остатков соответствует ферменту *Bacillus* sp. PS3. Приведены позиции, по которым проводились замены в этой работе; заменяемые остатки выделены жирным. Многоточия указывают на суммарную долю всех остальных остатков в данной позиции, помимо указанных

Переносимый ион	Позиция аминокислотного остатка в F-АТФазе <i>Bacillus</i> sp. PS3					
	<i>a</i> 155	<i>a</i> 165	<i>a</i> 178	<i>a</i> 185	<i>a</i> 209	<i>a</i> 211
H ⁺	E(67) N(14) ... (19)	S(32) A(28) G(19) ... (21)	E(50) H(40) D(5) ... (5)	A(44) L(12) I(9)...(35)	I(23) A(20) L(16) G(12) ... (29)	E(42) H(28) G(11) ... (19)
Na ⁺	N(91) S(6) D(3)	S(74) A(23) T(3)	M(20) T(23) G(18) A(12) ... (27)	Y(74) S(18) ... (8)	Y(68) F(14) ... (18)	D(74) G(23) N(3)

позволил предсказать вероятную “натриевую подпись” в *a*-субъединице (табл. 1).

Целью данной работы было проверить это предсказание. Для этого мы использовали протонную F-АТФазу *Bacillus* sp. PS3, в которой заменяли “протонные подписи” в субъединицах *a* и *c* на натриевые как одновременно, так и по отдельности.

Плазмида pTR19, кодирующая все субъединицы F-АТФазы *Bacillus* sp. PS3 (TF₀F₁-WT), была любезно предоставлена профессором Тошихару Сузуки (Токийский институт технологий, Япония) (Suzuki et al. 2002). Для введения “натриевой подписи” в субъединицы *c* и *a* было введено 13 замен: 7 в субъединицу *c* (cA19P, cN23Q, cV55A, cA57S, cL58T, cP59G, cI61Y) и 6 в субъединицу *a* (aK155N, aT165S, aE178M, aA185Y, aA209Y, aS211D). Экспрессируемый с этой конструкции фермент получил название TF₀F₁-Tr12. Кроме того, мы получили варианты pTR19 с теми же заменами в субъединицах *c* (кодирует фермент TF₀F₁-Tr12-*a*WT) и *a* (фермент TF₀F₁-Tr12-*c*WT) по отдельности. Для экспрессии полученных конструкций использовали штамм *E. coli* с инактивированным опероном нативной F-АТФазы (*ΔatpB-atpC*) (Datsenko, Wanner 2000). Штаммы-трансформанты использовали для получения вывернутых суббактериальных мембранных частиц (СБЧ), согласно методике Lapashina et al. (2019).

АТФазная активность сопряженных Na⁺-транслоцирующих F-АТФаз в составе мембран зависит от концентрации ионов Na⁺ в среде (Laubinger, Dimroth, 1987). В этой связи мы

ожидали, что если бы фермент TF₀F₁-Tr12 вследствие мутаций приобрел способность к трансмембранному переносу Na⁺, то его активность была бы выше в присутствии Na⁺ и ниже в среде с заменой Na⁺ на K⁺. Мы сравнили скорости гидролиза 1 мМ АТФ в присутствии 100 мМ Na⁺ или K⁺ для СБЧ с рекомбинантными ферментами (табл. 2).

Однако влияние Na⁺ на СБЧ с TF₀F₁-Tr-12 с “натриевой подписью” в субъединицах *c* и *a* оказалось сопоставимо с таковым для TF₀F₁-WT. Это может свидетельствовать о том, что введение мутаций в фермент не привело к появлению натриевой специфичности. В ходе дальнейшей работы мы исследовали действие мутаций на протонный транспорт. Na⁺-транслоцирующие F₀F₁ способны к трансмембранному переносу протона в условиях низкой концентрации ионов натрия, поэтому эти эксперименты проводились в средах без добавления Na⁺.

Чтобы непосредственно наблюдать за переносом H⁺ через мембрану СБЧ, мы воспользовались красителем 9-амино-6-хлоро-2-метоксиакридином (АСМА), флуоресценция которого гасится при образовании градиента pH на мембране (Lapashina et al., 2019). Введение мутаций в мембранную часть F₀F₁ могло привести к появлению пассивной протонной проводимости через фермент. Чтобы проверить это экспериментально, к мембранным частицам добавляли субстрат дыхательной цепи сукцинат, а затем ингибитор сукцинатдегидрогеназы малонат. На рис. 1а видно, что и на СБЧ с TF₀F₁-WT, и на СБЧ с TF₀F₁-Tr-12 при

Таблица 2. АТФазная активность СБЧ *E. coli* с рекомбинантной F-АТФазой *Bacillus* sp. PS3 при комнатной температуре (мкмоль/мин на мг белка). Приведены рассчитанные из пяти повторов средние значения ± среднеквадратичные отклонения. Гидролиз АТФ регистрировали по закислению среды в присутствии pH-индикатора фенолового красного (Nishimura et al., 1962)

Фермент в составе СБЧ	Среда измерения	
	100 мМ K ⁺	100 мМ Na ⁺
TF ₀ F ₁ -WT дикого типа с “протонной подписью”	0.31 ± 0.10	0.59 ± 0.02
TF ₀ F ₁ -Tr12 с “натриевой подписью” в субъединицах <i>c</i> и <i>a</i>	0.41 ± 0.07	0.52 ± 0.09

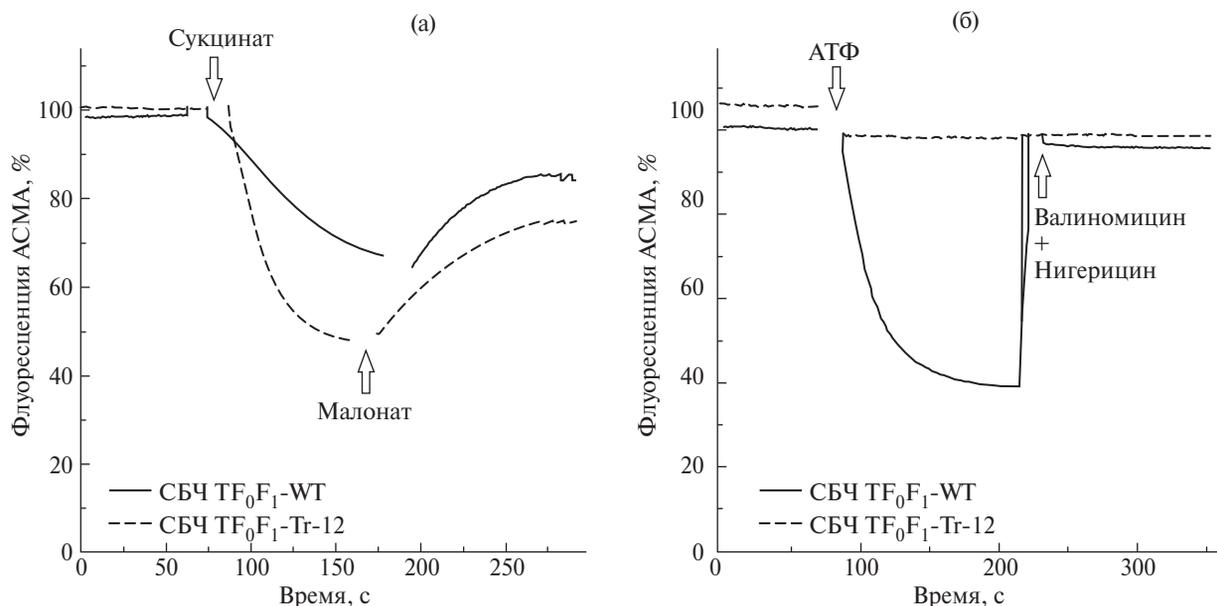


Рис. 1. Нормированная флуоресценция АСМА в присутствии мембранных частиц, содержащих TF₀F₁-WT (непрерывная кривая) или TF₀F₁-Tr-12 (прерывистая кривая). а – в кювету добавляли сукцинат натрия до 3 мМ, затем малонат натрия до 30 мМ; б – в кювету добавляли АТФ до 500 мкМ, затем смесь валиномицина и нигерицина (разбавитель) до 500 нМ каждого.

добавлении сукцината можно наблюдать гашение флуоресценции, а при добавлении малоната — ее восстановление.

Это говорит о том, что дыхательная цепь успешно генерирует градиент рН и пассивной утечки протонов через F₀-субкомплекс обеих АТФ-синтаз не происходит. Далее к СБЧ добавляли АТФ, ожидая увидеть АТФ-зависимый протонный транспорт (рис. 1б). Однако здесь гашение флуоресценции АСМА наблюдалось только на СБЧ с F₀F₁ дикого типа; последующее добавление разбавителя — смеси валиномицина и нигерицина, в присутствии которых мембрана становится проницаемой для H⁺, приводило к ожидаемому возврату флуоресцентного сигнала на исходный уровень, свидетельствующему о диссипации ΔрН. Таким образом, в то время как у фермента дикого типа гидролиз АТФ сопряжен с трансмембранным транспортом H⁺, в случае TF₀F₁-Tr-12 это, по-видимому, не так.

Чтобы дополнительно прояснить, почему СБЧ с TF₀F₁-Tr-12 неспособны к АТФ-зависимому формированию протонного градиента на мембране, мы измерили АТФазную активность СБЧ в присутствии 1 мМ дициклогексилкарбодиимида (DCCD) — ингибитора, который специфически ковалентно связывается с протон-переносящими остатками в составе F₀ (Fillingame, 1975) и блокирует протонный транспорт и вращение *c*-кольца (Тоёи, Noji, 2013). Поскольку АТФазная активность F₁ в составе интактного F₀F₁ в норме сопряжена с вращением *c*-кольца, блокировка последнего должна снижать АТФазную активность. В этом эксперименте СБЧ инкубировали с 1 мМ DCCD

при 37°C в течение 3 ч; каждые 30 мин из образца отбирали аликвоту, измеряли ее АТФазную активность и сравнивали ее с активностью аналогичного контрольного образца, не содержащего DCCD. В случае СБЧ с TF₀F₁-WT уже после первых 30 мин инкубации с DCCD наблюдалось двукратное падение активности по отношению к контролю (рис. 2а).

Однако на активность СБЧ с TF₀F₁-Tr-12 инкубация с DCCD не оказала никакого влияния даже спустя 3 ч. По всей видимости, в мутантном ферменте ковалентное связывание DCCD с *c*-субъединицей не препятствует свободному вращению *c*-кольца в ответ на добавление АТФ, что свидетельствует о нарушении взаимодействия между *c*-кольцом и субъединицей *a* и объясняет неспособность мутантного фермента к трансмембранному протонному транспорту.

Чтобы более детально разобраться в причине наблюдаемых эффектов, мы выделили и очистили из СБЧ исследуемые F₀F₁-комплексы, воспользовавшись методикой (Suzuki et al., 2002). При исследовании субъединичного состава очищенных комплексов при помощи гель-электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 2б) обнаружилось, что в случае F₀F₁-Tr-12, в отличие от F₀F₁-WT, на геле не детектируется субъединица *a*. Неясно, происходит ли потеря субъединицы *a* при сборке рекомбинантного фермента в клетке *E. coli*, или же эта субъединица теряется при очистке белка. Однако очевидно, что внесение мутаций на *c*-*a* интерфейсе F₀ привело к дестабилизации комплекса. К сожалению, мы не видели на гелях субъединицы *c* в связи

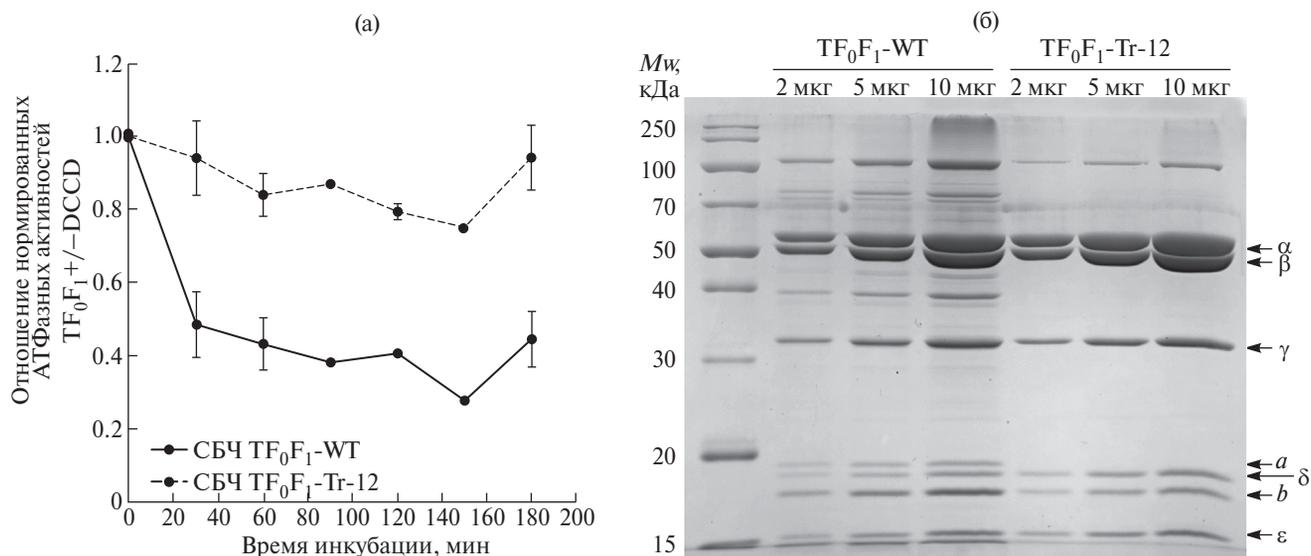


Рис. 2. а – Влияние инкубации с DCCD на АТФазную активность СБЧ с TF₀F₁-WT или TF₀F₁-Tr-12. Показаны отношения значения АТФазной активности в образце с DCCD к таковым в аналогичных контрольных образцах без DCCD. Точки, для которых показано стандартное отклонение, были воспроизведены в трех повторностях, остальные – средние, рассчитанные из двух повторов. б – субъединичный состав очищенных комплексов TF₀F₁-WT и TF₀F₁-Tr-12 (электрофорез в денатурирующих условиях в 12% полиакриламидном геле). Буквы справа указывают на отдельные субъединицы.

с ее слабым окрашиванием и с фоном детергента, однако наличие АТФазной активности в СБЧ и тот факт, что нам удалось выделить из них целый F₀F₁, говорит о нормальной сборке *c*-кольца в случае мутантной *c*-субъединицы.

Мы предположили, что F₀F₁, содержащие остатки “натриевой подписи” лишь в одной из двух исследуемых субъединиц (*c* или *a*; TF₀F₁-Tr-12-*a*WT или TF₀F₁-Tr-12-*c*WT соответственно), могут оказаться более стабильными, чем фермент, в котором замены были введены в обе субъединицы. Однако наблюдения за протонным транспортом при помощи АСМА показали, что СБЧ, содержащие такие ферменты, подобно описанным выше СБЧ с TF₀F₁-Tr-12, неспособны к АТФ-зависимой генерации протонного градиента на мембране. Анализ субъединичного состава очищенных TF₀F₁-Tr-12-*a*WT или TF₀F₁-Tr-12-*c*WT, проведенный с помощью SDS-PAGE, вновь показал отсутствие субъединицы *a*. Стоит также отметить, что АТФазная активность СБЧ с TF₀F₁-Tr-12-*a*WT (0.39 ед./мг) в присутствии 1 мМ АТФ была близка к активности частиц с TF₀F₁-WT (см. табл. 2), а активность СБЧ с TF₀F₁-Tr-12-*c*WT оказалась на порядок ниже и составила 0.04 ед./мг. Вероятно, введение “натриевой подписи” только в субъединицу *a* дестабилизирует фермент еще сильнее, чем мутагенез обеих субъединиц.

Таким образом, введение в субъединицы *a* и *c* протонной F₀F₁-АТФазы *Bacillus* sp. PS3 остатков, характерных для Na⁺-зависимых F-АТФаз, не привело к появлению способности к трансмембранному переносу ионов натрия. Более того,

введение этих замен как в обе субъединицы, так и по отдельности, значительно дестабилизировало фермент.

Использованный в работе подход имеет как свои плюсы, так и минусы. К первым можно отнести относительную простоту дизайна, быстроту выполнения экспериментов и убедительность данных в случае положительного результата. Однако важным минусом использованного подхода является высокий уровень риска: одновременная замена 13 аминокислотных остатков в консервативной части фермента с большой вероятностью может вызвать проблемы со сборкой и функцией, что и было обнаружено в результате нашей работы. Альтернативный подход — проведение последовательного мутагенеза отдельных остатков и выяснение их роли в процессе сборки фермента и ионном транспорте — избавлен от этого недостатка, но представляет собой работу гораздо более трудоемкую, чем данное исследование. Возможно, плодотворным окажется более тщательный анализ сочетаний конкретных аминокислотных остатков “натриевой подписи”, а не анализ частоты встречаемости каждого из них по отдельности, как было сделано в данной работе. В будущем мы планируем провести такой анализ на большем объеме бактериальных геномов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом РФФ № 21-14-00242.

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

- Bietenhader M., Martos A., Tetaud E., Aiyar R. S., Sell-em C. H., Kucharczyk R., et al.* Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. Art. e1002876.
- Datsenko K. A., Wanner B. L.* One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 6640–6645.
- Fillingame R. H.* Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein component of the adenosine 5'-triphosphate energy-transducing system of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1975. V. 124. P. 870–883.
- Lapashina A. S., Shugaeva T. E., Berezina K. M., Kholina T. D., Feniouk B. A.* Amino acid residues β 139, β 189, and β 319 modulate ADP-inhibition in *Escherichia coli* H⁺-FF-ATP synthase // *Biochemistry (Moscow).* 2019. V. 84. P. 407–415.
- Laubinger W., Dimroth P.* Characterization of the Na⁺-stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the F₁F₀ type // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 168. P. 475–480.
- Mulkiidjanian A. Y., Galperin M. Y., Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V.* Evolutionary primacy of sodium bioenergetics // *Biol. Direct.* 2008. V. 3. Art. 13. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-13>
- Nishimura M., Ito T., Chance B.* Studies on bacterial photophosphorylation. III. A sensitive and rapid method of determination of photophosphorylation // *Biochim. Biophys. Acta.* 1962. V. 59. P. 177–182.
- Schneider E., Altendorf K.* All three subunits are required for the reconstitution of an active proton channel (F₀) of *Escherichia coli* ATP Synthase (F₁F₀) // *EMBO J.* 1985. V. 4. P. 515–518.
- Suzuki T., Ueno H., Mitome N., Suzuki J., Yoshida M.* F₀ of ATP synthase is a rotary proton channel: obligatory coupling of proton translocation with rotation of *c*-subunit ring // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 13281–13285.
- Toei M., Noji H.* Single-molecule analysis of F₀F₁-ATP synthase inhibited by *N, N*-dicyclohexylcarbodiimide // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 25717–25726.
- Zhang Y., Fillingame R. H.* Changing the ion binding specificity of the *Escherichia coli* H⁽⁺⁾-transporting ATP synthase by directed mutagenesis of subunit *c* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 87–93.
- Zubareva V. M., Lapashina A. S., Shugaeva T. E., Litvin A. V., Feniouk B. A.* Rotary ion-translocating ATPases/ATP synthases: diversity, similarities, and differences // *Biochemistry (Moscow).* 2020. V. 85. P. 1613–1630.

SHORT COMMUNICATIONS

Introduction of a Sodium-Binding Motif into Subunits *a* and *c* of *Bacillus* sp. PS3 Proton F-ATPase Does Not Result in Sodium Specificity of the Enzyme

S. M. Bruman^{1, 2, 3}, A. V. Litvin^{4, 3}, A. S. Lapashina^{1, 2, 3}, and B. A. Feniouk^{1, 2, *}

¹Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

⁴Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

*e-mail: feniouk@belozersky.msu.ru

Received October 14, 2023; revised November 14, 2023; accepted November 18, 2023

Abstract—In bacteria F-type ATPase (F-ATPase) plays a key role in bioenergetics and couples ATP synthesis/hydrolysis with the transport of ions (H⁺ or Na⁺) across the membrane. The ion specificity of the enzyme is determined by the amino acid sequence of subunits *c* and *a*. Here, we introduced several mutations (7 in subunit *c* and 6 in subunit *a*) into F-ATPase of thermophilic bacterium *Bacillus* sp. PS3 in order to change the ion specificity of the enzyme from proton to sodium. The mutations did not affect the ATPase activity of the enzyme, but led to loss of proton conductivity and impaired the binding of subunit *a* to the *c*-subunit oligomer, rather than changed the ion specificity.

Keywords: rotary ATPases, F-ATPases, F₀F₁, ion specificity, transmembrane ion transport, mutagenesis

УДК 574.589

МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ В ГРУНТАХ МОРЕЙ ВОСТОЧНО-СИБИРСКОГО И ЛАПТЕВЫХ

© 2024 г. М. Л. Георгиева^{a, b, *}, Е. Н. Биланенко^a, А. А. Георгиев^a, Е. Н. Бубнова^a

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

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

*e-mail: i-marina@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 19.11.2023 г.

Принята к публикации 22.11.2023 г.

Впервые представлены сведения о численности и разнообразии культивируемых мицелиальных грибов, а также численности дрожжей в донных грунтах морей Лаптевых и Восточно-Сибирском. Из 35 проб грунта двух морей было выделено всего 63 изолята мицелиальных грибов, относящихся к 32 морфотипам. Большинство морфотипов отмечены единичными колониями в отдельных образцах, чаще других выделялись *Pseudeurotium zonatum*, *Pseudogymnoascus pannorum* и *Cordyceps farinosa*. Численность мицелиальных грибов была ниже (до 12 колоний на 1 г), чем у дрожжей (до 68 колоний на 1 г) в обоих морях. В море Лаптевых численность грибов была равномерно низкой на всех станциях, в Восточно-Сибирском море более высокие значения отмечены на приэстуарных участках.

Ключевые слова: морские грибы, дрожжи, морские донные осадки, арктические моря, Восточно-Сибирское море, море Лаптевых

DOI: 10.31857/S0026365624030121

Микобиота в различных областях мирового океана исследована крайне неравномерно. Хотя в арктических морях есть районы, где проводились неоднократные и разноплановые исследования грибов (например, в Баренцевом и Белом морях), в целом, арктическая морская микобиота до сих пор остается одной из наименее изученных (Rama et al., 2017). По большинству морей российского сектора Арктики сведения содержатся в единичных работах. Так, например, для Карского моря имеются сведения о разнообразии культивируемых грибов в донных осадках (Bubnova, 2010; Bubnova, Nikitin, 2017) и в воде (Кирцидели и соавт., 2012); для моря Лаптевых — в воде (Кирцидели и соавт., 2012); для Чукотского — в донных осадках (Bubnova, Konovalova, 2019; Luo et al., 2020). Для Восточно-Сибирского моря до сих пор отсутствовали сведения о разнообразии мицелиальных грибов. Поэтому основной целью нашей работы было изучение численности и разнообразия культивируемых мицелиальных грибов и численности дрожжей в донных грунтах неисследованных ранее районов в морях Лаптевых и Восточно-Сибирском.

Образцы грунтов отбирали в морях Лаптевых и Восточно-Сибирском в 69 рейсе НИС “Академик

Мстислав Келдыш” (АМК69) в августе–октябре 2017 года (Flint et al., 2018). Часть работ по материалам, собранным в этом рейсе, уже опубликованы: например, результаты изучения бактериопланктона (Bezzubova et al., 2020) и мейобентоса (Portnova et al., 2021). В этих же работах приводятся подробные характеристики станций, включенных и в наше исследование. Материалом для нашей работы послужили образцы грунтов, отобранные на 15 станциях в море Лаптевых (номера станций: 5590, 5591, 5591–2, 5592, 5596, 5623–1, 5623–2, 5624–1, 5624–2, 5625, 5627, 5630, 5632, 5635, 5636) и на 12 станциях в Восточно-Сибирском море (номера станций: 5598, 5600, 5602, 5604, 5605, 5606, 5607, 5612, 5613, 5615, 5617, 5619) (рис. 1).

Для исследования микобиоты отбирали по одному образцу с каждой станции. Все исследованные 27 станций относительно мелководные, расположены в шельфовой зоне, на глубинах до 60 м. Также были проанализированы 8 образцов, полученных из ЦМИ МГУ, отобранных в сентябре 2017 года в Восточно-Сибирском море на двух станциях, по 4 образца с каждой: “станция 1” (71°26'12" с.ш. 167°49'18" в.д.) на глубине 24 м и “станция 2” (71°23'26" с.ш. 169°5'2" в.д.) на глубине 42 м (рис. 1).

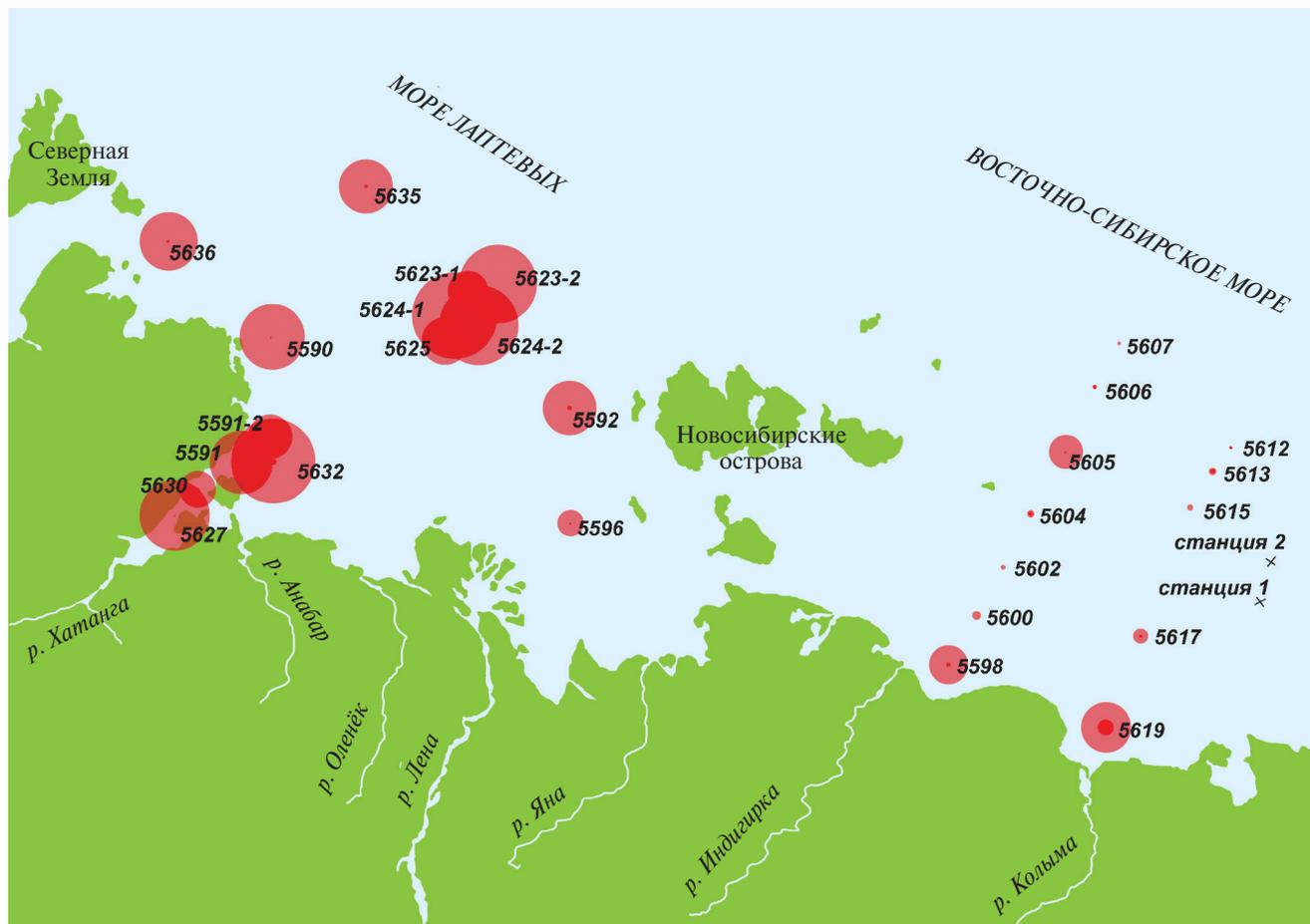


Рис. 1. Схема расположения станций 69 рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш”. Диаметр меток пропорционален численности грибов в 1 г грунта на каждой из станций: более светлый круг – численности дрожжей, более темный – мицелиальных грибов. Отмечены также станции рейса ЦМИ МГУ – “станция 1” и “станция 2”.

Образцы (35 штук) отбирали из верхних 2 см грунта, поднятого дночерпателем, в стерильные бумажные конверты, подсушивали и хранили в холодильнике при 6°C до обработки.

Для выделения грибов использовали метод комочков. Посевы проводили на агаризованные питательные среды: сусло-агар с морской солью (материалы АМК69 и ЦМИ МГУ; на 1 л – ячменно-солодовой концентрат ТУ 9185-020-93454900-12 из расчета 2 г общего содержания сахаров, 20 г соли морской для аквариумов Red Sea Salt, RS, Israel, 15 г агара); сусло-агар (материалы ЦМИ МГУ; солодовый экстракт 15°Б – 200 мл; дрожжевой экстракт – 1 г; дистиллированная вода – 800 мл) и на среду ВУ с морской солью (материалы АМК69; на 1 л: пептон – 1 г; дрожжевой экстракт – 1 г; глюкоза – 5 г, 20 г соли морской для аквариумов Red Sea Salt, RS, Israel, 15 г агара). Во все среды добавляли антибиотик Цефатоксим, 0.8 г/л. На каждую из сред в чашках Петри распределяли по 0.5 г образца. Выросшие колонии подсчитывали и выделяли чистые культуры через 5–6 недель инкубации посевов при температуре 6°C. Идентифицировали

культуры по морфолого-культуральным признакам, таксономическое положение уточняли по базе Mucobank Database (mucobank.org).

Мицелиальные грибы были выделены из всех образцов грунтов, кроме станций 5623–1 и 5623–2 из моря Лаптевых и 5600, 5607 и 5615 из Восточно-Сибирского моря рейса АМК69, и всех образцов со “станции 2” из ЦМИ МГУ. Численность мицелиальных микромицетов была крайне низкой: среднее значение в грунтах моря Лаптевых менее 2 на 1 г (табл. 1), при этом с большинства станций выделилось всего по 1 колонии, а максимум (по 4 колонии) со станций 5624–2 и 5632 (рис. 1).

Среднее значение численности мицелиальных грибов в грунтах Восточно-Сибирского моря немного выше, из большинства образцов выделялось 1–3 колонии, и только из одного образца (станция 5619 в эстуарии Колымы) выделилось 12 колоний (рис. 1). Дрожжи выделялись со всех станций, кроме 5612 АМК69 и обеих станций ЦМИ МГУ. Численность дрожжей почти во всех случаях была на порядок выше численности мицелиальных грибов (рис. 1). В море Лаптевых численность дрожжей

варьировала от 21 до 68 колоний на 1 г, в среднем составляя около 47 на 1 г. В Восточно-Сибирском море численность дрожжей варьировала от 0 до 40 колоний на 1 г, в среднем составляя около 12 на 1 г (табл. 1; рис. 1). Распределение численности мицелиальных грибов и дрожжей было относительно равномерным в грунтах моря Лаптевых. В Восточно-Сибирском море наибольшие значения численности грибов показаны для приэстуарных станций рек Колыма и Индигирка, и в основном резко уменьшаются при удалении от берега (рис. 1).

Полученные значения численности мицелиальных грибов являются низкими даже для арктических морей. В прибрежных районах, особенно

в приэстуарных, численность грибов может достигать десятков и даже сотен на грамм, как, например, в Обской губе Карского моря (Bubnova, 2010). Более низкие значения приурочены, в основном, к удаленным от побережья районам исследованных ранее морей (Bubnova, 2010; Bubnova, Nikitin, 2017; Bubnova, Konovalova, 2019; Luo et al., 2020) и обычно связаны с экстремально неблагоприятными условиями обитания для грибов – низкими температурами и очень небольшим количеством органики. Моря Лаптевых и Восточно-Сибирское различаются по гидрологии и климату (Marchenko, 2012). С одной стороны, море Лаптевых – одно из наиболее суровых морей, одинаково удаленное от более

Таблица 1. Таксономический состав мицелиальных грибов в донных грунтах морей Лаптевых и Восточно-Сибирском

Названия таксонов	АМК69 Лапт	АМК69 В-С	ЦМИ В-С
ASCOMYCOTA			
Dothideomycetes:			
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries		1 / 1	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.		1 / 1	
Eurotiomycetes:			
<i>Aspergillus glaucus</i> (L.) Link			1 / 1
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	3 / 3	1 / 1	
<i>Penicillium frequentans</i> Westling	1 / 1		
<i>Penicillium lanosum</i> Westling		2 / 2	
<i>Talaromyces</i> sp.			1 / 1
Leotiomycetes:			
<i>Cadophora luteo-olivaceae</i> (J.F.H. Beyma) T. C. Harr. & McNew	1 / 1	1 / 1	
<i>Oidiodendron tenuissimum</i> (Peck) S. Hughes			1 / 1
<i>Pseudeurotium zonatum</i> J.F.H. Beyma	5 / 4	2 / 2	
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (Link) Minnis & D. L. Lindner	3 / 2	4 / 3	
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.			1 / 1
Sordariomycetes:			
<i>Acremonium charticola</i> (Lindau) W. Gams	1 / 1		
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.	2 / 1	3 / 1	
<i>Chaetomium</i> sp. 1		3 / 2	
<i>Chaetomium</i> sp. 2	1 / 1		
<i>Cordyceps farinosa</i> (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha & Spatafora	3 / 2	4 / 3	
<i>Gliomastix murorum</i> (Corda) S. Hughes		2 / 1	
<i>Tolyposcladium inflatum</i> W. Gams			1 / 1
Неидентифицированные морфотипы:			
Темноокрашенные стерильные морфотипы		1 / 1	2 / 2
Светлоокрашенные стерильные морфотипы	4 / 4	5 / 4	2 / 1
Всего морфотипов мицелиальных грибов	13	17	8
Всего изолятов мицелиальных грибов	24	30	9
Численность дрожжей	702	143	0
Всего образцов	15	12	8

Примечание. АМК69 Лапт – в образцах, отобранных в 69 рейсе НИС “Академик Мстислав Келдыш” в море Лаптевых; АМК69 В-С – в образцах, отобранных в 69 рейсе НИС “Академик Мстислав Келдыш” в Восточно-Сибирском море; ЦМИ В-С – в образцах, предоставленных ЦМИ МГУ из Восточно-Сибирского моря. Для каждого морфотипа указаны: общее число выросших колоний / число образцов, из которых данный морфотип выделился.

теплых вод как Атлантики, так и Тихого океана. С другой стороны, пресный сток в это море — один из самых значительных в Арктике, и речные воды, вместе с несомыми ими осадками, распространяются очень широко по шельфу в этом районе. Восточно-Сибирское море может быть несколько мягче по климату за счет близости к водам Тихого океана, но пресный сток в него в три раза ниже стока в море Лаптевых, и не наблюдается такого широкого распространения речных вод и осадков по бассейну этого моря. Учитывая, что большинство выделенных нами видов, видимо, имеют почвенное происхождение, можно предположить их поступление в моря с речными водами. Таким образом, выраженность эстуарного эффекта на сообщества грибов в Восточно-Сибирском и невыраженность его в море Лаптевых может быть связана с различиями в особенностях гидрологии этих морей.

Разнообразие микобиоты относительно высокое для такой низкой численности. Всего было выделено 32 морфотипа, из которых 15 идентифицировали до вида и 4 — до уровня рода, а также стерильные светло- (10 морфотипов) и темноокрашенные (3 морфотипа) морфотипы (табл. 1). Идентифицированные виды и роды относились к четырем классам аскомицетов: Dothideomycetes (2 вида), Eurotiomycetes (5), Leotiomycetes (5) и Sordariomycetes (7). Большинство морфотипов было выделено единичными колониями из отдельных образцов. Среди выявленных видов, шесть были обнаружены в обоих морях: *Penicillium chrysogenum*, *Cadophora luteo-olivaceae*, *Pseudeurotium zonatum*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Chaetomium globosum* и *Cordyceps farinosa*. Наибольшая встречаемость отмечена для *P. zonatum*, *P. pannorum* и *C. farinosa*.

Высокое разнообразие при незначительной численности, видимо, является обычной картиной для арктических морских экосистем (Bubnova, Nikitin, 2017; Bubnova, Konovalova, 2019; Hagestad et al., 2019; Luo et al., 2020). Среди идентифицированных культур большая часть принадлежит к леоциевым и сордариевым, что согласуется с полученными ранее данными для некоторых арктических морей, как по результатам культуральных (Bubnova, Konovalova, 2019), так и метагеномных (Rama et al., 2017) работ. Наиболее часто выделившиеся в нашем исследовании виды — *Pseudeurotium zonatum*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *Penicillium chrysogenum* — широко распространены в различных почвах умеренных и холодных регионов, также отмечались и в арктических морях, в основном в прибрежных районах (Domsh et al., 2007; Bubnova, 2010; Кирцидели и др., 2012; Luo et al., 2020). Интересными являются находки на пяти станциях *Cordyceps farinosa* (в виде анаморфы), ранее известного ассоциациями с беспозвоночными животными (Domsh et al., 2007). Однако мы не обнаружили связи его находок с богатством

мейофауны (Portnova et al., 2021) на тех же станциях. Относительно высокая численность и разнообразие представителей рода *Chaetomium* в наших образцах необычны для морских экосистем и отмечаются только в работе по грунтам Чукотского моря (Bubnova, Konovalova, 2019).

Итак, впервые было исследовано разнообразие биоты культивируемых мицелиальных грибов в грунтах одних из наиболее суровых морей Арктики — Лаптевых и Восточно-Сибирском. Была обнаружена чрезвычайно низкая численность микобиоты при ее довольно высоком разнообразии. Наиболее часто встречаемые виды *Pseudeurotium zonatum* и *Pseudogymnoascus pannorum*, виды родов *Penicillium*, *Chaetomium* обычны для микобиоты холодных регионов, в том числе и для морских экосистем. Высокая численность дрожжей практически во всех исследованных образцах этих морей указывает на их значимую роль в донных сообществах, которую еще только предстоит изучить.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Дарье Андреевне Портновой (Институт океанологии им. П. П. Ширшова РАН) за отбор материала для исследования в 69 рейсе НИС “Академик Мстислав Келдыш” и сотрудникам ЦМИ МГУ за предоставленные образцы грунта Восточно-Сибирского моря.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Подготовка публикации выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1396). Идентификация грибов выполнена в рамках тем государственных заданий № 121032300079-4 “Экофизиология, цитология и генетика грибов как основа рационального природопользования и биотехнологий” и № 121032500077-8 “Разнообразие, структура и функционирование морских и прибрежных экосистем”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кирцидели И. Ю., Власов Д. Ю., Баранцевич Е. П., Крыленков В. А., Соколов В. Т. Распространение терригенных микромицетов в водах арктических морей // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46. С. 306–310.
- Bezzubova E. M., Seliverstova A. M., Zamyatin I. A., Romanova N. D. Heterotrophic bacterioplankton of the

- Laptev and East Siberian Sea shelf affected by freshwater inflow areas // *Oceanology*. 2020. V. 60. P. 62–73.
- Bubnova E. N. Fungal diversity in bottom sediments of the Kara Sea // *Botanica Marina*. 2010. V. 53. P. 595–600.
- Bubnova E. N., Konovalova O. P. Fungi in bottom sediments of the Chukchi Sea // *Russ. J. Mar. Biol.* 2019. V. 45. P. 86–95.
- Bubnova E. N., Nikitin D. A. Fungi in bottom sediments of the Barents and Kara seas // *Russ. J. Mar. Biol.* 2017. V. 43. P. 400–406.
- Domsh K. H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi. Eching: IHW-Verlag, 2007. 859 p.
- Flint M. V., Poyarkov S. G., Rymsky-Korsakov N. A. Ecosystems of the Siberian Arctic Seas-2017 (Cruise 69 of the R/V Akademik Mstislav Keldysh) // *Oceanology*. 2018. V. 58. P. 315–318.
- Hagestad O. C., Andersen J. H., Altermark B., Hansen E., Rama T. Cultivable marine fungi from the Arctic Archipelago of Svalbard and their antibacterial activity // *Mycology*. 2019. V. 11. P. 230–242.
- Luo E., Xu W., Luo Z.-H., Pang K.-L. Diversity and temperature adaptability of cultivable fungi in marine sediments from the Chukchi Sea // *Botanica Marina*. 2020. V. 63. P. 197–207.
- Marchenko N. Russian arctic seas: navigation conditions and accidents. Berlin–Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. 251 p.
- Portnova D. A., Garlitska L. A., Polukhin A. A. The effect of estuarine system on the meiofauna and nematodes in the East Siberian Sea // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 19306.
- Rama T., Hassett B. T., Bubnova E. Arctic marine fungi: from filaments and flagella to operational taxonomic units and beyond // *Botanica Marina*. 2017. V. 60. P. 433–452.

 SHORT COMMUNICATIONS

Filamentous Fungi in the Sediments of the East Siberian and Laptev Seas

M. L. Georgieva^{1, 2, *}, E. N. Bilanenko¹, A. A. Georgiev¹, and E. N. Bubnova¹

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

²*Gauze Institute for New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia*

*e-mail: i-marina@yandex.ru

Received October 16, 2023; revised November 19, 2023; accepted November 22, 2023

Abstract—This is the first report on abundance and diversity of cultured yeasts and filamentous fungi in the sediments of the Laptev and East Siberian seas. A total of 63 isolates of mycelial fungi belonging to 32 morphotypes were obtained from 35 sediment samples. Most morphotypes were represented by single colonies in individual samples; the most often occurring species were *Pseudeurotium zonatum*, *Pseudogymnoascus pannorum*, and *Cordyceps farinosa*. In both seas, abundance of filamentous fungi (up to 12 colonies per 1 g wet sediment) was lower than that of yeasts (up to 68 colonies per 1 g wet sediment). In the Laptev Sea, yeast abundance was low at all stations, while in the East Siberian Sea higher values were found at near-estuarine stations.

Keywords: marine fungi, yeasts, marine sediments, Arctic seas, East Siberian Sea, Laptev Sea

УДК 579.222+577.151.63

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕН АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ Ser-911 И Thr-912 В H⁺-АТФазе ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ЕЕ АКТИВНОСТЬ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФОСФАТОВ

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

*e-mail: vpetrov07@gmail.com

Поступила в редакцию 08.11.2023 г.

После исправления 28.11.2023 г.

Принята к опубликованию 22.12.2023 г.

Жизненно важный фермент метаболизма дрожжей H⁺-АТФаза плазматической мембраны (PMA1) фосфорилируется в процессе фолдинга и функционирования. Основными сайтами фосфорилирования являются Ser-911 и Thr-912 в С-концевом регуляторном домене. В работе использовали дикую и мутантные формы фермента с заменами этих аминокислотных остатков на Ala или Asp для определения их роли в функционировании АТФазы и распределении полифосфатов (полиР) по фракциям. На целых клетках определяли ростовые параметры, содержание АТФ и распределение полиР *in situ*. Для определения АТФазной активности *in vitro* выделяли плазматические мембраны, содержащие фермент дикого типа и мутантные формы. Мутанты S911D, T912D и S911D/T912A обладали АТФазной активностью, близкой к дикому типу; мутант S911A обладал повышенной активностью. Скорость роста штаммов S911D, T912D и S911D/T912A была ниже в 2.0–3.0 раза, чем у дикого типа, у S911A скорость роста была близкой дикому типу. Мутации S911D и S911D/T912A вызывали снижение содержания АТФ в 2.0–2.5 раза. Все замены влияли на распределение полиР по фракциям. Влияние зависело от химической природы замены: в случае замены на Asp, меняющей тип фосфосайта, происходило уменьшение фракции полиР1 и увеличение фракции полиР2; при замене на Ala, удаляющей фосфосайт, эффект был противоположный. Содержание фракции полиР3 увеличивалось у всех мутантов. Данные указывают на то, что остатки Ser-911 и Thr-912 важны не только для нормального функционирования PMA1 H⁺-АТФазы, но и для регулирования фосфорного и энергетического метаболизма.

Ключевые слова: полифосфаты, PMA1 H⁺-АТФаза, плазматическая мембрана, *Saccharomyces cerevisiae*, дрожжи

DOI: 10.31857/S0026365624030138

В дополнение к главному источнику энергии — АТФ, клетки дрожжей (и многих других микро- и макроорганизмов) содержат неорганические полифосфаты (полиР), макроэргические соединения, которые когда-то считали просто хранилищем фосфата (Kulaev et al., 2004; Кулаев и соавт., 2005). Сейчас ясно, что функции этих ортофосфатных полимеров гораздо более сложны и разнообразны. Как написано в одной из работ — “Inorganic polyphosphate is a ubiquitous polymer with myriad roles in cell and organismal physiology” (Sanchez et al., 2023). Не отвлекаясь на “мириад ролей”, заметим, что полиР являются одним из субстратов энергетического и фосфорного метаболизма (Kulaev et al., 2004) и, в частности, могут участвовать в фосфорилировании белков в бактериях (Кулаев и соавт., 2005) и дрожжах (Azevedo

et al., 2015). Вместе с тем, АТФ остается главным компонентом энергетического метаболизма и донором фосфата при фосфорилировании; предполагается, что АТФ может использоваться для синтеза полиР (Hothorn et al., 2009) и наоборот (Beauvoit et al., 1989). Стоит отметить, однако, что взаимосвязь метаболизма АТФ и полиР и, в частности, влияние функционирования фермента, гидролизующего АТФ, на полифосфатный обмен остается мало изученным.

Таким жизненно важным ферментом дрожжевой клетки является H⁺-АТФаза плазматической мембраны (PMA1, Plasma Membrane ATPase), кодируемая геном *PMA1*, нокаут которого для клетки летален. Этот фермент является протонным насосом, который, гидролизую АТФ, выбрасывает

протоны из клетки, создавая электрохимический градиент ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), энергия которого используется для поддержания работы систем вторичного транспорта веществ. Фермент является мономером (могущим образовывать олигомеры, см. Heit et al., 2021) с молекулярной массой около 100 кД, распределенной между пятью каталитическими доменами, один из которых является регуляторным, расположенным в цитозольной С-концевой части фермента.

Функционирование АТФазы и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы и других ферментируемых сахаров: при их сбраживании фермент многократно активируется (Serrano, 1983; Syhrova, Kotyk, 1985; Огороков, Петров, 1986). При этом происходит множественное регуляторное фосфорилирование молекулы PMA1 АТФазы по остаткам Ser (в основном) и Thr (Chang, Slayman, 1991). Предполагается, что в процессе созревания фермента и его внутриклеточного трафика фосфорилируются около 10 таких аминокислотных остатков, роль которых установлена только для трех (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015). Показано, что глюкозо-зависимая регуляция активности H⁺-АТФазы дрожжей в основном связана с фосфорилированием tandemно расположенных в С-концевом регуляторном домене остатков Ser-911 и Thr-912 (Lecchi et al., 2005, 2007); вовлеченность остальных потенциальных фосфосайтов в этот процесс до конца не установлена. Таким образом, представлялось важным выяснить, влияют ли замены этих фосфорилируемых остатков на активность фермента и распределение полиР — иными словами, есть ли связь между функционированием АТФазы и метаболизмом полиР.

Целью работы являлось изучение влияния точечных замен аминокислотных остатков Ser-911 и Thr-912 в С-концевом участке H⁺-АТФазы плазматической мембраны на ее активность и фосфорный метаболизм на примере полифосфатов.

Представленная работа является частью систематического исследования структурно-функциональной организации PMA1 АТФазы и энергетического обмена у дрожжей. Были использованы мутанты (табл. 1), несущие точечные замены полирных остатков Ser-911 и Thr-912 на нейтральный

и нефосфорилируемый Ala (S911A и T912A) или на несущий заряд и потенциально фосфорилируемый Asp (S911D и T912D).

В первом случае фосфосайты, имеющие фосфоэфирную связь, удаляли. В последнем случае замены позволяли частично имитировать свойства фосфорилируемых Ser-911 и Thr-912 — при создании новых потенциальных фосфосайтов Asp-911 и Asp-912 происходила замена фосфоэфирной связи на ацилфосфатную. Мутант T912A не обладал достаточной активностью, поэтому вместо него изучали двойной мутант S911D/T912A. Предметом исследования были ростовые характеристики мутантов, содержание АТФ, активность АТФазы и распределение полиР по фракциям.

У использованных в работе штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* NY13 (MATa *ura3–52*) ген PMA1 контролировался нативным промотором P_{PMA1} (P_{PMA1}-PMA1) и был связан с селективным маркером URA3 (Guegria et al., 2007; Петров, 2010). Производные от него штаммы несли мутации в гене PMA1, кодирующие точечные замены аминокислотных остатков Ser-911 и Thr-912, как описано ранее (Lecchi et al., 2005). Штаммы были любезно предоставлены проф. К. И. Слейман (Йельский университет, США). Культуры дрожжей поддерживали на агаризованной среде, содержащей 2%-ную глюкозу, 6,7 г/л YNB (“Difco”, США), 20 мг/л гистидина. Штаммы дрожжей выращивали на качалке при 30°C на жидкой среде того же состава до середины логарифмической фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием, промывали водой и инкубировали с 2%-ной глюкозой. Затем клетки вновь осаждали и разрушали с использованием аппарата French Press и выделяли плазматические мембраны с использованием дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Препарат, обогащенный плазматическими мембранами, промывали 1 мМ буфером EGTA-Tris, pH 7.5, содержащим ингибиторы протеаз (2 мкг/мл хеомстатина и лейпептина, 1 мкг/мл пепстатина и апротинина) и ресуспендировали в том же буфере. Выделенные плазматические мембраны использовали для определения уровня активности. Все препаративные процедуры выполняли при 0–4°C.

Измерение активности АТФазы проводили в препаратах плазматических мембран при 30°C в 0.5 мл инкубационной смеси, содержащей 10 мМ MgSO₄, 5 мМ Na₂АТФ, 50 мМ MES-Tris pH 6.25, 5 мМ KN₃, 5 мМ фосфоенолпирувата и 50 мкг/мл пируват киназы в присутствии и в отсутствие 100 мкМ специфического ингибитора Na₃VO₄. Активность PMA1 АТФазы рассчитывали по ванадат-чувствительной части ортофосфата, образующегося при гидролизе АТФ.

Содержание АТФ определяли с помощью люциферин-люциферазного набора для определения

Таблица 1. Штаммы *S. cerevisiae*, использованные в работе

Штамм	Остаток в положении	
	911	912
Дикий	Ser	Thr
S911A	Ala	Thr
S911D	Asp	Thr
S911D/T912A	Asp	Ala
T912D	Ser	Asp

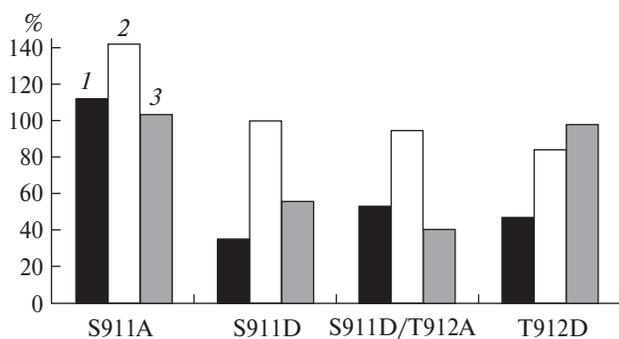


Рис. 1. Скорость роста, активности H^+ -АТФазы плазматической мембраны и содержание АТФ у штаммов *S. cerevisiae* S911A, S911D, S911D/T912A и T912D в% от данных родительского штамма. Представлены средние данные из 3–6 экспериментов. 100% соответствовали: 0.17 ч^{-1} (скорость роста), $7.65 \text{ мкмоль } P_i/\text{мин}/\text{мг}$ белка (АТФазная активность), $0.95 \text{ мкмоль АТФ}/\text{г}$ сырого веса (содержание АТФ). Обозначения: 1 — скорость роста, 2 — АТФазная активность, 3 — содержание АТФ.

АТФ (“Sigma-Aldrich”, США) согласно протоколу производителя на люминометре 1250 (“LKB”, Швеция).

Фракции полиР последовательно экстрагировали из клеток, выращенных до середины логарифмической фазы роста, как описано ранее (Вагабов и соавт., 2000). Были получены короткоцепочечная кислоторастворимая фракция полиР1 (≤ 25 остатков) и среднецепочечные солерастворимая полиР2 (45–70 остатков) и щелочерастворимая полиР3 (90–115 остатков); содержание полиР этих фракций определяли по лабильному фосфору (Вагабов и соавт., 2000).

Для определения ростовых параметров штаммы выращивали на жидкой среде YNB (см. выше) при 30°C с постоянным перемешиванием на качалке. Для определения скорости роста каждый час отбирали пробы и измеряли оптическую плотность при 600 нм (OD_{600}). Все мутации, кроме S911A, заметно, в 2–3 раза, снижали скорость роста (рис. 1).

Напротив, в случае S911A скорость роста была даже немного выше, чем у дикого типа. Вместе с тем изменения OD_{600} в стационарной фазе были не так значительны (не иллюстрируется). Эти данные позволяют предположить, что внесенные мутации могут заметно влиять на энергетический/фосфорный обмен и на клеточный метаболизм в целом, однако клетка имеет механизмы, позволяющие уменьшить или даже нейтрализовать негативное влияние этих замен, что косвенно подтверждает отсутствие снижения АТФазной активности у изучаемых мутантов (см. ниже).

Чтобы оценить энергетическое состояние клетки, в тех же штаммах измеряли содержание АТФ *in situ*. Как видно из рис. 1, в двух случаях содержание АТФ не изменялось (S911A и T912D), зато

в двух других случаях содержание АТФ уменьшалось в 2–2.5 раза (S911D и S911D/T912A). Сама активность РМА1 АТФазы при этом не влияла на уровень АТФ.

Различие в действии мутаций на содержание АТФ может свидетельствовать о необратимом фосфорилировании остатка Asp-911 в мутантах S911D и S911D/T912A. В случае Asp-912 в мутанте T912D замена не влияет на содержание АТФ, а сам замененный остаток, видимо, фосфорилируется обратимо — так же, как и присутствующий в ферменте остаток Ser-911. Можно также предположить, что аспартильная замена Asp-911 при этом нарушает сопряжение гидролиза АТФ и транспорта ионов H^+ , вызывая изменение стехиометрии этого процесса и нарушая формирование $\Delta\mu_{H^+}$, как это наблюдалось при замене аминокислотного остатка Glu-803 в трансмембранном сегменте M8 (Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007). Так, замены этого остатка, являющегося частью сайта транспорта ионов H^+ , вызывали разнообразные и масштабные изменения в структурно-функциональной организации фермента: от блокирования биогенеза (E803S, E803L) или значительного подавления экспрессирования (E803D, E803C) до потери АТФ-гидролазной активности экспрессированного на уровне дикого типа фермента (E803R), и от сверхсопряжения (E803Q) до почти полного рассопряжения (E803N, E803A) этого протонного насоса (Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007).

Для того чтобы оценить, как функционирует РМА1 АТФаза, имеющая замены изучаемых остатков, *in vitro* была измерена ферментативная активность препаратов плазматических мембран, выделенных из различных штаммов после инкубации с глюкозой. Это предполагает, что фермент должен находиться в активированном состоянии. Удивительно, что, несмотря на разницу в содержании АТФ и/или скорости роста, активность АТФазы мутантных штаммов S911D, T912D и S911D/T912A незначительно отличалась от отмеченной у дикого типа; в случае S911A наблюдалось даже увеличение на 42% (рис. 1). Предполагается, что АТФаза штамма S911D является конститутивно активированной, в то время как S911A обладает повышенной активностью, но сохраняет способность дальнейшей

Таблица 2. Содержание полиР в различных штаммах *S. cerevisiae* (мкмоль $P_i/\text{г}$ сырого веса)

Штамм	ПолиР1	ПолиР2	ПолиР3
Дикий	15.8	9.8	7.4
S911A	21.6	6.9	11.5
S911D	7.6	13.7	10.3
S911D/T912A	9.6	13.2	12.2
T912D	8.7	11.1	9.5

Примечание. Представлены средние данные из 3–8 экспериментов.

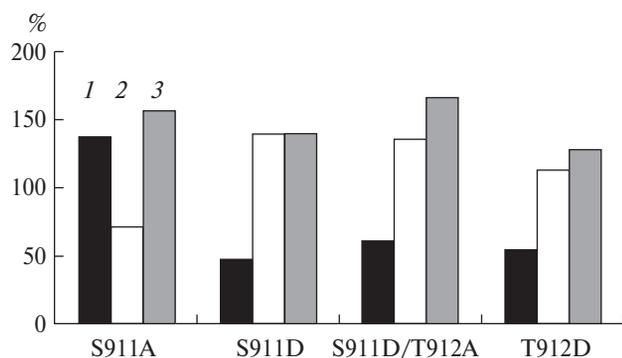


Рис. 2. Влияние мутаций S911A, S911D, S911D/T912A и T912D на распределение фракций полифосфатов в% от данных родительского штамма. Представлены средние данные из 3–8 экспериментов. 100% соответствовали: 15.8 (полиР1), 9.8 (полиР2), 7.4 (полиР3) мкмоль P_i/г сырого веса. Обозначения: 1 — полиР1; 2 — полиР2; 3 — полиР3.

активации (Lecchi et al., 2005, 2007). Вероятно, замена Ser-911→Asp приводит к неспособности остатков Thr-912 и/или Asp-911 фосфорилироваться обратимо, в то время как замена Ser-911→Ala лишь сдвигает равновесие в процессе фосфорилирования Thr-912 и/или других потенциально фосфорилируемых остатков, в том числе пока неизвестных.

Более глубокое понимание происходящих процессов пришло из экспериментов по определению различных фракций полиР (табл. 2, рис. 2).

Ясно выраженное влияние мутаций в молекуле PMA1 АТФазы на фосфорный/энергетический метаболизм наблюдалось при распределении полиР по фракциям у различных штаммов. Фракции полифосфатов различаются по способу экстракции и длине цепи этих ортофосфорных полимеров (Kulaev et al., 2004). Существует также приблизительная внутриклеточная локализация этих фракций. Так, полиР1 ассоциируется с цитозолем и в меньшей степени с вакуолями (30%); считается, что эту фракцию можно найти повсеместно. Предполагается, что полиР2 частично связана с ядром, и это кажется вероятным в связи с регуляцией полифосфатами транскрипции генов (Sanchez et al., 2023). ПолиР3, как и полиР1, ассоциируется с цитозолем и вакуолями, но это уже более высокомолекулярное соединение по сравнению с полиР1. Заметное перераспределение полиР по фракциям происходило у всех штаммов. В случае полиР1 наблюдалось увеличение этой фракции на 40% у S911A, лишеного фосфосайта Ser-911, и ее уменьшение на 40–50% в остальных случаях, где присутствовали Ser-911 или замещающий его Asp-911. В случае полиР2 происходило уменьшение доли этой фракции на треть при замене Ser-911 на остаток Ala и увеличение на 15–40% в остальных случаях, где присутствовала замена на Asp.

Если сравнивать содержание полиР1 у штамма с заменой S911A со штаммами, где присутствовала

аспартильная замена (S911D или T912D), картина была более драматичной: содержание полиР1 в клетках штамма S911A превышало обнаруженное у штаммов с заменами на Asp в 2.2–2.9 раза, в то время как содержание фракции полиР2 у тех же штаммов уменьшалось в 1.6–2.0 раза (табл. 2, рис. 2). Только в случае полиР3 происходило единообразное увеличение этой фракции на 30–65% у всех штаммов. Как кажется, чем выше молекулярная масса, тем менее метаболически лабильными должны быть фракции полиР. В действительности, однако, установлено, что наиболее меняющейся фракцией является полиР3 (Kulakovskaya et al., 2004). В случае же, рассматриваемом нами, наиболее выраженные (и имеющие противоположную направленность) изменения по фракциям вследствие мутаций происходят у фракций полиР1 и полиР2 (табл. 2, рис. 2). В целом, перераспределение фракций полиР у различных штаммов может указывать на рассогласованность процесса последовательного фосфорилирования сайтов Ser-911 и Thr-912 из-за их удаления или замены в мутантах, что приводило к нарушению связи между гидролизом АТФ и синтезом полиР. Таким образом, можно думать, что полиР являются своеобразным маркером энергетического состояния дрожжевой клетки. О подобной связи между метаболизмом АТФ и полиР сообщалось ранее (Hothorn et al., 2009). Кроме этого, полиР могут регулировать транскрипцию генов (Sanchez et al., 2023), что может сказываться на функционировании АТФазы и других ферментов.

Различие в действии замен S911A, S911D, T912A (S911D/T912A) и T912D между собой и с диким типом подтверждает, что находящиеся в этих позициях остатки Ser и Thr или замещающий эти остатки Asp могут фосфорилироваться. Вероятно, фосфорилирование молекулы АТФазы происходит за счет пула АТФ, который, в свою очередь, связан с пулом фосфатов и полифосфатов; в случае S911D и S911D/T912A фосфорилирование может являться необратимым для остатка Asp-911, на что указывает двукратное уменьшение содержания АТФ в этих штаммах (рис. 1). При этом очевидно, что хотя фосфорилироваться могут и другие остатки Ser и Thr, в частности, находящиеся в N-концевом участке фермента (Lecchi et al., 2007) или в экстрацитозольной части C-концевого участка (Петров, 2023), главными фосфосайтами являются именно Ser-911 и Thr-912, замены которых вызывают каскад последующих реакций как в функционировании PMA1 АТФазы, так и в метаболизме полиР. При удалении этих фосфосайтов или при их замене на ацилфосфатный тип происходит рассогласованность функционирования PMA1 АТФазы и нарушение распределения полиР. Следует еще раз подчеркнуть, что распределение полиР в случаях удаления фосфосайта или его замены на ацилфосфатный тип противоположно для полиР1 и полиР2. Дальнейшие исследования влияния

замен фосфорилируемых остатков помогут прояснить феноменологию происходящих процессов и выявить детали механизма регуляции энергетического/фосфорного метаболизма дрожжей и функционирования Pma1 H⁺-АТФазы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вагабов В. М., Трилисенко Л. В., Кулаев И. С. Зависимость длины цепи неорганических полифосфатов от содержания ортофосфата в среде у дрожжей // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 414–420.
- Vagabov V. M., Trilisenko L. V., Kulaev I. S. Dependence of inorganic polyphosphate chain length on the orthophosphate content in the culture medium of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow). 2000. V. 65. P. 349–355.
- Кулаев И. С., Вагабов В. М., Кулаковская Т. В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.
- Окорочков Л. А., Петров В. В. Выделение везикул плазматических мембран дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*, пригодных для исследования транспорта веществ // Биол. мембраны. 1986. В. 3. Р. 549–556.
- Петров В. В. Точечные мутации в Pma1 H⁺-АТФазе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: влияние на ее экспрессию и активность // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 1170–1180.
- Petrov V. V. Point mutations in Pma1 H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: influence on its expression and activity // Biochemistry (Moscow). 2010. V. 75. P. 1055–1063.
- Azevedo C., Livermore T., Salardi A. Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate // Mol. Cell. 2015. V. 58. P. 71–82.
- Beauvoit B., Regoulet M., Guerin B., Canioni P. Polyphosphates as a source of high-energy phosphates in yeast mitochondria: a ³¹P NMR study // FEBS Lett. 1989. V. 252. P. 17–21.
- Chang A., Slayman C. W. Maturation of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase involves phosphorylation during intracellular transport // J. Cell. Biol. 1991. V. 115. P. 289–295.
- Guerra G., Petrov V. V., Allen K. E., Miranda M., Pardo J. P., Slayman C. W. Role of transmembrane segment M8 in the biogenesis and function of yeast plasma-membrane H⁺-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 2383–2392.
- Heit S., Geurts M. M. G., Murphy B. J., Corey R. A., Mills D. J., Kühlbrandt W., Bublitz M. Structure of the hexameric fungal plasma membrane proton pump in its autoinhibited state // Sci. Adv. 2021. V. 7. Art. eabj5255. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj5255>
- 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., Schefzke 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. 304 p.
- Kulakovskaya T. V., Andreeva N. A., Trilisenko L. V., Vagabov V. M., Kulaev I. S. Two exopolyphosphatases in *Saccharomyces cerevisiae* cytosol at different culture conditions // Process Biochem. 2004. V. 39. P. 1625–1630.
- Lecchi S., Allen K. E., Pardo J. P., Mason A. B., Slayman C. W. Conformational changes of yeast plasma membrane H⁺-ATPase during activation by glucose: role of threonine-912 in the carboxy-terminal tail // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 16624–16632.
- Lecchi S., Nelson C. J., Allen K. E., Swaney D. L., Thompson K. L., Coon J. J., Sussman M. R., Slayman C. W. Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 35471–35481.
- Mazon M. J., Eraso P., Portillo F. Specific phosphoantibodies reveal two phosphorylation sites in yeast Pma1 in response to glucose // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. P. 1–9.
- Petrov V. V., Padmanabha K. P., Nakamoto R. N., Allen K. E., Slayman C. W. Functional role of charged residues in the transmembrane segments of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 15709–15716.
- Sanchez A. M., Garg A., Schwer B., Shuman S. Inorganic polyphosphate abets silencing of a sub-telomeric gene cluster in fission yeast // microPublication Biology. 2023. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000744>
- Serrano R. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase // FEBS Lett. 1983. V. 156. P. 11–14.
- Syhrova H., Kotyk A. Conditions of activation of yeast plasma membrane ATPase // FEBS Lett. 1985. V. 183. P. 21–24.
- Tomashevsky A. A., Petrov V. V. Point mutations in the different domains of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane PMA1 ATPase cause redistribution among fractions of inorganic polyphosphates // J. Biomol. Struct. Dyn. 2022. V. 40. P. 635–647. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1815582>

SHORT COMMUNICATIONS

Effect of Substituting of Amino Acids Residues Ser-911 and Thr-912 in the Plasma Membrane H⁺-ATPase of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* on Its Activity and Distribution of PolyphosphatesA. A. Tomashevski¹, V. V. Petrov^{1, *}¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences," Pushchino, 142290 Russia***e-mail: vpetrov07@gmail.com*

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

Abstract—The vital enzyme of yeast metabolism, plasma membrane H⁺-ATPase (PMA1), is phosphorylated during folding and functioning. The main phosphorylation sites are Ser911 and Thr-912 in the C-terminal regulatory domain. The work used wild and mutant forms of the enzyme with substitutions of these amino acid residues with Ala or Asp to determine their role in the functioning of the ATPase and the distribution of polyphosphates (polyP) by fractions. Growth parameters, ATP content, and in situ polyP distribution were determined on whole cells. To determine the ATPase activity in vitro, plasma membranes containing wild-type enzyme and mutant forms were isolated. Mutants S911D, T912D and S911D/T912A had ATPase activity close to the wild type; mutant S911A had increased activity. The growth rate of strains S911D, T912D and S911D/T912A was 2.0–3.0 times lower than that of the wild type, and the growth rate of S911A was close to the wild type. Mutations S911D and S911D/T912A caused a decrease in ATP content by 2.0–2.5 times. All substitutions affected the distribution of polyP by fractions. The effect depended on the chemical nature of the substitution: in the case of replacement with Asp, which changes the type of phosphosite, there was a decrease in the polyR1 fraction and an increase in the polyR2 fraction; when replaced with Ala, which removes phosphosite, the effect was the opposite. The content of the polyP3 fraction increased in all mutants. The data indicate that the residues of Ser911 and Thr-912 are important not only for the normal functioning of the PMA of H⁺-ATPase, but also for the regulation of phosphorus and energy metabolism.

Keywords: polyphosphates, PMA1 H⁺-ATPase, plasma membrane, *Saccharomyces cerevisiae*, yeasts

ВЛИЯНИЕ БЕСКЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* НА СТРУКТУРУ И БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БИОПЛЕНОК *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

© 2024 г. А. В. Миронова^а, М. С. Федорова^а, Н. Д. Закарова^а, А. Р. Салихова^а,
Е. Ю. Тризна^а, А. Р. Каюмов^{а, *}

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

*e-mail: kairatr@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После исправления 28.11.2023 г.

Принята к опубликованию 29.11.2023 г.

В последнее время появляется все больше данных, что многие инфекции ассоциированы с образованием поливидовых биопленок, в которых отмечается изменение чувствительности бактерий к антибиотикам и изменение проницаемости внеклеточного матрикса по сравнению с монокультурами. В данной работе мы показываем, что внесение бесклеточной культуральной жидкости (БКЖ) *Staphylococcus aureus* к биопленкам *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* увеличивает содержание в матриксе α -, β -полисахаридов до 2 раз, что, вероятно, влияет на структуру биопленки. Увеличение полисахаридного компонента также подтверждается значительным повышением уровня экспрессии генов *pgaA K. pneumoniae* и *pelA, pslA P. aeruginosa* в присутствии культуральной жидкости *S. aureus*.

Ключевые слова: бактериальные биопленки, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, внеклеточный матрикс, биохимический состав, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0026365624030144

Биопленки являются сложным, структурно-организованным трехмерным сообществом бактерий, заключенным внутри полимерного матрикса, синтезированного членами этого сообщества. Внеклеточный матрикс позволяет бактериям лучше адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды и поддерживать постоянство структуры (Eick, 2021).

Высокая устойчивость бактерий в биопленке к антибактериальным препаратам связана, в первую очередь, с протективными свойствами матрикса, биохимический состав которого зависит от вида бактерий, образующих биопленку, их фазы роста и условий среды (Hobley et al., 2015). В естественных условиях бактерии в основном существуют в составе смешанных сообществ, внутри которых наблюдаются разнообразные взаимодействия между микроорганизмами, от синергизма до антагонизма (Dalton et al., 2011, Radlinski et al., 2019). При синергизме в смешанном сообществе для микроорганизмов характерно повышение устойчивости к антибактериальным препаратам, значительные изменения метаболического профиля и уровня экспрессии генов, участвующих в формировании

внеклеточного матрикса биопленок и проявлении вирулентности (Orazi, O'Toole, 2019; Bottery et al., 2021). Так, нами ранее было показано, что в составе двувидовых биопленок *S. aureus*–*P. aeruginosa* и *S. aureus*–*K. pneumoniae* наблюдаются изменения чувствительности бактерий по сравнению с моновидовыми сообществами, что может быть обусловлено их антагонизмом (Trizna et al., 2020, Mironova et al., 2023). При этом другие исследования показали, что проницаемость внеклеточного матрикса двувидовых биопленок для антибиотиков также изменяется по сравнению с моновидовыми сообществами, что может также быть одной из причин изменения чувствительности бактерий к антибиотикам в составе смешанных сообществ (Fedorova et al., 2022, Mironova et al., 2023). Поэтому изучение структуры биопленок, их количественного и качественного состава является фундаментальной основой для разработки рекомендаций для лечения инфекционных заболеваний, ассоциированных с образованием биопленок, в том числе смешанных (Kranjec et al., 2021). Однако механизмы этих изменений остаются малоизученными.

В данной работе мы демонстрируем влияние бесклеточной культуральной жидкости *Staphylococcus aureus* на биохимический состав и структуру биопленок *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*.

В работе использовали штаммы *Klebsiella pneumoniae* (клинический изолят), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Для культивирования бактерий использовали питательную среду LB (Sambrook et al., 1989). Для получения бактериальных биопленок бактерии выращивали в течение 48 ч без качания при 37°C в среде BM (Kayumov et al., 2015) (г/л): пептон — 7; глюкоза — 5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 2; $CaCl_2$ — 0.05.

Для получения бесклеточной культуральной жидкости *S. aureus* выращивали в течение 24 ч в колбах объемом 100 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1 : 7.5 на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об./мин при температуре 37°C. Далее клетки отделяли центрифугированием (15 мин; 12 тыс. об./мин при 37°C); надосадочную жидкость фильтровали с помощью стерильных фильтров Minisart High Flow (“Sartorius”) с диаметром пор 0.22 мкм. Для того, чтобы исключить эффект голодания клеток в присутствии БКЖ, проводили подбор минимальной действующей концентрации (данные не приведены), действующей на биопленки, которая составила 12.5%.

Оценку общей биомассы биопленок осуществляли с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым с модификациями (Baidamshina et al., 2017). Биопленки выращивали в 24-луночных пластиковых планшетах 48 ч без качания при 37°C в BM-бульоне в лунках по 2 мл. Затем заменяли культуральную жидкость свежей питательной средой, дополненной 12.5% бесклеточной культуральной жидкостью *S. aureus* и продолжали инкубацию 24 ч. После удаляли культуральную жидкость из лунок, просушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем в лунки вносили 500 мкл 1% раствора кристаллического фиолетового (“Sigma-Aldrich”) в 96% этаноле и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин с закрытой крышкой. Далее промывали дистиллированной водой, элюировали связавшийся краситель 96% этанолом и измеряли поглощение при длине волны 570 нм на микропланшетном ридере Tecan infinite 200 Pro (Швейцария).

Оценку содержания белков и полисахаридов проводили с помощью флуоресцентных красителей Sypro Orange (200 мг/л), ConA-TMR (500 мг/л), Calcofluor White M2R (CFW) (1 мг/мл) приобретенные в компании “Sigma-Aldrich” (США). Для этого лунки со зрелыми биопленками, обработанными бесклеточной культуральной жидкостью, однократно промывали раствором 1×PBS и добавляли

красители по 100 мкл в лунку и инкубировали при 37°C в течение 15 мин, после чего раствор удаляли и лунки промывали 1×PBS. К окрашенным биопленкам вносили солевой буфер, механически соскребали, переносили в черный планшет и измеряли на микропланшетном ридере Tecan Infinite 200 Pro (Швейцария) на нужных длинах волн экситации и эмиссии. Полученные данные нормировали на общую биомассу биопленки, которую оценивали путем окрашивания кристаллическим фиолетовым.

Для оценки распределения компонентов в матриксе биопленки проводили конфокальную лазерную сканирующую микроскопию с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX83, дополненного платформой сверхвысокого разрешения STEDYCON. Монокультуры *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* выращивали в 8-луночных слайдах (“Ibidi”, Германия) в статических условиях в течение 48 ч в BM-бульоне. После этого культуральную жидкость заменяли на свежую питательную среду, дополненную 12.5% культуральной жидкостью, и инкубировали в течение 24 ч. Далее удаляли культуральную жидкость, добавляли флуоресцентные красители в тех же концентрациях, как описано выше, и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Изображения получали с помощью системы визуализации STEDYCON smart control.

Для оценки относительной экспрессии генов синтеза полисахаридов из чашек, содержащих зрелые 12-часовые биопленки, полученные в присутствии 12.5% БКЖ, удаляли культуральную жидкость и отмывали биопленки в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS). Выделение РНК проводили с помощью коммерческого набора diaGene (кат. № 3489) для выделения РНК из культуры клеток в соответствии с протоколом производителя с модификациями. Для этого механически соскребали биопленки в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) и полученную суспензию клеток осаждали центрифугированием. Затем осадок ресуспендировали в Лизис-буфере из расчета: 250 мкл буфера на 500 тыс. клеток и инкубировали во льду 15 мин. К пробам добавляли мелкодисперсное стекло и гомогенизировали на FastPrep-24 при скорости 4.0 м/с в течение 20 с в трех повторах, с охлаждением. Далее клетки осаждали центрифугированием, после чего выделение РНК проводили согласно методике, рекомендованной для набора diaGene (кат. № 3489).

Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью амплификатора BioRad CFX96 (“BioRad”, США) с использованием Экстра-микса для обратной транскрипции и количественной ПЦР в режиме реального времени одношаговым методом (Биолабмикс, кат. № RM04–400) с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green в условиях, рекомендованных

производителем. Использовали олигонуклеотиды, специфичные для генов *pgaA* *K. pneumoniae* (for 5'CAC CTG CAG ACG CTC TCC TAT GTC3', rev 5'AAG AGG AGA TGA CCC AGC CGA TG 3') (Mironova et al., 2023), *pelA* и *pslA* *P. aeruginosa* (for 5'CCT TCA GCC ATC CGT TCT TCT 3', rev 5'TCG CGT ACG AAG TCG ACC TT 3') (for 5'AAG ATC AAG AAA CGC GTG GAA T 3', rev 5'TGT AGA AAG TCG ACC ACA CCG 3') (Colvin et al., 2011). Нормировку проводили по уровню экспрессии гена *gyrB* (for 5'GCA AAT GAA TAT GAT GCC AG 3', rev 5'GGA TAT CCA CAG GAA TTC CA 3'). Синтез олигонуклеотидов осуществлялся в компании "Евроген" (Россия).

Все эксперименты были выполнены в трех биологических повторах с тремя техническими повторами в каждом опыте. Данные были проанализированы и графически визуализированы с использованием GraphPad Prism версии 6.00 для Windows ("GraphPad Software", США, www.graphpad.com). Количественный анализ микрофотографий проведен с помощью программы BioFilmAnalyzer, указано содержание компонентов в процентах от

контроля. В каждом эксперименте сравнение с отрицательным контролем проводилось с использованием непараметрического дисперсионного критерия Крускала–Уоллиса. Различия принимались значимыми при $p < 0.05$.

На первом этапе мы проводили оценку изменения структуры и химического состава зрелых биопленок *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* в присутствии БКЖ *S. aureus*. Для этого к зрелым биопленкам *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* вносили смесь БКЖ *S. aureus* и свежего ВМ-бульона в соотношении 1 : 8 (об./об.) и инкубировали 24 ч при 37°C без качания. В контрольные лунки вносили 0.9% NaCl, в том же объеме, что и БКЖ. После измеряли содержание α -, β - полисахаридов и белкового компонента внеклеточного матрикса, а также анализировали структуру биопленок с помощью конфокальной микроскопии.

Внесение БКЖ *S. aureus* к зрелой биопленке *K. pneumoniae* не влияло на общую биомассу (рис. 1а), однако приводило к увеличению белков более чем в 2 раза по сравнению с контрольными образцами, тогда как количество α - и β -полисахаридов значимо

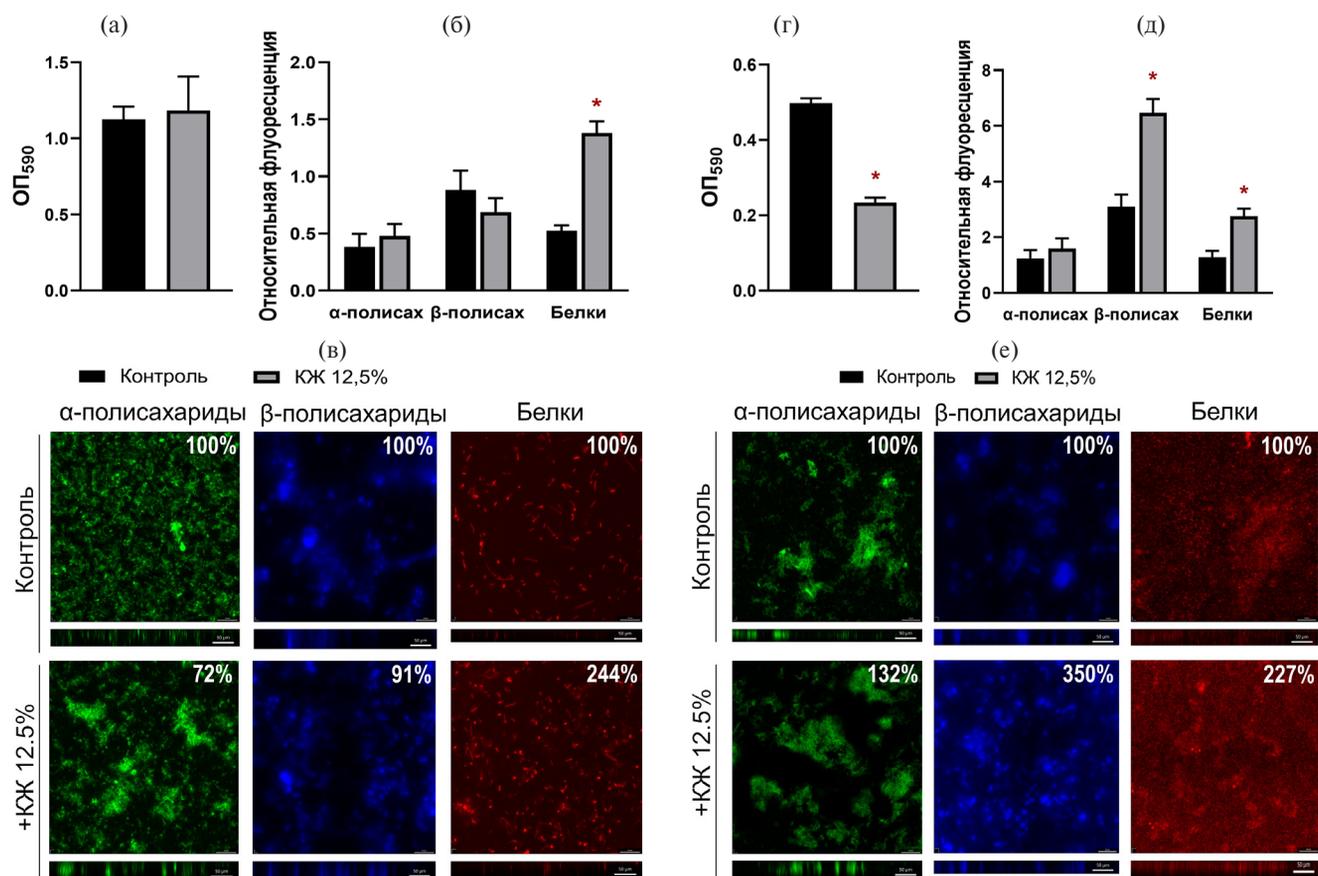


Рис. 1. Эффект бесклеточной культуральной жидкости *S. aureus* на структуру и состав матрикса биопленок *K. pneumoniae* (а, б, в) и *P. aeruginosa* (г, д, е). Оценку остаточной биопленки проводили с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым (а, г), биохимический состав (б, д), распределение и структуру матрикса биопленок (в, е) оценивали с использованием флуоресцентных красителей ConA-TMR, Calcofluor White M2R (CFW), Sypro Orange. Количественный анализ микрофотографий проведен с помощью программы BioFilmAnalyzer, указано содержание компонентов в процентах от контроля. Метка соответствует 50 мкм.

не изменялось (рис. 1б). Количественный анализ данных микроскопии подтвердил полученные результаты (рис. 1в).

При этом на микрофотографиях видно, что в контрольных лунках α -полисахариды располагаются равномерно, в то время как в лунках, обработанных БКЖ *S. aureus*, этот компонент визуализируется в виде отдельных скоплений, плотных по своей структуре (рис. 1в). Вероятно, наблюдаемая картина является следствием изменения структуры биопленки, в результате чего может изменяться проницаемость внеклеточного матрикса для противомикробных препаратов, что было описано нами ранее для двувидового сообщества *S. aureus*–*K. pneumoniae* (Mironova et al., 2023).

Внесение БКЖ *S. aureus* к зрелой биопленке *P. aeruginosa* приводило к двукратному снижению всей биомассы биопленок по окрашиванию кристаллическим фиолетовым (рис. 1г). При этом анализ биохимического состава матрикса показал значительное увеличение β -полисахаридов и белков по сравнению с контрольными образцами (более чем в 2 раза) в присутствии БКЖ *S. aureus*, в то время как количество α -полисахаридов в составе биопленки увеличивалось незначительно (рис. 1д). Данные микроскопии также показали существенное увеличение β -полисахаридов и белков в составе внеклеточного матрикса в присутствии БКЖ. Также на микрофотографиях видно, что в присутствии БКЖ *S. aureus* распределение полисахаридов сохраняется неравномерным, как и в контрольных образцах (рис. 1е). Известно, что при формировании смешанной биопленки *S. aureus*–*P. aeruginosa* высокое содержание полисахаридов, продуцируемых клетками *P. aeruginosa*, способствует формированию пористой структуры, при этом золотистый стафилококк способен встраиваться в эти поры и повышать свою устойчивость к противомикробным препаратам (Chew et al.,

2014; Trizna et al., 2020). Вероятно, повышенный синтез полисахаридов клетками *P. aeruginosa* в ответ на внесение БКЖ *S. aureus* может также приводить к формированию пористой структуры биопленок и вызывать изменения чувствительности клеток к противомикробным препаратам. Однако распределение белкового компонента в Z-срезах опытных образцов выглядит более плотным и равномерным по сравнению с контрольным образцом, что может быть связано с проникновением белков в поры, сформированные полисахаридными компонентами (рис. 1е). Таким образом, по всей видимости, БКЖ *S. aureus* приводит к формированию более плотной структуры биопленки *P. aeruginosa*, что может стать причиной снижения проницаемости внеклеточного матрикса для антибиотиков, как показано для двувидовой биопленки *P. aeruginosa*–*S. aureus* (Fedorova et al., 2022).

Чтобы оценить, влияет ли внесение БКЖ *S. aureus* на экспрессию генов, ассоциированных с образованием внеклеточного матрикса биопленок *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, проводили полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией. Для этого вносили культуральную жидкость золотистого стафилококка к клеткам *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* и инкубировали 12 ч при 37°C без качания, после чего выделяли тотальную РНК клеток и проводили полимеразную цепную реакцию.

По данным литературы, оперон *pgaABCD* кодирует белки, участвующие в синтезе и продукции поли- β -связанного *N*-ацетилглюкозамина (PNAG) у *K. pneumoniae*. При этом ген *pgaA* содержит предсказанный β -бочкообразный порин и суперспиральный домен, который опосредует белок-белковые взаимодействия, образуя секретин внешней мембраны (Itoh et al., 2008; Chen et al., 2014). На рис. 2а видно, что внесение культуральной жидкости приводило к повышению уровня экспрессии гена *pgaA* в клетках *K. pneumoniae*.

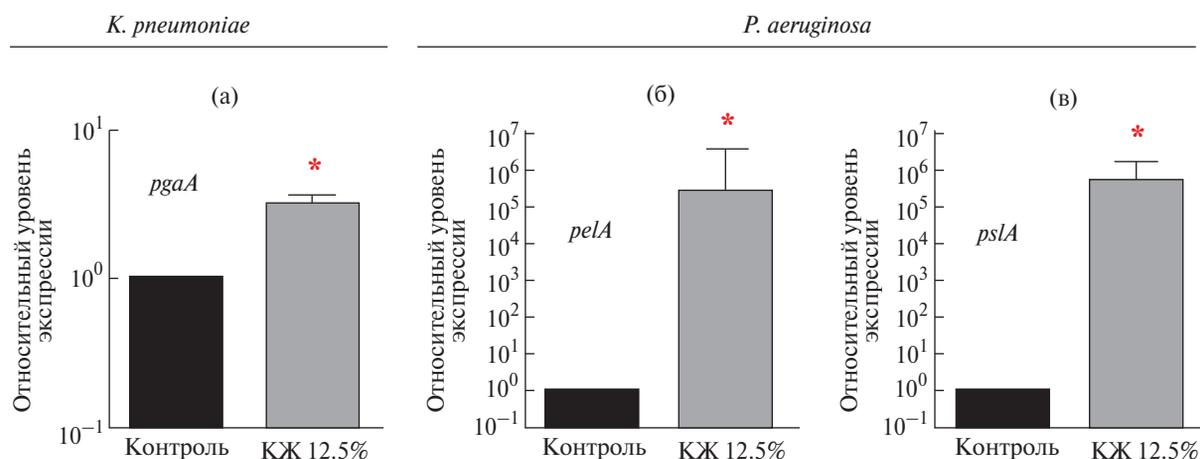


Рис. 2 Относительная экспрессия генов, кодирующих внеклеточные полисахариды биопленок *K. pneumoniae* (а) и *P. aeruginosa* (б, в) без обработки (контроль) и в присутствии культуральной жидкости золотистого стафилококка (+12% КЖ).

Вероятно, увеличение продуктов этого гена способствуют образованию плотных скоплений α -полисахаридов в структуре биопленки, которые визуализируются с помощью конфокальной микроскопии (рис. 1в).

В биопленках *P. aeruginosa* основными полисахаридами являются *pelA* и *pslA*, которые выполняют каркасную функцию и отвечают за формирование пор во внеклеточном матриксе (Ryder et al., 2007). Увеличение числа этих компонентов матрикса может способствовать изменению проницаемости биопленки для антимикробных препаратов, что было показано ранее (Fedorova et al., 2022). Действительно, уровень экспрессии генов *pelA*, *pslA* в клетках *P. aeruginosa* значительно повышался после добавления БКЖ *S. aureus*, что привело к увеличению полисахаридного компонента в матриксе биопленок *P. aeruginosa* (рис. 2б, 2в). Вероятно, это обусловлено реакцией бактерий *P. aeruginosa* на стресс, обусловленный присутствием метаболитов в БКЖ *S. aureus*, которые способствуют гиперпродукции компонентов биопленки клетками *P. aeruginosa*.

Таким образом, внесение бесклеточной культуральной жидкости золотистого стафилококка способствует увеличению белков и полисахаридов в составе матрикса биопленок *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* до 2 раз и приводит к изменению структуры биопленки. Подобные изменения могут обеспечить повышенную или, напротив, пониженную проницаемость биопленки для противомикробных препаратов, что необходимо учитывать при разработке подходов терапии инфекций, ассоциированных с образованием биопленок *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-64-47014).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.А.В., Ф.М.С., З.Н.Д., С.А.Р. — экспериментальные процедуры, К.А.Р., Т.Е.Ю. — руководство

работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baidamshina D., Trizna E., Holyavka M. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 46068.
- Bogachev M., Volkov V., Markelov O., Trizna E., Baydamshina D., Melnikov V., Zelenikhin P., Murtazina R., Sharafutdinov I., Kayumov A. Fast and simple tool for the quantification of biofilm-embedded cells sub-populations from fluorescent microscopic images // *PLoS One.* 2018. V. 13. Art. e0193267.
- Bottery M. J., Pitchford J. W., Friman V. P. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities // *ISME J.* 2021. V. 15. P. 939–948.
- Chen K. M., Chiang M. K., Wang M., Ho H. C., Lu M. C., Lai Y. C. The role of *pgaC* in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation // *Microb. Pathog.* 2014. V. 10. P. 89–99.
- Chew S. C., Kundukad B., Seviour T., Van der Maarel J. R. C., Yang L., Rice S. A., Doyle P., Kjelleberg S. Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides // *mBio.* 2014. V. 5. Art. e01536–14.
- Ciofu O., Moser C., Jensen P. Ø., Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms // *Nature Rev. Microbiol.* 2022. V. 20. P. 621–635.
- Colvin K. M., Gordon V. D., Murakami K., Borlee B. R., Wozniak D. J., Wong G. C. L. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa* // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7. Art. e1001264.
- Dalton T., Dowd S. E., Wolcott R. D., Sun Y., Watters C., Griswold J. A., Rumbaugh K. P. An *in vivo* polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions // *PLoS One.* 2011. V. 6. Art. e27317.
- Eick S. Biofilms. Oral Biofilms, 2020. 232 p. <https://doi.org/10.1159/000510184>
- Fedorova M. S., Mironova A. V., Kayumov A. R. Cell-free supernatant of *Staphylococcus aureus* culture increases antimicrobials susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* // *Opera Medica et Physiologica.* 2022. V. 9. P. 113–120.
- Hobley L., Harkins C., MacPhee C., Stanley-Wall N. R. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes // *FEMS Microbiol. Revs.* 2015. V. 39. P. 649–669.
- Itoh Y., Rice J. D., Goller C., Pannuri A., Taylor J., Meisner J., Beveridge T. J., Preston J. F., Romeo T. Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly- β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. P. 3670–3680.
- Kayumov A., Khakimullina E., Sharafutdinov I., Trizna E., Latypova L., Lien H., Margulis A., Bogachev M., Kurbangalieva A. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus*

- subtilis* by new halogenated furanones // J. Antibiot. (Tokyo). 2015. V. 68. P. 297–301.
- Kot B., Sytykiewicz H., Sprawka I. Expression of the biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm and planktonic conditions // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. Art. 3487.
- Kranjec C., Morales Angeles D., Torrissen Mârli M., Fernández L., García P., Kjos M., Diep D. B. Staphylococcal biofilms: Challenges and novel therapeutic perspectives // Antibiotics. 2021. V. 10. Art. 131.
- Mironova A. V., Karimova A. V., Bogachev M. I., Kayumov A. R., Trizna E. Y. Alterations in antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in dual species biofilms // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Art. 8475.
- Orazi G., O'Toole G.A. "It takes a village": mechanisms underlying antimicrobial recalcitrance of polymicrobial biofilms // J. Bacteriol. 2019. V. 202. Art. e00530–19.
- Otto M. Staphylococcal biofilms // Microbiol. Spectr. 2018. V. 6. P. 1–26.
https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018
- Radlinski L. C., Rowe S. E., Brzozowski R., Wilkinson A. D., Huang R., Eswara P., Conlon B. P. Chemical induction of aminoglycoside uptake overcomes antibiotic tolerance and resistance in *Staphylococcus aureus* // Cell. Chem. Biol. 2019. V. 26. P. 1355–1364.
- Ryder C., Byrd M., Wozniak D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Curr. Opin. Microbiol. 2007. V. 10. P. 644–648.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.
- Sharma D., Misba L., Khan A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities // Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2019. V. 8. P. 1–10.
https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3
- Trizna E. Y., Yarullina M. N., Baidamshina D. R., Mironova A. V., Akhatova F. S., Rozhina E., Fakhrullin R. F., Khabibrakhmanova A. M., Kurbangalieva A. R., Bogachev M. I., Kayumov A. R. Bidirectional alterations in antibiotics susceptibility in *Staphylococcus aureus*–*Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilm // Sci. Rep. 2018. V. 10. Art. 14849.

 SHORT COMMUNICATIONS

Effect of *Staphylococcus aureus* Cell-Free Culture Liquid on the Structure and Biochemical Composition of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms

A. V. Mironova¹, M. S. Fedorova¹, N. D. Zakarova¹, A. R. Salikhova¹, E. Yu. Trizna¹, and A. R. Kayumov^{1, *}

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia
*e-mail: kairatr@yandex.ru

Received October 15, 2023; revised November 28, 2023; accepted November 29, 2023

Abstract—Recently acquired data suggest that many infections are associated with formation of multispecies biofilms, in which both antibiotic sensitivity and the permeability of the extracellular matrix differ from those of monocultures. In this work, we show that addition of cell-free culture liquid of *Staphylococcus aureus* to the biofilms of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* increased the content of α - and β -polysaccharides in the matrix up to twofold, which in turn probably affected the biofilm structure. Increased content of the polysaccharide component was also confirmed by a significantly increased expression of the *K. pneumoniae* *pgaA* gene and of the *P. aeruginosa* *pelA* and *pslA* genes in the presence of *S. aureus* culture liquid.

Keywords: bacterial biofilms, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, extracellular matrix, biochemical composition, gene expression

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОСИМБИОНТОВ БОБОВОГО *HEDYSARUM ARCTICUM* V. FEDTSCHE, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО НА ОСТРОВЕ САМОЙЛОВСКИЙ В ДЕЛЬТЕ РЕКИ ЛЕНЫ (АРКТИЧЕСКАЯ ЗОНА ЯКУТИИ)

© 2024 г. Д. С. Карлов^{a, *}, П. В. Гуро^a, И. Г. Кузнецова^a, А. Л. Сазанова^a, И. А. Алехина^b,
Н. Ю. Тихомирова^a, Н. Н. Лашинский^c, А. А. Белимов^a, В. И. Сафронова^a

^aВсероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, 196608, Россия

^bАрктический и антарктический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, 199397, Россия

^cЦентральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия

*e-mail: ds.karlov@arriam.ru

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принято к публикации 10.11.2023 г.

Из клубеньков бобового растения Копеечник арктический (*Hedysarum arcticum* V. Fedtsch.), произрастающего на о. Самойловский в дельте реки Лена (Арктическая зона Якутии), выделены штаммы бактерий, отнесенных по результатам секвенирования *rrs*-гена к родам *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*) и *Mesorhizobium* (сем. *Phyllobacteriaceae*) из пор. *NuPhomicrobiales* (класс *Alphaproteobacteria*). Согласно данным филогенетического анализа конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *gyrB* и *rpoB* штаммы принадлежат к видам *Rhizobium giardinii* и *Mesorhizobium norvegicum*. Показано, что полученные штаммы относятся к факультативным психротрофам, способным расти при 5 и 28°C. Выделенные микросимбионты перспективны для дальнейшего изучения их симбиотической эффективности в отношении других видов кормовых бобовых растений с целью создания высокопродуктивных агрофитоценозов в условиях Крайнего Севера.

Ключевые слова: Арктическая зона Якутии, клубеньковые бактерии, северные агрофитоценозы, *Hedysarum arcticum* V. Fedtsch

DOI: 10.31857/S0026365624030155

Формирование новых высокопродуктивных пастбищных и сенокосных агроценозов как кормовой базы для сельскохозяйственных животных является одной из важнейших стратегических задач освоения и устойчивого развития арктических территорий России (Стратегия развития ..., 2020). Клубеньковые бактерии (ризобии), вступая в симбиотические взаимоотношения с бобовыми растениями, способствуют фиксации атмосферного азота и обеспечивают растения доступными азотистыми соединениями, тем самым увеличивая продуктивность фито- и агроценозов (Andrews, Andrews, 2017). Создание многолетних агроценозов в экстремальных условиях Крайнего Севера эффективно только при использовании местных генотипов растений и бактериальных штаммов (Котелина и соавт., 1998). Многолетнее бобовое растение Копеечник арктический (*Hedysarum arcticum* V. Fedtsch.) является перспективным для внедрения в качестве компонента устойчивого бобово-злакового агрофитоценоза в арктических регионах России, благодаря

хорошим адаптационным способностям к суровым почвенно-климатическим условиям. В частности, показано, что естественные фитоценозы с доминированием *H. arcticum* обеспечивают высокую биологическую продуктивность в условиях Воркутинской тундры по сравнению с фитоценозами, основу которых составляют другие местные виды бобовых (Экологические основы ..., 1991). В то же время информация о микросимбионтах *H. arcticum*, судя по литературным данным, отсутствует.

Цель работы — выделение микросимбионтов из корневых клубеньков дикорастущего бобового растения *H. arcticum*, произрастающего на о. Самойловский в дельте реки Лена (Арктическая зона Якутии), изучение их генетического разнообразия и определение видовой принадлежности.

Бактериальные штаммы были выделены из клубеньков *H. arcticum* в условиях стерильного микровегетационного опыта. Для получения клубеньков были использованы семена *H. arcticum*

и надмерзлотный почвенный образец сезонно-тающего слоя (СТС), отобранный из глубины 57 см в районе произрастания бобового растения. Поверхность семян стерилизовали концентрированной H_2SO_4 в течение 5 мин, промывали стерильной водой и проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при $4^\circ C$ в темноте в течение 3 сут. Проростки помещали в стерильные стеклянные сосуды объемом 50 мл (по два на сосуд) с 3 г стерильного вермикулита в каждом. В сосуды добавляли по 6 мл питательного раствора (г/л): K_2HPO_4 — 1.0, KH_2PO_4 — 0.25, $MgSO_4$ — 1.0, $Ca_3(PO_4)_2$ — 0.2, $FeSO_4$ — 0.02, H_3BO_3 — 0.005, $(NH_4)_2MoO_4$ — 0.005, $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ — 0.005, $MnSO_4$ — 0.002 (Novikova, Safronova, 1992). Проростки инокулировали почвенной вытяжкой из образца СТС. Неинокулированные растения были использованы в качестве отрицательного контроля. Микроvegetационный опыт проводился в двукратной повторности. Растения выращивали в фитотроне при $18-22^\circ C$ в течение 30 дней при относительной влажности 50% и 4-х уровнях освещенности/температуры: ночь ($18^\circ C$, 8 ч), утро (200 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, $20^\circ C$, 2 ч), день (400 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, $23^\circ C$, 12 ч), вечер (200 мкмоль квантов $m^{-2} \cdot c^{-1}$, $20^\circ C$, 2 ч). Освещение осуществляли лампами L36W/77 FLUORA (“Osram”, Германия). Ризобияльные штаммы выделяли из гомогенизированных клубеньков по стандартной методике с использованием агаризованной маннито-дрожжевой питательной среды YMA при $28^\circ C$ (Novikova, Safronova, 1992) после стерилизации клубеньков в течение 1 мин в 96%-ном этаноле.

Для получения чистых бактериальных культур видимые колонии отбирали и последовательно клонировали 2 раза на чашках Петри с плотной средой YMA методом истощающего штриха. Выделение гДНК из чистых культур осуществляли с помощью наборов DNeasy Blood&Tissue kit (“QIAGEN”, Германия). Первичная идентификация штаммов была проведена методом ПЦР с последующим секвенированием последовательностей маркерного гена 16S рРНК. Для амплификации была использована пара праймеров fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и rD1 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'. Уточнение видовой принадлежности полученных штаммов было проведено с помощью амплификации и секвенирования последовательностей генов *atpD*, *dnaK*, *gyrB* и *rpoB* с использованием праймеров и ПЦР-протоколов, описанных ранее (Weir et al., 2004; Martens et al., 2007; Safronova et al., 2017). Поиски близкородственных типовых штаммов и филогенетический анализ конкатемеров генов *rpoB*, *gyrB*, *atpD* и *dnaK* проводили с использованием программы BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Конструирование филогенетических деревьев осуществляли в программе MEGA X v. 10.2 (Kumar et al., 2018) с помощью метода наибольшего правдоподобия (Maximum Likelihood), в качестве показателя устойчивости использовали метод Bootstrap для 500 репликаций. Полученные

нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами OR673297, OR673298, OR689846-OR689848, OR777658-OR777661.

Всего из клубеньков *H. arcticum* было выделено два штамма, сформировавших колонии на 3 сут. Помимо роста при оптимальной температуре $28^\circ C$, штаммы показали способность к росту при $5^\circ C$ с образованием колоний на 7–9 сут, что позволило рассматривать их как факультативных психротрофов. По результатам анализа *rrs*-гена штаммы 20/1–1 и 20/1–4 были отнесены, соответственно, к родам *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*) и *Mesorhizobium* (сем. *Phyllobacteriaceae*) порядка *Hyphomicrobiales* класса *Alphaproteobacteria*. Известно, что многие представители родов *Rhizobium* и *Mesorhizobium* способны вступать в симбиотические взаимоотношения с широким спектром видов дикорастущих пастбищных бобовых растений родов Вика (*Vicia*), Чина (*Lathyrus*), Астргал (*Astragalus*), Остролодка (*Oxytropis*) и Копеечник (*Hedysarum*) (Andrews, Andrews, 2017; Helene et al., 2019).

Штамм 20/1–1 показал близкое сходство *rrs*-гена (99.0, 99.22 и 99.62%) с тремя типовыми штаммами — *Rhizobium giardinii* H152^T, *Pararhizobium polonicum* F5.1^T и *R. herbae* ССBAU83011^T соответственно.

Штамм *R. giardinii* H152^T был выделен из клубенька Фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), произрастающей во Франции (Amarger et al., 1997). Была показана способность штамма *R. giardinii* H152^T формировать неэффективные клубеньки на корнях растения-хозяина, а также на культурных бобовых Макроптериуме темно-пурпурном (*Macropitium atropurpureum* (Moc. & Sessé ex DC.) Urb.) и Лейцене белоголовой (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit). Штамм *P. polonicum* F5.1^T был выделен из корончатого галла Вишни птичьей (*Prunus avium* (L.) L.), произрастающей в Польше, тогда как штамм *R. herbae* ССBAU83011^T — из клубенька Астргала перепончатого (*Astragalus membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge), произрастающего в умеренных регионах Китая (Zhao et al., 2008).

На *rrs*-дереве штамм 20/1–1 формировал со штаммами *R. giardinii* H152^T, *P. polonicum* F5.1^T и *R. herbae* ССBAU83011^T кластер со 100%-ным уровнем поддержки, тогда как на дереве конкатемеров генов *atpD*, *dnaK* и *rpoB* он группировался только со штаммом *R. giardinii* H152^T с высоким (84%-ным) уровнем поддержки (рис. 1 и 2). Таким образом, штамм 20/1–1 был отнесен к виду *R. giardinii*.

Штамм 20/1–4 имел 100%-е сходство гена *rrs* со штаммами *Mesorhizobium norvegicum* 10.2.2^T и *M. loti* NZP2213^T, выделенными из корневых клубеньков кормового бобового растения Лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), соответственно, в Норвегии (Kabdullayeva et al., 2020) и Новой Зеландии (Jarvis et al., 1982). Показано, что *M. loti* NZP2213^T способен формировать эффективный симбиоз

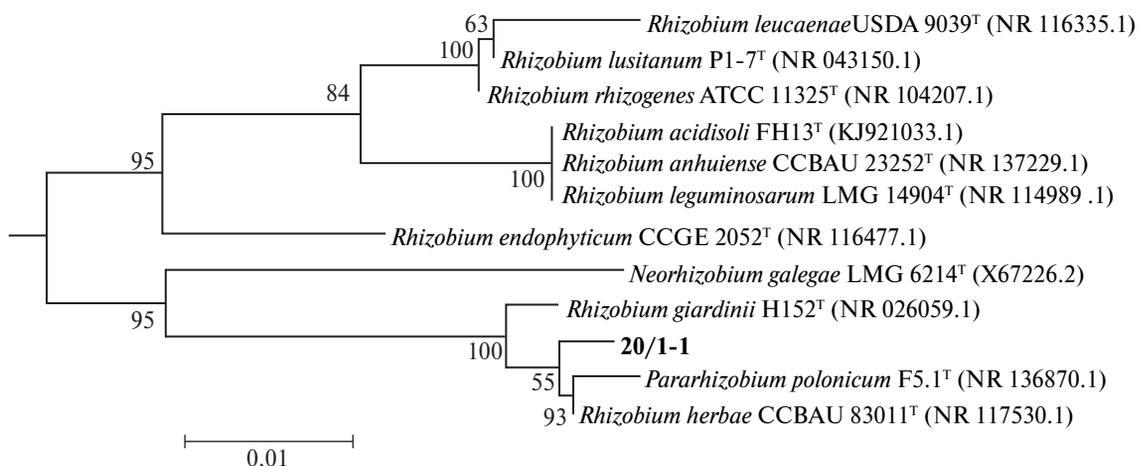


Рис. 1. Филогенетическое дерево представителей рода *Rhizobium*, построенное с использованием последовательностей гена 16S рРНК. Цифры (%) в узлах ветвления — достоверность по bootstrap-анализу 500 альтернативных деревьев.

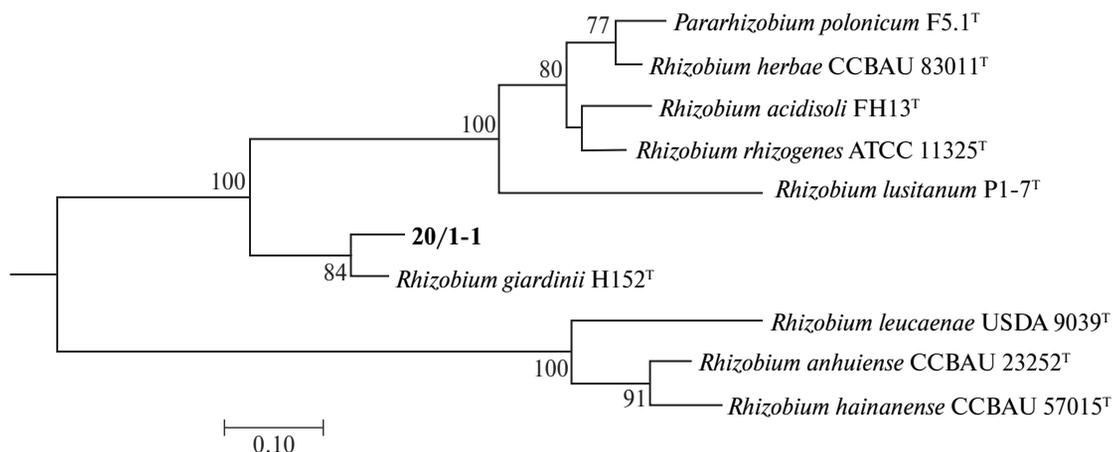


Рис. 2. Филогенетическое дерево представителей рода *Rhizobium*, построенное на основе конкатемеров генов *rpoB*, *atpD* и *dnaK*. Цифры (%) в узлах ветвления — достоверность по bootstrap-анализу 500 альтернативных деревьев.

с разными видами рода *Lotus*. На *rrs*-дереве штамм 20/1–4 формировал кластер со штаммами *M. qingshengii* CCBAU33460^T, *M. norvegicum* 10.2.2^T и *M. loti* NZP2213^T с 76% уровнем поддержки, тогда как на дереве, построенном на основе конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *rpoB* и *gyrB*, он группировался на уровне 99%-ной поддержки со штаммами *M. norvegicum* 10.2.2^T и *M. loti* NZP2213^T (рис. 3 и 4).

Для определения его видовой принадлежности было дополнительно проведено сравнение сходства конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *rpoB* и *gyrB* между изолятом 20/1–4 и штаммами *M. loti* NZP2213^T и *M. norvegicum* 10.2.2^T. Показано, что штамм 20/1–4 наиболее близок (99,93%-е сходство) к штамму *M. norvegicum* 10.2.2^T, тогда как сходство с *M. loti* NZP2213 составило 98,15% (табл. 1). На основании полученных результатов штамм 20/1–4 был отнесен к виду *M. norvegicum*.

Ранее авторами в условиях стерильного микро-vegetационного опыта была показана способность штамма 20/1–4 формировать азотфиксирующий

и неэффективный симбиоз с дикорастущими арктическими бобовыми *Oxytropis adamsiana* (Trautv.) Jurtzev и *Astragalus frigidus* (L.) A. Gray соответственно, тогда как способность штамма 20/1–1 образовывать клубеньки на корнях этих же видов бобовых выявлена не была (неопубликованные данные).

Таким образом, из клубеньков бобового растения *H. arcticum*, произрастающего на о.

Таблица 1. Сходство (%) штаммов 20/1–4, *Mesorhizobium loti* LMG 6125^T и *M. norvegicum* 10.2.2^T, оцененное путем сравнения конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *rpoB* и *gyrB*

Штаммы	20/1–4	<i>M. loti</i> LMG 6125 ^T	<i>M. norvegicum</i> 10.2.2 ^T
20/1–4	100	98.15	99.93
<i>M. loti</i> LMG 6125 ^T	98.15	100	97.78
<i>M. norvegicum</i> 10.2.2 ^T	99.93	97.78	100

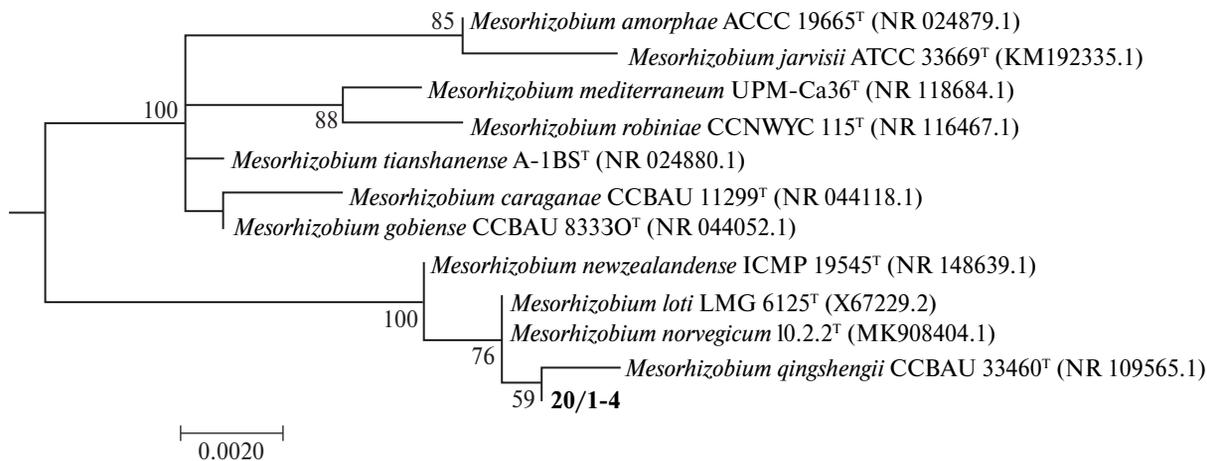


Рис. 3. Филогенетическое дерево представителей рода *Mesorhizobium*, построенное с использованием последовательностей гена 16S рРНК. Цифры (%) в узлах ветвления — достоверность по bootstrap-анализу 500 альтернативных деревьев.

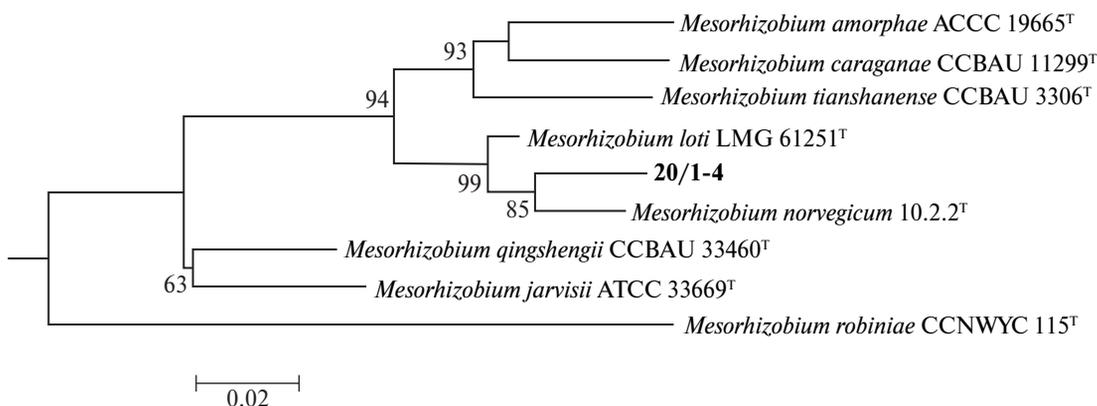


Рис. 4. Филогенетическое дерево представителей рода *Mesorhizobium*, построенное на основе конкатемеров генов *rpoB*, *gyrB*, *atpD* и *dnaK*. Цифры (%) в узлах ветвления — достоверность по bootstrap-анализу 500 альтернативных деревьев.

Самойловский в Арктической зоне Якутии, выделены два факультативно психротрофных штамма, отнесенные к родам *Rhizobium* и *Mesorhizobium* пор. *Hyphomicrobiales* (класс *Alphaproteobacteria*). При помощи анализа конкатемеров генов *atpD*, *dnaK*, *rpoB* и *gyrB*, а также построения на их основе филогенетических деревьев, штаммы 20/1–1 и 20/1–4 идентифицированы как *R. giardinii* и *M. norvegicum* соответственно. Они перспективны для дальнейшего изучения симбиотических взаимоотношений с разными видами кормовых бобовых растений в условиях микровегетационных опытов, а также для поисков целевых хозяйственно-ценных генов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФ, проект № 20-76-10042-П.

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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Искренне благодарим О. Д. Большиянову, инженера отдела географии полярных стран Арктического и Антарктического научно-исследовательского института (С.-Петербург), за любезно предоставленные семена *H. arcticum* и почвенные образцы. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Котелина Н. С., Арчегова И. Б., Романов Г. Г., Турубанова Л. П. Особенности природопользования и перспективы природовосстановления на Крайнем Севере России. Екатеринбург: УрО РАН, 1998. 148 с.
- Стратегия развития Арктической зоны Российской Федерации и обеспечения национальной безопасности на период до 2035 года. Утверждена Указом Президента РФ № 645 от 26 октября 2020 г. URL: <http://kremlin.ru/acts/news/64274>
- Экологические основы управления продуктивностью агрофитоценозов восточноевропейской тундры / Под ред. Арчегова И. Б., Котелина Н. С., Грунина Л. К. и др. Л.: Наука, 1991. 152 с.
- Amarger N., Macheret V., Laguerre G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 996–1006. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-996>
- Andrews M., Andrews M. E. Specificity in legume-rhizobia symbiosis // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. Art. 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Helene L. C. F., Dall'Agnol R. F., Delamuta J. R. M., Hungria M. *Mesorhizobium atlanticum* sp. nov., a new nitrogen-fixing species from soils of the Brazilian Atlantic Forest biome // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 1800–1806. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003397>
- Jarvis B. D.W., Pankhurst C. E., Patel J. J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1982. V. 32. P. 378–380. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-3-378>
- Kabdullayeva T., Crosbie D. B., Marín M. *Mesorhizobium norvegicum* sp. nov., a rhizobium isolated from a *Lotus corniculatus* root nodule in Norway // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 388–396. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003769>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Martens M., Delaere M., Coopman R., De Vos P., Gillis M., Willems A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 489–503. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64344-0>
- Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring *sym* genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa* // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 93. P. 261–268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05107.x>
- Safronova V. I., Kuznetsova I. G., Sazanova A. L. et al. *Microvirga ossetica* sp. nov., a species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Vicia alpestris* Steven // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 94–100. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001577>
- Weir B. S., Turner S. J., Silvester W. D., Park D.-C., Young J. M. *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 5980–5987. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5980-5987.2004>
- Zhao C. T., Wang E. T., Chen W. F., Chen W. X. Diverse genomic species and evidences of symbiotic gene lateral transfer detected among the rhizobia associated with *Astragalus* species grown in the temperate regions of China // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 286. P. 263–273. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01282.x>

Genetic Identification of Microsymbionts of the Legume *Hedysarum arcticum* B. Fedtsch, Growing on Samoylovsky Island in the Lena River Delta (Arctic Zone of Yakutia)

D. S. Karlov^{1, *}, P. V. Guro¹, I. G. Kuznetsova^{1, *}, A. L. Sazanova¹, I. A. Alekhina², N. Yu. Tikhomirova¹, N. N. Lashchinsky³, A. A. Belimov¹, and V. I. Safronova¹

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, 196608, Russia

²Arctic and Antarctic Research Institute, St.-Petersburg, 199397, Russia

³Central Siberian Botanical Garden, 101, Novosibirsk, 630090, Russia

*e-mail: ds.karlov@arriam.ru

Received October 15, 2023; revised November 8, 2023; accepted November 10, 2023

Abstract—Bacterial strains isolated from root nodules of the legume plant *Hedysarum arcticum* B. Fedtsch growing on Samoylovsky Island in the Lena River delta (Arctic zone of Yakutia) were assigned to the genera *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*) and *Mesorhizobium* (*Phyllobacteriaceae*) of the order *Hyphomicrobiales* (class *Alphaproteobacteria*) according to the *rrs* gene sequencing data. According to phylogenetic analysis of *concatemers* of the *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, and *rpoB* genes, the strains belonged to the species *Rhizobium giardinii* and *Mesorhizobium norvegicum*. The strains were shown to be facultative psychrotrophs growing at 5 and 28°C. These microsymbionts are promising for further study of their symbiotic efficiency regarding other forage legume species, with an aim to establish highly productive agrophytocenoses in the Far North.

Keywords: *Hedysarum arcticum* B. Fedtsch, Arctic Yakutia, rhizobial bacteria, northern agrophytocenoses

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕРПЕНОВ И КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ТЕРПЕНОИДОВ В ОТНОШЕНИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

© 2024 г. А. И. Колесникова^а, А. Р. Каюмов^а, И. Р. Гильфанов^а, Л. Л. Фролова^с,
Л. Е. Никитина^б, Е. Ю. Тризна^{а, *}

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

^бКазанский государственный медицинский университет, Казань, 420111, Россия

^сИнститут химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167000, Россия

*e-mail: trizna91@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 10.11.2023 г.

Staphylococcus aureus при различных патологических состояниях может вызывать многие заболевания. В связи с быстрым развитием устойчивости к антибиотикам, поиск альтернативных путей противомикробной терапии стафилококка является актуальной задачей. Природные и синтетические терпеноиды, благодаря мембранотропным свойствам, способны оказывать как антимикробное действие, так и потенцировать действие других антибиотиков. Проведена оценка противомикробной активности 53 природных терпенов и их синтетических кислородсодержащих производных, а также их способность потенцировать действие уже имеющихся антимикробных препаратов в отношении *S. aureus*. Показано, что (+)-3β,4β-карандиол и (–)-миртеневая кислота повышают эффективность амикацина, цефтриаксона и мирамистина от 2 до 4 раз, что говорит о возможности их использования для комбинированной терапии с лекарственными препаратами для снижения действующих концентраций последних.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, эфирные масла, терпены, антимикробные препараты, потенцирование

DOI: 10.31857/S0026365624030167

За последнее десятилетие скорость разработки новых антибиотиков стала значительно ниже скорости приобретения устойчивости к ним среди большинства микроорганизмов. В результате, набор доступных антибиотиков для лечения инфекций становится ограниченным, что приводит к высокой заболеваемости и смертности (Lewis, 2013; Zaman et al., 2017).

Staphylococcus aureus является причиной развития широкого спектра заболеваний. Их можно разделить на острые инфекции, вызванные свободноплавающими формами (бактериemia, кожные абсцессы) и хронические инфекции, связанные с образованием биопленок (остеомиелит, эндокардит и др.) (Lister, Horswill, 2014). *S. aureus* чувствителен к большинству антибиотиков, но быстро приобретает устойчивость практически ко всем имеющимся классам антимикробных препаратов, включая фторхинолоны, ванкомицин, даптомицин, линезолид, цефалоспорины и карбапенемы, а также макролиды, линкозамиды и стрептограмины

(Chambers, Deleo, 2009; Mikłasińska-Majdanik, 2021). Таким образом, поиск и разработка новых подходов к терапии инфекций, обусловленных резистентными штаммами *S. aureus*, является актуальной задачей фармакологии.

Эфирные масла являются вторичными метаболитами — производными изопреновых веществ, называемых терпенами, и в зависимости от количества углеводородных групп, различают дитерпены, тритерпены, тетратерпены и т.д. За счет гидрофобности эфирные масла способны взаимодействовать с липидами, присутствующими в клеточной мембране бактерий и митохондрий, нарушая клеточные структуры, делая их более проницаемыми, что приводит к гибели бактериальной клетки из-за значительной утечки критически важных молекул и ионов (Devi et al., 2010; Chouhan et al., 2017).

Комбинированное действие антибиотиков с различными веществами может уменьшить появление лекарственно-устойчивых вариантов и снизить дозу каждого компонента в комбинации.

Для повышения активности доступных антибиотиков эффективным решением является сочетание последних с адьювантами, такими как терпены (Cheesman et al., 2017; Tarmo, 2018; Shrivastava et al., 2018; Bhattacharya et al., 2021; Puvača, de Frutos, 2021). Показано, что гераниол способен воздействовать на эффлюксные насосы, и может восстанавливать чувствительность к лекарственным препаратам у штаммов *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Сочетание эфирного масла чайного дерева с противомикробным агентом тобрамицином оказывает синергетический эффект против *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью (D'Arrigo et al., 2010; Chouhan et al., 2017). Миртенол повышает эффективность амикацина и цiproфлоксацина против *S. aureus* (Mahmoud et al., 2022).

Целью настоящей работы было провести оценку антимикробного потенциала природных терпенов и их способность к потенцированию антибактериальных препаратов.

В работе использовали штамм *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™. Терпены, исследуемые в работе, были приобретены в компании “Sigma-Aldrich” и приведены в таблице S1 или получены по известным методикам. Антибиотики амикацин, мирамистин, цефтриаксон и цiproфлоксацин были приобретены в компании “Sigma” (США).

Для культивирования бактерий использовали питательную среду Mueller-Hinton (МН; “Sigma”, США).

МПК антимикробных препаратов определяли методом серийных микроразведений в среде МН согласно рекомендациям EUCAST (Leclercq et al., 2013). Противомикробные препараты разводили средой в 96-луночном пластиковом планшете (Eppendorf Cell Culture Plates) в концентрациях 1–2048 мкг/мл. Лунки засеивали 200 мкл бактериальной культуры (КОЕ $2-9 \times 10^6$) в среде МН и инкубировали при 37°C. Минимальную подавляющую концентрацию определяли как наименьшую концентрацию вещества, при которой полностью отсутствовал бактериальный рост на 24-й час инкубации.

Анализ комбинированного применения антимикробных агентов изучали с помощью метода шахматной доски (den Hollander, 1998). Каждый планшет содержал серийные разведения терпенов и противомикробных препаратов в шахматном порядке. Начальная концентрация каждого из исследуемых антимикробных агентов составляла $4 \times$ МПК. Конечная концентрация бактерий в лунках планшета составляла 0.5×10^5 КОЕ/мл. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C в течение 20 ч. Затем измеряли оптическую плотность ОП₆₀₀ на планшетном спектрофотометре Infinite 200 PRO (“Tecan”, США). Каждый тест проводился в трех повторах и включал контроль роста без

добавления какого-либо антимикробного агента. Показателем характера совместного антимикробного действия веществ являлся индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК), который рассчитывали, как было описано ранее (den Hollander et al., 1998).

Для определения жизнеспособности бактерий в присутствии противомикробных препаратов в лунки с исследуемыми веществами вносили 5 мкл раствора натриевой соли резазурина (alamarBlue™ Cell Viability Reagent, “Sigma”) до конечной концентрации 120 мкМ и проводили визуальную оценку. При наличии розовой окраски культуральной жидкости бактерии идентифицировали как жизнеспособные, синяя окраска свидетельствовала о гибели клеток.

На первом этапе была исследована противомикробная активность 53 терпенов, имеющих различное происхождение и строение и обозначенных условными номерами от 1 до 53 (дополнительные материалы, табл. S1). В качестве препаратов сравнения использовали антибиотики и антисептики, используемые в клинической практике. Исследуемые терпены не обладали ярко выраженным противомикробным эффектом. МПК 35 соединений варьировала в пределах 256–2048 мкг/мл, 18 соединений не подавляли рост бактерий в концентрациях 2048 мкг/мл. Среди всех исследуемых терпенов абиетиновая кислота проявляла наибольшее противомикробное действие с МПК в отношении *S. aureus* 16 мкг/мл (табл. S1), в то время как МПК препаратов сравнения составила 0.5–64 мкг/мл.

Оценку способности терпенов повышать эффективность амикацина, цефтриаксона, цiproфлоксацина и мирамистина в отношении *S. aureus* проводили методом шахматной доски. Для этого бактерии выращивали в присутствии антибиотиков в комплексе с терпенами в концентрации $0.125 \times$ МПК. После 24 ч инкубации рассчитывали индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК).

Выраженный синергетический эффект с амикацином наблюдался для 3 веществ: (+)-3β,4β-карандиола, (+)-4-(1-оксиэтил)карена-2, (-)-миртеневой кислоты, при этом МПК амикацина снижалась до четырех раз. При взаимодействии с цефтриаксоном синергизм был обнаружен только для (+)-3β,4β-карандиола, при этом МПК антибиотика снижалась в 2 раза (табл. 1).

Для мирамистина синергия была обнаружена с (+)-3β,4β-карандиолом, (-)-миртеневой кислотой и (-)-миртеналем, где эффективность антисептика повышалась до 4 раз. При взаимодействии с цiproфлоксацином ни для одного исследуемого вещества не было обнаружено синергетических взаимодействий (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика синергетического взаимодействия терпенов с антимикробными препаратами

Антибиотик	Терпен	МПК терпена, мкг/мл	МПК антибиотика, мкг/мл	ФИК терпена, мкг/мл	ФИК антибиотика, мкг/мл	иФИК	Снижение МПК, раз
Амикацин	(+)-3 β ,4 β -Карандиол	2048	4	128	1	0.31	4
	(+)-4-(1-Оксиэтил)карен-2	2048	16	128	8	0.52	2
	(-)-Миртеновая кислота	2048	16	128	8	0.53	2
Цефтриаксон	(+)-3 β ,4 β -Карандиол	2048	0.5	128	0.25	0.44	2
Мирамистин	(+)-3 β ,4 β -Карандиол	2048	2	128	0.5	0.31	4
	(-)-Миртеновая кислота	2048	2	128	1	0.53	2
	(-)-Миртеналь	2048	2	128	1	0.52	2

Таким образом, терпены способны повышать эффективность антибиотиков и антисептиков в отношении *S. aureus*. Однако синергетический эффект распространяется на отдельные классы противомикробных препаратов, что, скорее всего, связано с различиями в химической структуре исследуемых веществ и антибиотиков, а также внутриклеточными мишенями этих препаратов. Наибольшую перспективу для дальнейших исследований представляет вещество (+)-3 β ,4 β -карандиол, проявивший синергизм с тремя из четырех исследованных антимикробных препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

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.

ВКЛАД АВТОРОВ

А. И. Колесникова, Л. Л. Фролова, И. Р. Гильфанов — экспериментальные процедуры, А. Р. Каюмов, Е. Ю. Тризна, Л. Е. Никитина — руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bhattacharya R., Rolta R., Dev K., Sourirajan A. Synergistic potential of essential oils with antibiotics to combat fungal

pathogens: present status and future perspectives // *Phytother. Res.* 2021. V. 35. P. 6089–6100.

Chambers H. F., Deleo F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era // *Nat. Rev. Microbiol.* 2009. V. 7. P. 629–641.

Cheesman M. J., Ilanko A., Blonk B., Cock I. E. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/Compounds with conventional antibiotics the solution? // *Pharmacogn. Rev.* 2017. V. 11. P. 57–72.

Chouhan S., Sharma K., Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils — present status and future perspectives // *Medicines.* 2017. V. 4. Art. 58.

D'Arrigo M., Ginestra G., Mandalari G., Furneri P. M., Bisignano G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // *Phytomedicine.* 2010. V. 17. P. 317–322.

Devi K. P., Nisha S. A., Sakthivel R., Pandian S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane // *J. Ethnopharmacol.* 2010. V. 130. P. 107–115.

den Hollander J. G., Mouton J. W., Verbrugh H. A. Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1998. V. 42. P. 744–748.

Leclercq R., Cantón R., Brown D. F., Giske C. G., Heisig P., MacGowan A.P., Kahlmeter G. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing // *Clin. Microbiol. Infect.* 2013. V. 19. P. 141–160.

Lewis K. Platforms for antibiotic discovery // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. V. 12. P. 371–387.

Lister J. L., Horswill A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014. V. 4. Art. 178.

Mahmoud R. Y., Trizna E. Y., Sulaiman R. K., Pavelyev R. S., Gilfanov I. R., Lisovskaya S. A., Ostolopovskaya O. V., Frolova L. L., Kutchin A. V., Guseva G. B., Antina E. V., Berezin M. B., Nikitina L. E., Kayumov A. R. Increasing the efficacy of treatment of *Staphylococcus aureus*–*Candida albicans* mixed infections with myrtenol // *Antibiotics.* 2022. V. 11. Art. 1743.

- Miklasińska-Majdanik M.* Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus* // Antibiotics. 2021. V. 10. Art. 1406.
- Puvača N., de Llanos Frutos R.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from humans and pet animals // Antibiotics. 2021. V. 10. P. 1–63.
- Shrivastava S. R., Shrivastava P. S., Ramasamy J.* World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics // Med. Soc. 2018. V. 32. P. 7–76.
- Tarmo N.* Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus* // Eur. J. Med. Chem. 2018. V. 157. P. 198–228.
- Zaman S. B., Hussain M. A., Nye R., Mehta V., Mamun K. T., Hossain N.* A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing // Cureus. 2017. V. 9. Art. e1403.

SHORT COMMUNICATIONS

Antimicrobial Activity of Terpenes and Oxygen-Containing Terpenoids Against *Staphylococcus aureus*

A. I. Kolesnikova¹, A. R. Kayumov¹, I. R. Gilfanov¹, L. L. Frolova³,
L. E. Nikitina², and E. Yu. Trizna^{1, *}

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

²Kazan State Medical University, Kazan, 420111 Russia

³Institute of Chemistry, Komi Science Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167000 Russia
*e-mail: trizna91@mail.ru

Received October 14, 2023; revised November 9, 2023; accepted November 10, 2023

Abstract—At various pathological states, *Staphylococcus aureus* may cause a number of diseases. Rapid spread of antibiotic resistance necessitates the search for alternative approaches to antimicrobial treatment of staphylococci. Due to their membranotropic properties, natural and synthetic terpenoids are capable both of antimicrobial action and of potentiation of the effect of other antimicrobial agents. Antimicrobial activity of 53 natural terpenes and their synthetic oxygen-containing derivatives was determined, as well as their ability to potentiate the effect of known antimicrobials on *S. aureus*. Two- to fourfold increase in efficiency of amikacin, ceftriaxone, and miramistin in the presence of (+)-3β,4β-carandiol and (–)-myrtenic acid indicates the possibility of their application for combined therapy together with medical preparations in order to decrease the concentrations of the latter.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, essential oils, terpenes, antimicrobials, potentiation

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕРПЕНОВ И КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ТЕРПЕНОИДОВ В ОТНОШЕНИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

© 2024 г. А. И. Колесникова^а, А. Р. Каюмов^а, И. Р. Гильфанов^а, Л. Л. Фролова^с,
Л. Е. Никитина^б, Е. Ю. Тризна^{а, *}

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

^бКазанский государственный медицинский университет, Казань, 420111, Россия

^сИнститут химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167000, Россия

*e-mail: trizna91@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 10.11.2023 г.

Таблица S1. Оценка минимальной подавляющей концентрации (МПК) терпенов и кислородсодержащих терпеноидов в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

№	Наименование вещества	МПК, мкг/мл	№	Наименование вещества	МПК, мкг/мл
1	(-)-цис-вербенол	1024	28	(+)- α -пинен	>2048
2	(-)-неоизовербанол	>2048	29	(-) β -пинен	1024
3	(+)-3 α ,4 α -карандиол	2048	30	(+)- β -пинена окись	1024
4	(-)-3 β ,4 α -карандиол	512	31	(-)- α -пинена окись	>2048
5	(+)-3 β ,4 β -карандиол	2048	32	(+)-камфен	>2048
6	(-)-2 α ,3 α -пинандиол	2048	33	(-)-камфен	>2048
7	(-)-2 α ,3 β -пинандиол	2048	34	(\pm)-камфен	2048
8	(+)-4-(1-оксиэтил)карен-2	>2048	35	(-)-ментол	1024
9	(-)-3 α ,4 β -пинандиол	2048	36	(-)-карвеол	512
10	(-)-изопинокамфеол	1024	37	D-(+)-карвон	1024
11	(\pm)-2-экзо-10-эндо-камфандиол	2048	38	(+)-лимонен	>2048
12	(-)-изокаранол-4	512	39	(+)-лимонена диокись	>2048
13	(-)-цис-миртанол	512	40	(+)-лимонена окись	>2048
14	(-)-транс-миртанол	512	41	(-)-перилловый спирт	512
15	(-)-миртенол	512	42	α -терпинеол	1024
16	(-)-нопол	256	43	(-)-терпинен-4-ол	1024
17	(+)-миртенол	1024	44	транс-п-мент-6-ен-2,8-диол	>2048
18	(-)-цис-миртановая кислота	>2048	45	3-карен	>2048
19	(-)-транс-миртановая кислота	>2048	46	мирцен	2048
20	(-)-миртеновая кислота	>2048	47	гераниол	1024
21	(-)-миртеналь	>2048	48	вербенон	2048
22	(-)-цис-нопинол	1024	49	(+)-транс-вербенол	1024
23	(+)-3,4,-транс-пинандиол	2048	50	(-)-транс-вербенол	512
24	(-)-борнеол	1024	51	(-)-R-цис-вербенол	1024
25	DL-изоборнеол	2048	52	абиетиновая кислота	16
26	норборнилен	>2048	53	гвайазулен	>2048
27	камфора	2048			

ПАМЯТИ МИХАЙЛОВА ВАЛЕРИЯ ВИКТОРОВИЧА

(20.01.1952–05.04.2024)



Ушел из жизни член-корреспондент РАН Михайлов Валерий Викторович – специалист в области общей и морской микробиологии, микробной экологии и биотехнологии, основатель и куратор биоресурсной Коллекции морских микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Еякова ДВО РАН.

В. В. Михайлов родился 20 января 1952 г. в Воронеже. В 1973–1978 годах — студент факультета почвоведения МГУ им. М. В. Ломоносова, а затем аспирант кафедры биологии почв факультета почвоведения. С 1981 по 1985 г. – старший научный сотрудник ДВНИИ Госкомгидромета СССР во Владивостоке, кандидат биологических наук (1982), доктор биологических наук (1995). С 1985 г. В. В. Михайлов возглавлял лабораторию микробиологии ТИБОХ ДВО РАН, преподавал в Дальневосточном государственном университете/

Дальневосточном федеральном университете (ДВГУ/ДВФУ), читал курсы лекций “Общая микробиология” и “Общая и микробная биотехнология”. Своим учителем и наставником Валерий Викторович считал доктора биологических наук, профессора Д. Г. Звягинцева – заведующего кафедрой биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М. В. Ломоносова.

Основанная В. В. Михайловым биоресурсная Коллекция морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН является членом Всемирной федерации коллекций культур (WFCC) и получила международное признание. Коллекция пополняется штаммами микроорганизмов, выделенных во время экспедиций на научно-исследовательских судах из многих регионов Мирового океана, и послужила основой для проведения фундаментальных и прикладных исследований в области морской

микробиологии и биотехнологии. В. В. Михайлов и сотрудники его лаборатории внесли весомый вклад в развитие таких направлений микробиологии как таксономия, экология и биоразнообразие продуцентов биологически активных веществ; ими валидно описаны около 200 новых видов морских бактерий, а их комплексное изучение позволило обнаружить ряд биотехнологически перспективных микробных продуцентов первичных и вторичных биоактивных метаболитов. Совместно с сотрудниками других лабораторий ТИБОХ ДВО РАН были выделены и исследованы продуценты ферментов — щелочных фосфатаз, тирозиназ, каррагиназ, эластаз и некоторых других, а также выделены и изучены штаммы, продуцирующие новые противоопухолевые вещества, рН-зависимые цитостатики, сурфактины, антибиотики.

В 2006 г. В. В. Михайлов был избран членом-корреспондентом РАН.

В. В. Михайлов являлся членом Президиума Межрегиональной общественной организации “Микробиологическое общество” (Россия), членом Научного совета РАН по микробиологии, членом World Federation for Culture Collections.

Результаты научных исследований В. В. Михайлова отражены в более чем 400 научных работах, в том числе в 4-х монографиях. Под его руководством было подготовлено и защищено 7 кандидатских и 4 докторские диссертации. Его научные заслуги были отмечены Почетной грамотой Дальневосточного отделения РАН.

Стремление к новым знаниям, высокая работоспособность и стойкость В. В. Михайлова снижали огромный авторитет в научном сообществе и искреннее уважение его коллег и учеников.

Редколлегия журнала “Микробиология”
МОО “Микробиологическое общество”
ТИБОХ им. Г. Б. Елякова ДВО РАН
Институт микробиологии
им. С. Н. Виноградского
ФИЦ Биотехнологии РАН