

ISSN 0026-3656

Том 93, Номер 4

Июль – Август 2024



МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 93, Номер 4, 2024

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Особенности адаптации к холоду у психротолерантного микромицета *Mucor flavus*
О. А. Данилова, Е. А. Януцевич, Г. А. Кочкина, Н. В. Гроза, В. М. Терёшина 385
- Микроводоросли эродированных почв северной части Ферганской долины, Узбекистан
Ю. А. Тухтабоева, Е. С. Кривина, В. В. Редькина, А. Д. Темралеева 397
- Биоинформационный и функциональный анализ плазмиды биосинтеза сидерофоров pSID бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar
М. И. Мандрик, А. А. Высоцкая, Ю. В. Егорова, Д. В. Суржик, А. Ю. Ларченко, С. Л. Василенко 414
- Исследование влияния внешних факторов на рекомбинантную активность клубеньковых бактерий
Ан. Х. Баймиев, И. С. Коряков, Е. С. Акимова, А. А. Владимирова, Ал. Х. Баймиев 425
-

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

(Продолжение Спецвыпуска, 4-й Микробиологический Конгресс, Томск)

- Структура регуляторной области генов нитрилгидратазы в *Rhodococcus rhodochrous* M8 – биокатализаторе для получения акриловых гетерополимеров
Е. Г. Гречишникова, А. О. Шемякина, А. Д. Новиков, Т. И. Калинина, К. В. Лавров, А. С. Яненко 432
- Филогенетический анализ *phn* транспортёров *Achromobacter insolitus* LCu2
Е.В. Крючкова, Г.Л. Бурыгин 438
- Геном нового штамма *Halorubrum distributum* ICIS4, выделенного из культуры микроводоросли *Dunaliella salina*
Е. А. Селиванова, А. С. Балкин, Ю. А. Хлопко, В. Я. Катаев, А. О. Плотников 444
- Поиск бактериофагов, специфичных в отношении бактерий рода *Rhodococcus*
А. Д. Новиков, И. П. Токмакова, А. А. Самарин, К. В. Лавров, А. С. Яненко 451
- Влияние электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимических систем безмембранного типа на деструкцию имидаклоприда и представленность генов *mtrB* и пероксидаз ДуР-типа
А. А. Самков, С. М. Самкова, М. Н. Круглова 456
- Связь метаболизма гексуронатов со способностью *Escherichia coli* к адгезии и формированию биопленок
Т. А. Бессонова, У. Д. Кузнецова, А. Т. Магжаев, М. С. Гельфанд, О. Н. Озолин, М. Н. Тутукина 462
- Бактериальное разнообразие исторических железосодержащих водных источников Калининградского региона
Е. Е. Супрунов, И. А. Шнурова, Б. Э. Ефименко, В. В. Лисун 468

Новый бактериофаг <i>Pseudomonas</i> phage Ka1 из притока озера Байкал <i>М. С. Федорова, А. Э. Гатина, В. Н. Ильина, Л. Л. Ядыкова, В. В. Дрюккер,</i> <i>А. С. Горшкова, А. Р. Каюмов, Е. Ю. Тризна</i>	474
Противогрибковая активность субмикронных частиц сложных оксидов металлов, обладающих фотокаталитической активностью <i>А. Ю. Шишкин, В. Ф. Смирнов, И.А. Шалагинова, П. В. Корниенко, О. Н. Смирнова,</i> <i>Н. А. Аникина, А. В. Корягин, Е. В. Сулейманов</i>	481
Эффект пробиотических лактобактерий на микробиоту кишечника и морфолого-физиологические показатели перепелов <i>Е. А. Гаврилова, О. С. Карасева, Я. М. Монир, А. М. Ежкова, В. О. Ежков, Р. А. Волков,</i> <i>А. М. Сенина, Д. Р. Хуснутдинова, Е. В. Никитина, Д. Р. Яруллина, А. Р. Каюмов</i>	487

CONTENTS

Vol. 93, No. 4, 2024

EXPERIMENTAL PAPERS

- Cold Adaptation in a Psychrotolerant Micromycete *Mucor flavus*
O. A. Danilova, E. A. Ianutsevich, G.A. Kochkina, N. V. Groza, and V. M. Tereshina 385
- Microalgae from Eroded Soils in the Northern Fergana Valley, Uzbekistan
Yu. A. Tukhtaboeva, E. S. Krivina, V. V. Red'kina, and A. D. Temraleeva 397
- Bioinformatic and Functional Analysis of the pSID Siderophore Biosynthesis Plasmid of *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap
M. I. Mandryk, A. A. Vysotskay, Yu. V. Yahorava, D. U. Surzhyk, A. Yu. Larchenka, and S. L. Vasylenko..... 414
- Effect of Environmental Factors on Recombinant Activity of Root Nodule Bacteria
An. Kh. Baymiev, I. S. Koryakov, E. S. Akimova, A. A. Vladimirova, and Al. Kh. Baymiev 425
-

SHORT COMMUNICATIONS

- Structure of the Regulatory Region of Nitrile Hydratase Genes in *Rhodococcus rhodochrous* M8, a Biocatalyst for Production of Acrylic Heteropolymers
E. G. Grechishnikova, A. O. Shemyakina, A. D. Novikov, T. I. Kalinina, K. V. Lavrov, and A. S. Yanenko 432
- Phylogenetic Analysis of *phn* Transporters of *Achromobacter insolitus* LCu2
Ye. V. Kryuchkova, and G. L. Burygin..... 438
- The Genome of a New *Halorubrum distributum* Strain ICIS4 Isolated from the Culture of a Microalga *Dunaliella salina*
E. A. Selivanova, A. S. Balkin, Yu. A. Khlopko, V. Ya. Kataev, and A. O. Plotnikov 444
- Search for Bacteriophages Specific against Members of the Genus *Rhodococcus*
A. D. Novikov, I. P. Tokmakova, A. A. Samarin, K. V. Lavrov, and A. S. Yanenko..... 451
- Effect of Electrical Stimulation of the External Circuit of Membraneless Bioelectrochemical Systems on Imidacloprid Degradation and Representation of the *mtrB* and DyP-Type Peroxidases Genes
A. A. Samkov, S. M. Samkova, and M. N. Kruglova 456
- Connection between Hexuronate Metabolism and the Ability of *Escherichia coli* to Adhesion and Biofilm Formation
T. A. Bessonova, U. D. Kuznetsova, A. T. Magkaev, M. S. Gelfand, O. N. Ozolin, and M. N. Tutukina 462
- Bacterial Diversity of Historic Iron-Containing Water Sources of the Kaliningrad Region
E. E. Suprunov, I. A. Shnurova, B. E. Efimenko, and V. V. Lisun 468
- New Bacteriophage *Pseudomonas* Phage Kal from a Trivia of Lake Baikal
M. S. Fedorova, A. E. Gatina, V. N. Ilyina, L. L. Yadykova, V. V. Dryukker, A. S. Gorshkova, A. R. Kayumov, and E. Yu. Trizna 474

Antifungal Activity of Submicrometer Particles of Complex Metal Oxides with Photocatalytic Activity <i>Yu. Shishkin, V. F. Smirnov, I. A. Shalaginova, P. V. Kornienko, O. N. Smirnova, N. A. Anikina, A. V. Koryagin, and E. V. Suleimanov</i>	481
Effect of Probiotic Lactobacteria on the Intestinal Microbiota and Morphological and Physiological Indicators of Quail <i>E. A. Gavrilova, O. S. Karaseva, Y. M. Monir, A. M. Ezhkova, V. O. Ezhkov, R. A. Volkov, A. M. Senina, D. R. Khusnutdinova, E. V. Nikitina, D. R. Yarullina, and A. R. Kayumov</i>	487

УДК 574.24:577.115.083+577.114

ОСОБЕННОСТИ АДАПТАЦИИ К ХОЛОДУ У ПСИХРОТОЛЕРАНТНОГО МИКРОМИЦЕТА *MUCOR FLAVUS*

© 2024 г. О. А. Данилова^{а, *}, Е. А. Януцевич^а, Г. А. Кочкина^б, Н. В. Гроза^с, В. М. Терешина^а

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

^бИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина,
Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”,
Пушино, 142290, Россия

^сМИРЭА Российский технологический университет, Москва, 119454, Россия
*e-mail: noitcelfer@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2023 г.

После доработки 05.01.2024 г.

Принята к публикации 15.01.2024 г.

Для изучения механизмов защиты мембран и макромолекул клетки от холода исследовали состав осмолитов, мембранных липидов и их жирных кислот в погруженной культуре *Mucor flavus* в динамике роста при 20 и 4°C. Этот микромицет является психротолерантом, так как имеет широкий температурный диапазон роста (от 2 до 25°C) с оптимумом при 20°C. *Mucor flavus* отличается высокой скоростью роста (15 мм/сут при 20°C, 4 мм/сут при 0°C). При обеих температурах в составе мембранных липидов доминировали фосфатидные кислоты и фосфатидилэтаноламины, тогда как фосфатидилхолины являлись минорными компонентами. Основное различие в составе мембранных липидов – втрое более низкое относительное содержание стеринов при 4°C. В процессе роста в оптимальных условиях снижалась доля фосфатидных кислот на фоне небольшого повышения долей стеринов, фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов, тогда как при 4°C незначительно снижалась доля фосфатидных кислот, и повышалась доля фосфатидилхолинов. Состав жирных кислот фосфолипидов, где доминировали линолевая, олеиновая, линоленовая и пальмитиновая кислоты, в процессе роста при 20°C практически не изменялся. При 4°C снижалась доля пальмитиновой, и повышалась доля олеиновой кислоты, а также снижалась вдвое доля γ -линоленовой кислоты на фоне повышения доли α -линолевой. Однако эти изменения не приводили к существенному изменению степени ненасыщенности фосфолипидов, которая варьировала в диапазоне 1.5–1.6. В составе осмолитов цитозоля преобладали трегалоза и глюкоза, глицерин присутствовал в минорном количестве только при 4°C. В процессе роста, независимо от температуры, количество осмолитов достигало 3% от сухой массы, и доля трегалозы составляла 70%. При обеих температурах наблюдалось постоянство состава осмолитов, слабые изменения в составе мембранных липидов и их степени ненасыщенности, что, вероятно, способствует высокой скорости роста гриба в широком диапазоне температур.

Ключевые слова: психротолерантность, осмолиты, трегалоза, мембранные липиды, фосфатидные кислоты, стерин, степень ненасыщенности

DOI: 10.31857/S0026365624040011

Земля является холодной планетой, 85% территории которой постоянно или сезонно подвергается действию температур ниже 5°C. К низкотемпературным местообитаниям относят Арктический и Антарктический регионы, горные вершины, морские глубины, холодные почвы, озера, пещеры, холодные пустыни, криопэги (Кочкина и соавт., 2007; Hoshino, Matsumoto, 2012; Кочкина и соавт., 2014; Wang et al., 2015; Marchetta et al., 2023). Около 70% Земли занято океанами, вода которых на глубине имеет температуру от –1 до 4°C, снег

покрывает ~ 35% суши, замерзшая земля составляет ~ 24%, морской лед ~ 13% и ледники ~ 10%. Колебания температур в таких местообитаниях создают условия для развития микроорганизмов, включая грибы. Так, в Антарктиде преобладают представители отдела Ascomycota (99.2% микобиоты), в основном дрожжи, тогда как грибы отделов Basidiomycota и Mucoromycota составляют лишь 0.7 и 0.1%, соответственно (Pudasaini et al., 2017). Напротив, в Арктике присутствуют базидиальные микоризные грибы, которые необходимы для выживания

растений-хозяев (Smith, Read, 2008). Холодоустойчивые грибы играют важнейшую роль в круговороте веществ и биоценозе холодных местообитаний. Кроме того, они привлекают внимание астробиологов, так как способны развиваться в условиях, аналогичных марсианским, например, в присутствии перхлоратов (Cassaro et al., 2021). Возрастает также интерес к экстремофильным грибам, в том числе и холодоустойчивым, как к источникам биологически активных веществ и ферментов с необычными свойствами (Feller, Gerday, 2003; Ibrar et al., 2020).

До настоящего времени дискуссионным остается вопрос об определениях психрофильности/психротолерантности. Наиболее распространенное определение сформулировано для бактерий: психрофилы – микроорганизмы, способные расти при 0°C, имеющие оптимум роста при температуре $\leq 15^\circ\text{C}$ и не растущие при 20°C (Morita, 1975). Однако некоторые исследователи считают, что для эукариотных организмов такое определение не подходит, поскольку отдельные стадии цикла развития могут протекать при различных оптимальных температурах (Feller, Gerday, 2003; Cavicchioli, 2006; Hoshino, Matsumoto, 2012). Поэтому предложены также новые термины: стенопсихрофил (аналог “психрофила”) – для микроорганизмов с ограниченным диапазоном температур роста и эврипсихрофил (аналог “психротолеранта”) для микроорганизмов, которые предпочитают стабильно холодную среду, но могут также расти в широком диапазоне температур, вплоть до мезофильного. Существует также предложение считать организм психрофилом, если он способен расти при температуре $\leq 5^\circ\text{C}$, и криофилом, если рост возможен при $\leq 0^\circ\text{C}$, а весь цикл развития осуществляется в криозоне (Hoshino, Matsumoto, 2012; Coker, 2019).

Развитие психрофилов в холодных условиях стало возможным благодаря их способности противостоять низкой кинетической энергии среды и замерзанию воды, сформировавшейся в процессе молекулярной эволюции и адаптации (Casanueva et al., 2010). В процессе эволюции холодоустойчивых грибов происходила адаптация всех систем и процессов к холоду на молекулярном (особенности генома и экспрессии генов, строение белков, в том числе и ферментов) и физиологическом (образование антифризных белков, белков теплового и холодового шоков, поддержание жидко-кристаллического состояния мембран, накопление в цитозоле осмолитов, антиоксидантная защита) уровнях (Yusof et al., 2021). Известно, что при холодовом шоке наблюдается снижение активности мембранно-связанных ферментов и транспортеров, скорости трансляции и фолдинга, стабилизируются вторичные структуры РНК и ДНК, повышается упорядоченность мембранных липидов, приводящая к снижению текучести мембран (Sahara et al., 2002; Redón et al., 2012). Поэтому для

психрофилов важным звеном адаптации является поддержание функций мембран, что важно для работы связанных с мембранами белков и процессов. Текучесть мембраны зависит от свободного движения ацильных групп мембранных фосфолипидов, латеральной диффузии и колебательного движения фосфолипидов, а также взаимодействия между различными доменами в мембране (Hayashi, Maeda, 2006). На текучесть мембран оказывают влияние степень ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов (Inouye, Phadtare, 2014), соотношения стерины/фосфолипиды (Gostinčar, Gunde-Simerman, 2018) и фосфатидилэтаноламины/фосфатидилхолины (Dawaliby et al., 2016), а также малые белки теплового шока (Tiwari et al., 2015).

Большое значение для криоустойчивости дрожжей имеют осмолиты трегалоза и глицерин, синтез которых регулируется HOG-путем (Inouye, Phadtare, 2014). Так, делеция гена HOG1 не влияет на рост дрожжей при 12°C, но снижает криоустойчивость при 4°C, поскольку не происходит индукции экспрессии генов ферментов синтеза трегалозы и глицерина. Трегалоза является многофункциональным соединением с протекторной, антиоксидантной, шаперонной, транспортной, запасной функциями (Elbein et al., 2003; Iturriaga et al., 2009; Tapia, Koshland, 2014; Argüelles et al., 2017; Kahraman et al., 2019; Kosar et al., 2019). Уникальность этого нередуцирующего дисахарида заключается в том, что он способен защищать как макромолекулы, так и мембраны клетки, оказывая стабилизирующее действие благодаря замещению молекул воды в гидратных оболочках головок фосфолипидов и макромолекул путем образования многочисленных водородных связей. Способность трегалозы защищать мембраны предполагает, что мембранная и осмолитная система клетки взаимосвязаны, и необходимо совместное исследование мембранных липидов и осмолитов. Однако все исследования степени ненасыщенности жирных кислот психрофилов до настоящего времени проводили на общих липидах, включающих как мембранные, так и запасные, что не позволяет отнести этот показатель к мембранам. Кроме того, большинство исследований посвящено психрофильным дрожжам, а не мицелиальным грибам. Но даже для дрожжей исследования состава мембранных липидов единичны.

Целью данного исследования является изучение роли мембранных липидов и осмолитов в адаптации холодоустойчивого микромицета *Mucor flavus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе использовали мукоровый гриб *Mucor flavus* Bainier 1903 ВКМ

F-4102D Mucoraceae, Mucorales, Insertae sedis, Mucoromycetes, Mucoromycota, Fungi. Микромицет изолирован из грунта пещеры “Ледяная” (Красноярский край, Березовский район), температура воздуха и грунта в которой составляла 4–6°C (Хижняк, 2009; Илиенц, 2011). При выделении получил наименование *Mucor* sp., в дальнейшем был идентифицирован в ВКМ как *M. flavus* на основании культурально-морфологических признаков и молекулярно-генетического анализа. Последовательность LSU rDNA этого штамма была депонирована в Генбанке под номером OR575477.

Гриб выращивали при оптимальной температуре (20°C) в течение 4–5 сут на скошенном сусло-агаре (7°Б), хранили при температуре 4–8°C.

Оптимальную температуру роста определяли, измеряя линейную скорость роста гриба в поверхностной культуре при различных температурах (–2...27°C). Споровую суспензию с концентрацией 10⁷ спор/мл в количестве 5 мкл вносили в центр чашки Петри с сусло-агаром (7°Б). Диаметр колоний измеряли каждые 1–3 сут до момента, когда мицелий достигал краев чашки.

Выращивание гриба в глубинной культуре проводили в колбах емкостью 250 мл с 50 мл среды Гудвина (Garton et al., 1951) на шейкерах New Brunswick Innova 44 и 44R (Eppendorf, США) со скоростью вращения 120 об./мин. В качестве инокулята использовали споровую суспензию, которую вносили до концентрации 10⁵–10⁶ спор/мл среды. Культивирование проводили при оптимальной температуре 20°C в течение 1–4 сут и при температуре 4°C в течение 4–15 сут.

Анализ липидов, углеводов и полиолов. Определение количества липидов, углеводов и полиолов проводили, как описано ранее (Януцевич и соавт., 2023). Вкратце, липиды экстрагировали по методу Николса с изопропанолом, дезактивирующим фосфолипазы, разделяли двумерной (полярные липиды) или одномерной (нейтральные липиды) тонкослойной хроматографией (ТСХ) и количественно определяли с использованием стандартных соединений методом денситометрии (программное обеспечение DENS). Для изучения состава жирных кислот полярные липиды выделяли методом одномерной ТСХ в системе для нейтральных липидов, элюировали смесью хлороформ–метанол (1:1), затем экстракт упаривали и проводили метанолиз 2.5% H₂SO₄ в метаноле в течение 2 ч при 70°C. Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом ГЖХ.

Растворимые в цитозоле углеводы и полиолы экстрагировали кипящей водой, удаляли белки и заряженные соединения, из лиофильно высушенного образца получали триметилсилильные производные (Brobst, 1972) и анализировали методом ГЖХ с внутренним стандартом.

Статистический анализ. Для каждого варианта эксперименты проводили трижды (n = 3). На графиках каждая точка данных представляет собой среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n = 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В поверхностной культуре гриб рос в широком диапазоне температур от –2 до 25°C. Максимальная скорость роста 15 мм/сут наблюдалась при оптимальной температуре 20°C (рис. 1). При самой низкой использованной температуре (–2°C) скорость роста гриба снижалась до 2 мм/сут.

В глубинной культуре гриб рос в виде пеллетов белого цвета. При оптимальной для роста температуре гриб накапливал биомассу около 7–8 г/л к 3 сут, а при 4°C такую же к 10 сут.

Исследование состава растворимых углеводов и полиолов (УиП) цитозоля мицелия гриба показало, что при обеих использованных температурах общее количество углеводов у *Mucor flavus* было невелико и составляло около 3% от сухой биомассы (рис. 2).

Качественный состав углеводов не различался, основными являлись трегалоза и глюкоза, в следовом количестве присутствовали полиолы: глицерин и маннит. При 20°C в молодой культуре гриба (1 сут) доминирующими углеводами были глюкоза (57% от суммы) и трегалоза (38%) (рис. 2а). Затем в течение суток доля трегалозы повышалась до 70% на фоне снижения доли глюкозы до 27%. Данное соотношение углеводов поддерживалось далее в процессе роста. При 4°C в молодой культуре гриба (4 сут) доминирующими углеводами были глюкоза (53%), трегалоза (24%) и глицерин (21%) (рис. 2б). В динамике роста культуры резко изменялось соотношение УиП: относительное содержание глюкозы снижалось до 27%, глицерина до 3%, в то время как доля трегалозы возрастала до 70%.

Для исследования роли липидов в адаптации гриба к понижению температуры был изучен

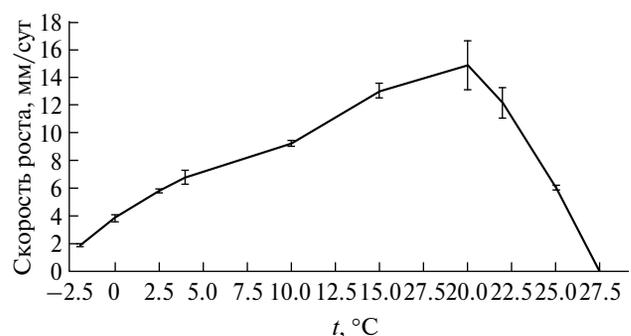


Рис. 1. Скорость роста *M. flavus* в зависимости от температуры.

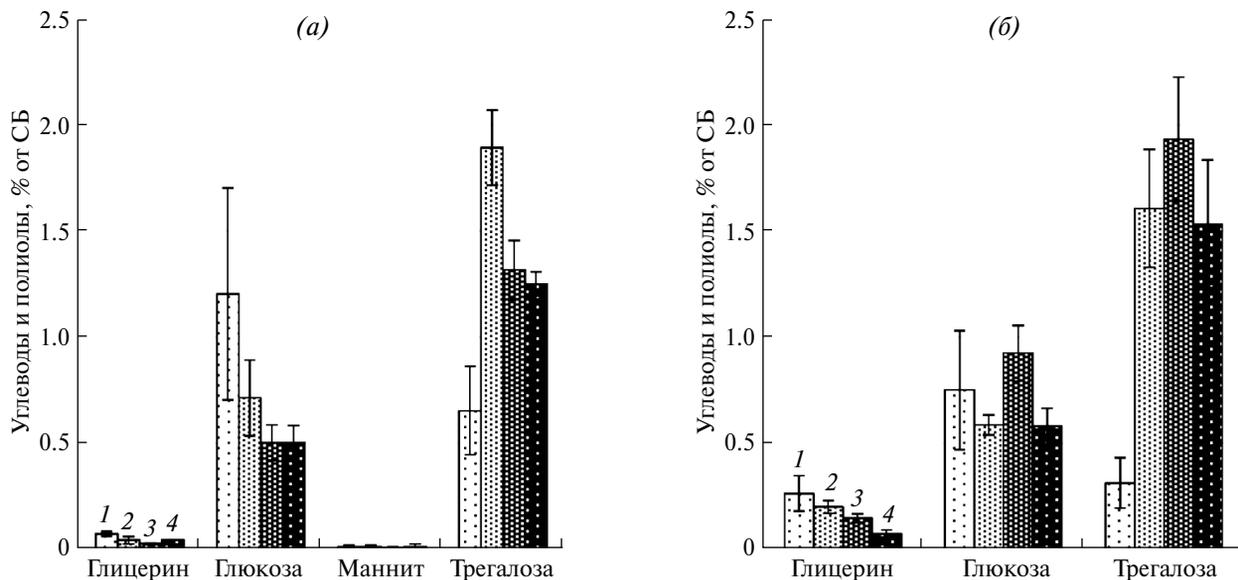


Рис. 2. Состав углеводов и полиолов цитозоля в динамике роста *M. flavus* при 20°C (а) и 4°C (б). (а): 1 – 1 сут, 2 – 2 сут, 3 – 3 сут, 4 – 4 сут; (б): 1 – 4 сут, 2 – 7 сут, 3 – 10 сут, 4 – 15 сут; СБ – сухая биомасса.

состав мембранных и запасных липидов, а также состав жирных кислот фракции мембранных липидов в ходе роста глубинной культуры гриба при температурах 20 и 4°C. Количество мембранных липидов гриба варьировало в пределах 10–15% и слабо изменялось как в динамике роста, так и при различных температурах (рис. 3).

При оптимальной температуре в составе мембранных липидов доминировали фосфатидные кислоты (ФК) и фосфатидилэтаноламины (ФЭ) (рис. 4).

Фосфатидилхолины (ФХ) и стеринны (Ст) присутствовали в минорном количестве, остальные

липиды (кардиолипины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозиты и лизофосфатидилэтаноламины, лизофосфатидилхолины и сфинголипиды) в виде следов. В динамике роста доля ФК снижалась, а доли ФЭ, ФХ и Ст возрастали. При росте в условиях 4°C состав мембранных липидов такой же, можно отметить только, что доля стериннов была втрое ниже (рис. 5). При пониженной температуре состав мембранных липидов в динамике роста более стабилен, чем при оптимальной.

Исследование жирнокислотного состава фракции полярных липидов показало, что при обеих

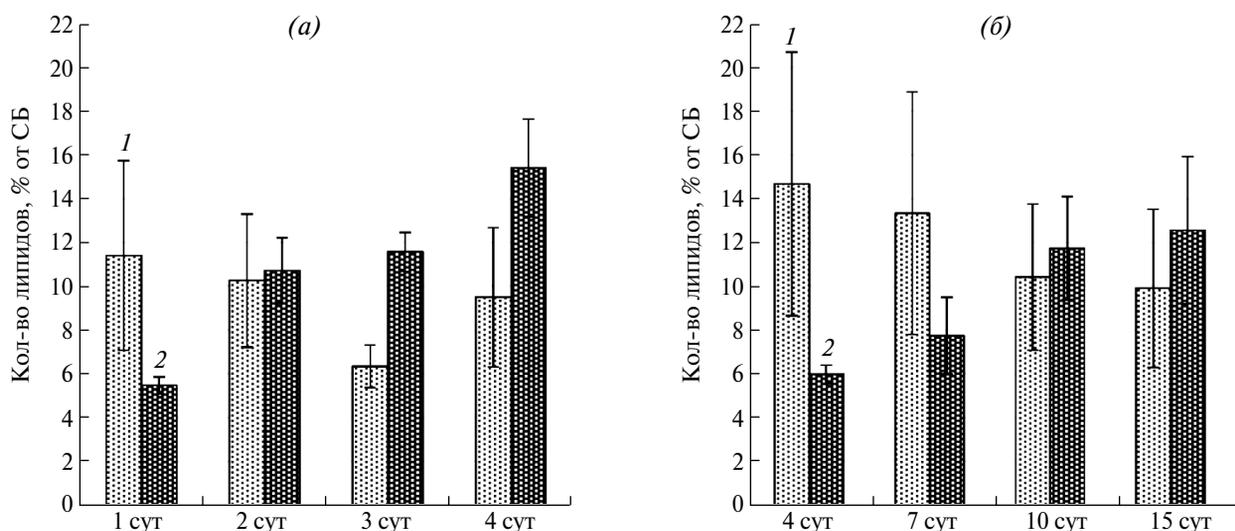


Рис. 3. Количество мембранных и запасных липидов гриба при 20°C (а) и 4°C (б): 1 – мембранные липиды, 2 – запасные липиды.

температурах доминирующими жирными кислотами являлись линолевая (C18:2n6c), пальмитиновая (C16:0), олеиновая (C18:1n9c), и α - и γ -линоленовая кислоты (C18:3n3 и C18:3n6 соответственно) (рис. 6а и 7а).

Тем не менее, была выявлена разница в соотношении жирных кислот. Так, при 20°C доля линолевой

кислоты достигала 35%, а олеиновой 20% (рис. 6а), тогда как при 4°C доля линолевой кислоты не превышает 25%, а относительное содержание олеиновой кислоты достигает 33% (рис. 7а). Кроме того, в оптимальных условиях линоленовая кислота представлена 20% от суммы γ -формы и следами α -формы, а при 4°C доля γ -линоленовой кислоты снижалась

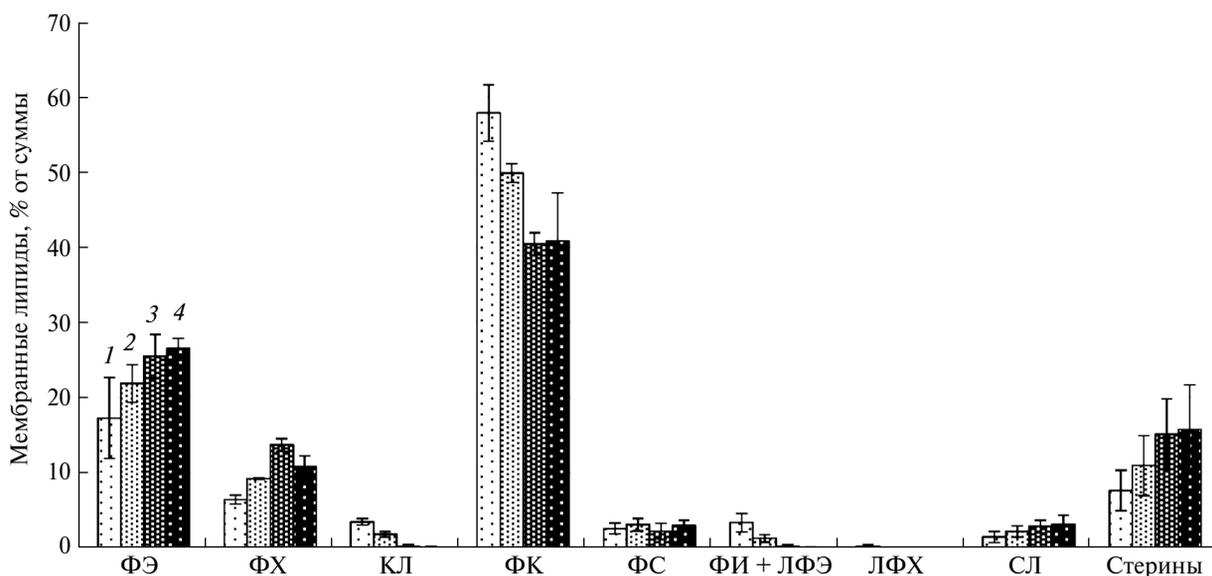


Рис. 4. Состав мембранных липидов в динамике роста *M. flavus* при 20°C. ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, КЛ – кардиолипиды, ФК – фосфатидные кислоты, ФС – фосфатидилсерины, ФИ – фосфатидилинозиты, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламины, ЛФХ – лизофосфатидилхолины, СЛ – сфинголипиды. 1 – 1 сут, 2 – 2 сут, 3 – 3 сут, 4 – 4 сут.

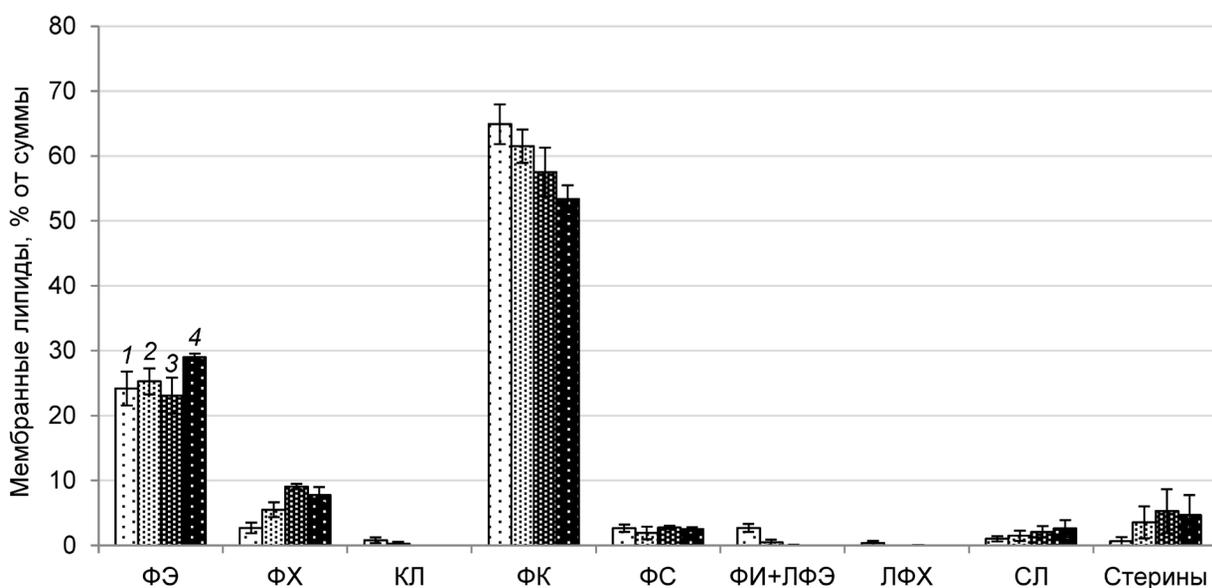


Рис. 5. Состав мембранных липидов в динамике роста *M. flavus* при 4°C. ФЭ – фосфатидилэтаноламины, ФХ – фосфатидилхолины, КЛ – кардиолипиды, ФК – фосфатидные кислоты, ФС – фосфатидилсерины, ФИ – фосфатидилинозиты, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламины, ЛФХ – лизофосфатидилхолины, СЛ – сфинголипиды. 1 – 4 сут, 2 – 7 сут, 3 – 10 сут, 4 – 15 сут.

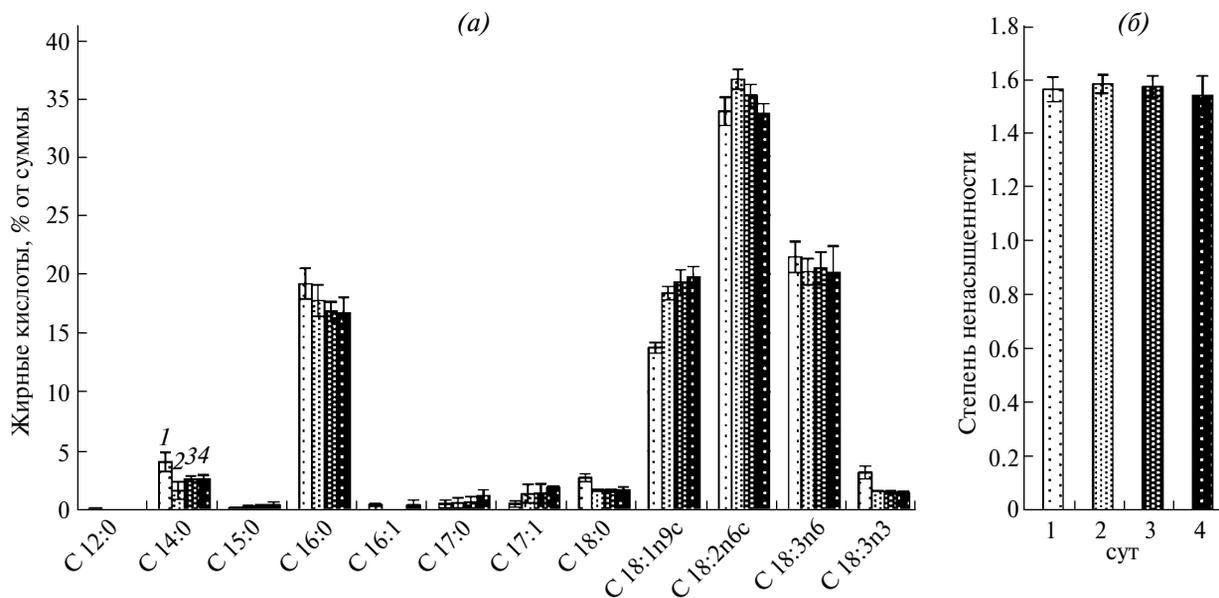


Рис. 6. Жирнокислотный состав мембранных липидов (а) и их степень ненасыщенности (б) в динамике роста *M. flavus* при 20°C. 1 – 1 сут, 2 – 2 сут, 3 – 3 сут, 4 – 4 сут.

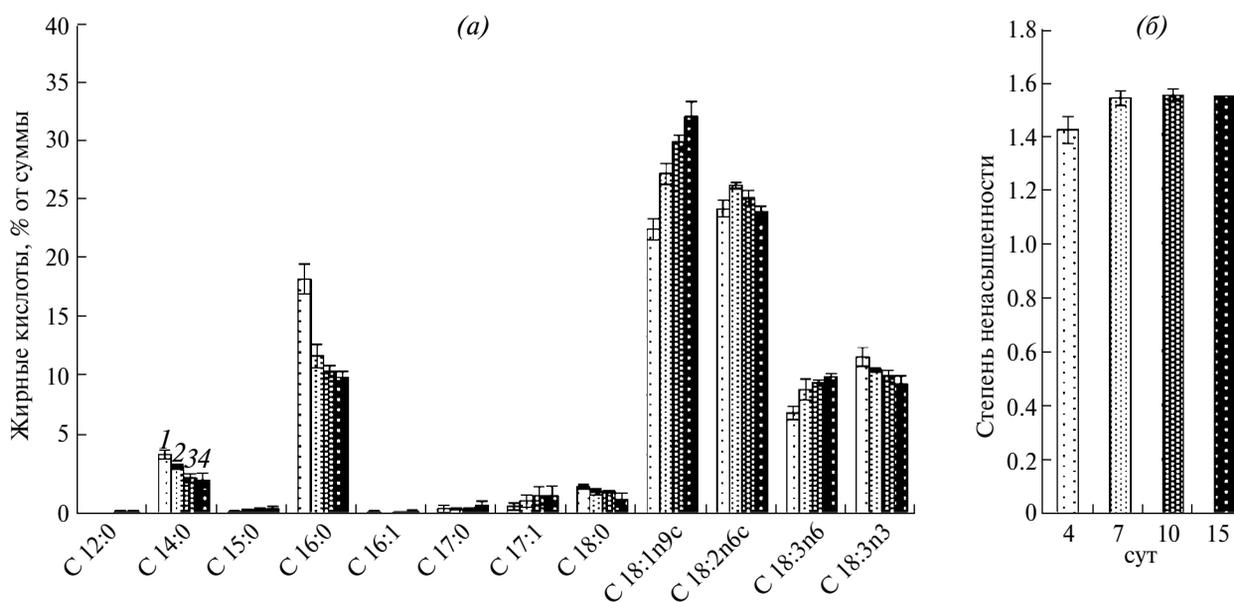


Рис. 7. Жирнокислотный состав мембранных липидов (а) и их степень ненасыщенности (б) в динамике роста *M. flavus* при 4°C. 1 – 4 сут, 2 – 7 сут, 3 – 10 сут, 4 – 15 сут.

вдвое, в то время как относительное содержание α -линоленовой кислоты достигало 10%. Однако, несмотря на эти различия в составе жирных кислот, степень ненасыщенности (СН) фракции фосфолипидов, независимо от стадии роста и температуры, слабо изменялась в пределах 1.5–1.6 (рис. 6б и 7б).

Количество запасных липидов с возрастом увеличивалось от 5 до 15%, независимо от температуры

выращивания (рис. 3). Основными запасными липидами были триацилглицериды (ТАГ) и диацилглицериды (ДАГ) (рис. 8).

При оптимальной температуре доля ТАГ достигала 75%, а ДАГ не превышала 20%, и в динамике роста изменения были незначительны (рис. 8а). При 4°C в молодой культуре в равных долях (около 30%) присутствовали ТАГ, ДАГ и свободные жирные

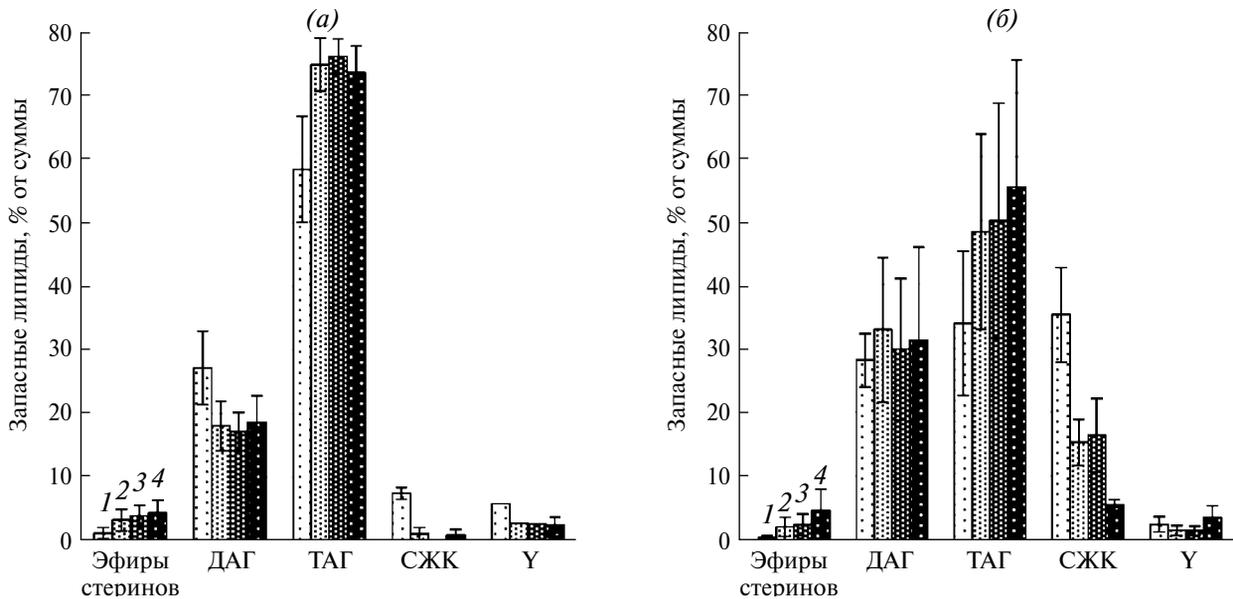


Рис. 8. Состав запасных липидов в динамике роста *M. flavus* при 20°C (а) и при 4°C (б). МАГ – моноацилглицериды, ДАГ – диацилглицериды, ТАГ – триацилглицериды, СЖК – свободные жирные кислоты, У – неидентифицированный липид. (а): 1 – 1 сут, 2 – 2 сут, 3 – 3 сут, 4 – 4 сут; (б): 1 – 4 сут, 2 – 7 сут, 3 – 10 сут, 4 – 15 сут.

кислоты (СЖК), в процессе роста доля СЖК снижалась до 5%, доля ДАГ не изменилась, а относительное содержание ТАГ возросло до 55% (рис. 8б).

ОБСУЖДЕНИЕ

По основным определениям (Morita, 1975; Cavicchioli, 2006) исследуемый микромицет *M. flavus* относится к психротолерантным грибам, так как растет в широком диапазоне температур (–2...25°C), но имеет температурный оптимум роста при 20°C. Особенностью этого гриба является высокая линейная скорость роста, достигающая 15 мм/сут в оптимальных условиях, 4 мм/сут при 0°C, 6 мм/сут при 25°C. Эти показатели интересны с позиций адаптации к холоду, поэтому мы исследовали состав УИП цитозоля, мембранных и запасных липидов, а также состав жирных кислот фракции мембранных липидов в динамике глубинного роста гриба в оптимальных условиях (20°C) и при 4°C, когда скорость роста снижалась вдвое.

Изучение динамики роста биомассы в глубокой культуре показало, что кривые роста сходны и максимальная биомасса 7–8 г/л накапливается к 3 сут в оптимальных условиях и к 10 сут при 4°C. Количество УИП при обеих температурах невелико и варьирует в процессе роста в пределах 1–3% от сухой массы, основные компоненты представлены трегалозой, глюкозой и глицерином, что характерно для мукоровых грибов из-за слабо развитого пентозофосфатного цикла (Jennings, 1985).

В молодом мицелии при обеих температурах доминирует глюкоза (около 60% от суммы). В оптимальных условиях количество глицерина незначительно, а при 4°C выше и сравнимо по уровню с трегалозой (0.25 % от сухой массы). В процессе роста количество трегалозы существенно повышается, и она становится доминирующим компонентом (около 1.5% от сухой массы, 70% от суммы УИП). Неожиданным является тот факт, что количество трегалозы в процессе роста при 20 и 4°C было сходным, достоверных различий не обнаружено. По данным литературы, у дрожжей в холодных условиях накапливалось большое количество глицерина, а трегалоза появлялась только в криозоне (0–4°C) (Inoue, Phadtare, 2014). У облигатных психрофильных дрожжей *Mrakia psychrophila* при 4°C увеличивалась экспрессия генов десатуразы и глицерин-3-фосфат дегидрогеназы (Su et al., 2016). У исследуемого гриба при обеих температурах количество глицерина не превышало 0.25% от сухой массы, и он не становился доминирующим с возрастом. Низкое количество глицерина обнаружено также в глубоком мицелии трех холодоустойчивых антарктических микромицетов *Humicola marvinii*, *Geomyces pannorum* и *Mortierella elongata* (Weinstein et al., 2000). В совокупности, эти данные указывают на особое значение трегалозы у мицелиальных грибов, в отличие от дрожжей.

Фосфолипиды являются основным классом мембранных липидов у исследуемого гриба, тогда как доля стеридов не превышает 15%, а сфинголипиды присутствуют в следовом количестве. Нужно

отметить, что количество мембранных липидов было велико при обеих температурах, составляло около 10% от сухой массы и мало изменялось с возрастом. При обеих температурах доминирующим компонентом мембранных липидов были ФК (40–60% от суммы), доля ФЭ составляла около 20–30%, а ФХ не превышала 10%. В процессе роста в оптимальных условиях доля ФК снижалась на фоне повышения долей ФЭ и стерина, тогда как при пониженной температуре эти изменения выражены намного слабее. Основное различие между вариантами выращивания касается доли стерина, которая при 20°C втрое выше, чем при 4°C, т.е. соотношение стерина/фосфолипиды при пониженной температуре было значительно ниже. Это согласуется с данными о низкой доле стерина, полученными для дрожжей (Inouye, Phadtare, 2014), и отсутствии эргостерина у психротолерантного мукорового гриба *Mortierella elongata* (Weinstein et al., 2000). Самым необычным в составе мембранных липидов исследуемого гриба было преобладание небислоиных липидов, ФК (40–60% от суммы) и ФЭ (20–30%), при низком относительном содержании характерного для грибов бислоиного фосфолипида ФХ (менее 10%). Такие же особенности состава мембранных липидов выявлены нами ранее для других экстремофильных грибов термофилов (Ianutsevich et al., 2016), алкалофилов (Bondarenko et al., 2017; Ianutsevich et al., 2021), ксерофилов (Danilova et al., 2022; Ianutsevich et al., 2023a), ацидофилов (Януцевич et al., 2023; Ianutsevich et al., 2023b). Роль фосфатидных кислот в структуре и функционировании мембран остается неясной. Этот необычный фосфолипид может быть как бислойным (при нейтральном значении рН и в отсутствии дивалентных ионов), так и небислойным (в слабокислых условиях и в присутствии ионов) (Kooijman et al., 2003; McMahon, Gallop, 2005). Кроме того, авторы полагают, что способность ФК к агрегации может приводить к образованию микродоменов, участвующих в формировании изгибов мембран – первому этапу формирования везикул, регулируя, таким образом, везикулярный транспорт из аппарата Гольджи, эндо- и экзоцитоз. Установлено, что изменение соотношения бислоиных и небислоиных липидов меняет профиль латерального давления в мембране, влияя на структуру и стабильность мембранных белков, их конформацию и/или функции (Renne, Kroon de, 2018). Было выдвинуто предположение о роли небислоиных липидов в связывании периферических мембранных белков и влиянии на стабильность трансмембранных белковых комплексов путем изменения профиля латерального давления (Brink-Van Der Laan Van Den et al., 2004). Считают, что увеличение доли небислоиных липидов приводит к формированию участков мембран в гексагональной фазе (L₆), при этом некоторые

ацильные цепи фосфолипидов становятся направленными “внутри” клетки, что облегчает связывание с ними G-белков, фосфолипаз и др. (Vigh et al., 2005). В совокупности эти данные позволяют говорить о важной структурной и регуляторной функции ФК, как при адаптации к стрессорным факторам, так и в адаптации экстремофилов. Для таких небислоиных липидов, играющих важную роль в динамической организации мембран при стрессе, предложен термин “липидный морфоген” (Frolov et al., 2011).

На примере 8 психрофильных дрожжей было показано, что основным фосфолипидом являлся небислоиный ФЭ, отношение которого к ФХ при понижении температуры выращивания возрастало (Režanka et al., 2016). Кроме того, был показан значительный рост содержания полиненасыщенных жирных кислот при понижении температуры, что приводило к увеличению степени ненасыщенности фосфолипидов.

Степень “бислоиности” липидной молекулы и ее форма зависят от состава ацильных цепей. Так, показано, что в отсутствие бислоиного ФХ в клетках дрожжей происходило замещение в ФЭ диненасыщенных ЖК на мононенасыщенные, что придавало молекуле ФЭ более “бислойную” структуру (Bohmann et al., 2006). Исследование состава жирных кислот фракции фосфолипидов у *M. flavus* показало, что основными были ненасыщенные олеиновая, линолевая, линоленовая и насыщенная пальмитиновая кислоты. В оптимальных условиях преобладает линолевая кислота (35% от суммы), остальные по 20%, и их состав слабо изменялся в процессе роста. При 4°C доли олеиновой, линолевой и линоленовой кислот сравнимы (по 25%), в процессе роста наблюдается снижение доли пальмитиновой и повышение доли олеиновой кислоты. Интересным фактом является то, что при 20°C линоленовая кислота представлена, в основном γ-формой, а при 4°C равными долями γ- и α-форм, что указывает на важность α-линоленовой кислоты в адаптации к понижению температуры. Следует отметить, что обнаруженные различия в составе жирных кислот при различных температурах в процессе роста не привели к изменению степени ненасыщенности, которая варьирует в узких пределах 1.5–1.6. Ранее постоянство состава жирных кислот и, следовательно, их степени ненасыщенности (около 1.4), было обнаружено у психрофильных дрожжей *Glaciozyma antarctica* при всех изученных температурах (15, 0 и 12°C), несмотря на то, что во всех вариантах наблюдалась экспрессия генов Δ₉- и Δ₁₂-десатураз жирных кислот (Bharudin et al., 2018). У психротолерантного мукорового гриба *Mortierella elongata* СН достигала 1.8 и не изменялась при глубинном выращивании в условиях 5 и 15°C (Weinstein et al., 2000). В совокупности, эти данные позволяют предположить,

что у холодоустойчивых грибов существуют механизмы поддержания СН фосфолипидов на постоянном высоком уровне. У бактерий при снижении температуры наблюдается повышение степени ненасыщенности жирных кислот, снижение средней длины цепи, образование метиловых производных жирных кислот (Casanueva et al., 2010). У изучаемого гриба мы не наблюдали образования каких-либо производных жирных кислот и снижения средней длины цепи жирных кислот мембранных липидов. Более того, в процессе роста и при двух использованных температурах мы не обнаружили существенного изменения степени ненасыщенности жирных кислот, что свидетельствует о высокой стабильности липидного бислоя.

Прямая корреляция между степенью ненасыщенности жирных кислот и текучестью мембраны подтверждена в опытах с *Rhodospiridium kratochvilovae* (Wang et al., 2017). Так, нокаут гена RKD12, кодирующего Δ_{12}/Δ_{15} -десатуразу, приводил к снижению долей линолевой и линоленовой кислот, снижению текучести и скорости роста при пониженной температуре. Делеция генов FAD12 и FAD15 отдельно у психрофильных дрожжей *Metschnikowia australis* W7-5 позволила выяснить, что снижение доли линолевой кислоты существенно замедляло рост в холодных условиях, чего не наблюдалось при отсутствии линоленовой кислоты (Wei et al., 2023). У исследуемого гриба, напротив, можно отметить значительное повышение доли α -линоленовой кислоты (с 2 до 10%) при 4°C, что указывает на ее значение в адаптации.

СН жирных кислот мембранных липидов у холодоустойчивых грибов может достигать высоких значений. Так, у психрофильных дрожжей *Leucosporidium frigidum* и *L. nivalis*, растущих при температуре 1°C, 80% жирных кислот представлены линоленовой (35–50%) и линолевой (25–30%) кислотами, что приводило к очень высокой СН (>2) (Watson et al., 1976). Однако нужно учесть, что состав жирных кислот определяли в общих липидах, включающих как запасные ацилглицериды, так и фосфолипиды, что создает трудности для сравнения. У исследуемого гриба СН оставалась относительно постоянной (1.5–1.6) как в процессе роста, так и при изменении температуры. Этот неожиданный факт позволяет предположить, что выявленная очень высокая скорость роста гриба в широком диапазоне температур может быть связана с доминированием трегалозы и относительно стабильными составом фосфолипидов и степени их ненасыщенности. Основное изменение в составе мембранных липидов при пониженной температуре по сравнению с оптимальной – снижение доли стериннов на фоне повышения доли фосфолипидов. Не исключено, что именно эта стабильность

осмолитной и мембранной систем обеспечивает возможность высокой скорости роста в очень широком диапазоне температур.

БЛАГОДАРНОСТИ

Для низкотемпературного глубинного выращивания было использовано оборудование ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Илиенц И.Р. Сообщества микромицетов пещер как источник штаммов для сельскохозяйственной и экологической биотехнологии: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. Красноярский гос. аграр. ун-т. Красноярск, 2009. 19 с.
- Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Акимов В.Н., Гиличинский Д.А., Озерская С.М. Галопсихротолерантные грибы рода *Geomyces* из криоплэгов и морских отложений Арктики // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 39–47.
- Kochkina G.A., Ivanushkina N.E., Akimov V.N., Gilichinskii D.A., Ozerskaya S.M. Halo- and psychrotolerant *Geomyces* fungi from arctic cryopegs and marine deposits // Microbiology (Moscow). 2007. V. 76. P. 31–38. <https://doi.org/10.1134/S0026261707010055>
- 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. 2014. 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. <https://doi.org/10.1134/S002626171402012X>
- Хижняк С.В. Микробные сообщества карстовых пещер Средней Сибири: автореф. дисс. ...докт. биол. наук: 03.00.16. Красноярский гос. аграр. ун-т. Красноярск, 2009. 32 с.
- Януцевич Е.А., Данилова О.А., Грум-Гржимайло О.А., Гроза Н.В., Терешина В.М. Адаптация ацидофильного

- гриба *Sistotrema brinkmannii* к pH фактору // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 279–288.
<https://doi.org/10.31857/S0026365622600870>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimailo O.A., Groza N.V., Tereshina V.M. Adaptation of the acidophilic fungus *Sistotrema brinkmannii* to the pH factor // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 370–378.
<https://doi.org/10.1134/S0026261723600210>
- Argüelles J.-C., Guirao-Abad J.P., Sánchez-Fresneda R. Trehalose: a crucial molecule in the physiology of fungi // Reference Module in Life Sciences. Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition). Elsevier, 2017. P. 486–494.
- Bharudin I., Abu Bakar M.F., Hashim N.H.F., Mat Isa M.N., Alias H., Firdaus-Raih M., Md Illias R., Najimudin N., Mahadi N.M., Abu Bakar F.D., Abdul Murad A.M. Unravelling the adaptation strategies employed by *Glaciozyma antarctica* PI12 on Antarctic sea ice // Mar. Environ. Res. 2018. V. 137. P. 169–176.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.007>
- Bondarenko S.A., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo A.A., Kotlova E.R., Kamzolkina O.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M. Membrane lipids and soluble sugars dynamics of the alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* in response to ambient pH // Extremophiles. 2017. V. 21. P. 743–754.
<https://doi.org/10.1007/s00792-017-0940-4>
- Boumann H.A., Gubbens J., Koorengel M.C., Oh C.-S., Martin C.E., Heck A.J.R., Patton-Vogt J., Henry S.A., de Kruijff B., de Kroon A.I.P.M. Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a Eukaryote // Mol. Biol. Cell. 2006. V. 17. P. 1006–1017.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0344>
- Brink-Van Der Laan E. Van Den, Antoinette Killian J., de Kruijff B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2004. V. 1666. P. 275–288.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.010>
- Brobst K.M. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives: analysis of corn syrup // General carbohydrate method / Eds. Whistler R.L., BeMiller J.N. New York–London: Academic Press, 1972. P. 3–8.
- Casanueva A., Tuffin M., Cary C., Cowan D.A. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of “omic” technologies // Trends Microbiol. 2010. V. 18. P. 374–381.
- Cassaró A., Pacelli C., Aureli L., Catanzaro I., Leo P., Onofri S. Antarctica as a reservoir of planetary analogue environments // Extremophiles. 2021. V. 25. P. 437–458.
<https://doi.org/10.1007/s00792-021-01245-w>
- Cavicchioli R. Cold-adapted archaea // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 331–343.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1390>
- Coker J.A. Recent advances in understanding extremophiles // F1000Research. 2019. V. 8. P. 1917.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.20765.1>
- Danilova O.A., Ianutsevich E.A., Bondarenko S.A., Antropova A.B., Tereshina V.M. Membrane lipids and osmolytes composition of xerohalophilic fungus *Aspergillus penicillioides* during growth on high NaCl and glycerol media // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 503–513.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722601373>
- Dawaliby R., Trubbia C., Delporte C., Noyon C., Ruyschaert J.M., van Antwerpen P., Govaerts C. Phosphatidylethanolamine is a key regulator of membrane fluidity in eukaryotic cells // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 3658–3667.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.706523>
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. // Glycobiology. 2003. V. 13. P. 17R–27R.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Feller G., Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation // Nat. Rev. Microbiol. 2003. V. 1. P. 200–208.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro773>
- Frolov V.A., Shnyrova A.V., Zimmerberg J. Lipid polymorphisms and membrane shape // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. Art. a004747.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004747>
- Garton G.A., Goodwin T.W., Lijinsky W. Studies in carotenogenesis. 1. General conditions governing β -carotene synthesis by the fungus *Phycomyces blakesleeana* Burgeff // Biochem. J. 1951. V. 48. P. 154–163.
<https://doi.org/10.1042/bj0480154>
- Gostinčar C., Gunde-Cimerman N. Overview of oxidative stress response genes in selected halophilic fungi // Genes (Basel). 2018. V. 9. Art. 143.
<https://doi.org/10.3390/genes9030143>
- Hayashi M., Maeda T. Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biochem. 2006. V. 139. P. 797–803.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvj089>
- Hoshino T., Matsumoto N. Cryophilic fungi to denote fungi in the cryosphere // Fungal Biol. Rev. 2012. V. 26. P. 102–105.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.08.003>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Kotlova E.R., Tereshina V.M. Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // Microbiology (Reading). 2016. V. 162. P. 989–999.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000279>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Bondarenko S.A., Tereshina V.M. Membrane lipid and osmolyte readjustment in the alkaliphilic micromycete *Sodiomyces tronii* under cold, heat and osmotic shocks // Microbiology (SGM). 2021. V. 167. № 11. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.001112>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Antropova A.B., Tereshina V.M. Acquired thermotolerance, membrane lipids and osmolytes profiles of xerohalophilic fungus *Aspergillus penicillioides* under heat shock. // Fungal Biol. 2023a. V. 127. P. 909–917.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.01.002>

- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo O.A., Tereshina V.M.* The role of osmolytes and membrane lipids in the adaptation of acidophilic fungi // *Microorganisms*. 2023b. V. 11. Art. 1733.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071733>
- Ibrar M., Ullah M.W., Manan S., Farooq U., Rafiq M., Hasan F.* Fungi from the extremes of life: an untapped treasure for bioactive compounds // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. P. 2777–2801.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10399-0>
- Inouye M., Phadtare S.* Cold-shock response and adaptation to near-freezing temperature in cold-adapted yeasts // *Cold-adapted yeasts: biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance* / Eds. P. Buzzini, R. Margesin. Springer, 2014.
<https://doi.org/10.1126/stke.2372004pe26>
- Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B.* Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. V. 10. P. 3793–3810.
<https://doi.org/10.3390/ijms10093793>
- Jennings D.H.* Polyol metabolism in Fungi // *Advances in microbial physiology* / Eds. Rose A.H., D.W. Tempest: Academic Press, 1985. P. 149–193.
- Kahraman M., Sevim G., Bor M.* The role of proline, glycinebetaine, and trehalose in stress-responsive gene expression // *Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants* / Eds. Hossain M. et al. Cham: Springer International Publishing, 2019. P. 241–256.
- Kooijman E.E., Chupin V., de Kruijff B., Burger K.N.J.* Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid // *Traffic*. 2003. V. 4. P. 162–174.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x>
- Kosar F., Akram N.A., Sadiq M., Al-Qurainy F., Ashraf M.* Trehalose: a key organic osmolyte effectively involved in plant abiotic stress tolerance // *J. Plant Growth Regul.* 2019. V. 38. P. 606–618.
<https://doi.org/10.1007/s00344-018-9876-x>
- Marchetta A., Papale M., Rappazzo A.C., Rizzo C., Camacho A., Rochera C., Azzaro M., Urzi C., Lo Giudice A., De Leo F.* A deep insight into the diversity of micro-fungal communities in Arctic and Antarctic lakes // *J. Fungi*. 2023. V. 9. Art. 1095.
<https://doi.org/10.3390/jof9111095>
- McMahon H.T., Gallop J.L.* Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling // *Nature*. 2005. V. 438. P. 590–596.
<https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Morita R.Y.* Psychrophilic bacteria // *Bacteriol. Rev.* 1975. V. 39. P. 144–167.
<https://doi.org/10.1128/membr.39.2.144-167.1975>
- Pudasaini S., Wilson J., Ji M., van Dorst J., Snape I., Palmer A.S., Burns B.P., Ferrari B.C.* Microbial diversity of Browning Peninsula, Eastern Antarctica revealed using molecular and cultivation methods // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00591>
- Redón M., Borrull A., López M., Salvadó Z., Cordero R., Mas A., Guillamón J.M., Rozès N.* Effect of low temperature upon vitality of *Saccharomyces cerevisiae* phospholipid mutants // *Yeast*. 2012. V. 29. P. 443–452.
<https://doi.org/10.1002/yea.2924>
- Renne M.F., de Kroon A.I.P.M.* The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes // *FEBS Lett.* 2018. V. 592. P. 1330–1345.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12944>
- Řezanka T., Kolouchová I., Sigler K.* Lipidomic analysis of psychrophilic yeasts cultivated at different temperatures // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2016. V. 1861. P. 1634–1642.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.07.005>
- Sahara T., Goda T., Ohgiya S.* Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 50015–50021.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209258200>
- Smith S.E., Read D.* Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, 2008. 3rd edn. 787 p.
- Su Y., Jiang X., Wu W., Wang M., Imran Hamid M., Xiang M., Liu X.* Genomic, transcriptomic, and proteomic analysis provide insights into the cold adaptation mechanism of the obligate psychrophilic fungus *Mrakia psychrophila* // *G3 Genes| Genomes| Genetics*. 2016. V. 6. P. 3603–3613.
<https://doi.org/10.1534/g3.116.033308>
- Tapia H., Koshland D.E.* Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. P. 2758–2766.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.005>
- Tiwari S., Thakur R., Shankar J.* Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi // *Biotechnol. Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2015/132635>
- Vigh L., Escribá P.V., Sonnleitner A., Sonnleitner M., Piotto S., Maresca B., Horváth I., Harwood J.L.* The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function // *Prog. Lipid Res.* 2005. V. 44. P. 303–344.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.08.001>
- Wang M., Jiang X., Wu W., Hao Y., Su Y., Cai L., Xiang M., Liu X.* Psychrophilic fungi from the world's roof // *Persoonia*. 2015. V. 34. P. 100–112.
<https://doi.org/10.3767/003158515X685878>
- Wang M., Tian J., Xiang M., Liu X.* Living strategy of cold-adapted fungi with the reference to several representative species // *Mycology*. 2017. V. 8. P. 178–188.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1370429>
- Watson K., Arthur H., Shipton W.A.* *Leucosporidium* yeasts: obligate psychrophiles which alter membrane-lipid and cytochrome composition with temperature. // *J. Gen. Microbiol.* 1976. V. 97. P. 11–18.
<https://doi.org/10.1099/00221287-97-1-11>
- Wei X., Zhang M., Chi Z., Liu G.-L., Chi Z.-M.* Genome-wide editing provides insights into role

- of unsaturated fatty acids in low temperature growth of the psychrotrophic yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *australis* W7-5 // Mar. Biotechnol. 2023. V. 25. P. 70–82.
<https://doi.org/10.1007/s10126-022-10182-4>
- Weinstein R.N., Montiel P.O., Johnstone K. Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic // Mycologia. 2000. V. 92. P. 222–229.
<https://doi.org/10.2307/3761554>
- Yusof N.A., Hashim N.H.F., Bharudin I. Cold adaptation strategies and the potential of psychrophilic enzymes from the antarctic yeast, *Glaciozyma antarctica* pi12 // J. Fungi. 2021. V. 7. Art. 528.
<https://doi.org/10.3390/jof7070528>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Cold Adaptation in a Psychrotolerant Micromycete *Mucor flavus*

O. A. Danilova^{1, *}, E. A. Ianutsevich¹, G.A. Kochkina², N. V. Groza³, and V. M. Tereshina¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russia

³MIREA Russian Technological University, Moscow, 119454 Russia

*e-mail: noitcelfer@mail.ru

Received December 7, 2023; revised January 5, 2024; accepted January 15, 2024

Abstract. To study the mechanisms of protection of the cell membranes and macromolecules from cold, the composition of osmolytes, membrane lipids, and their fatty acids in a submerged culture of *Mucor flavus* was analyzed in growth dynamics at 20 and 4°C. This micromycete is psychrotolerant, having a wide growth temperature range (from –2 to 25°C) with an optimum at 20°C. *Mucor flavus* has a high growth rate (15 mm/day at 20°C, 4 mm/day at 0°C). At both temperatures, phosphatidic acids and phosphatidylethanolamines were predominant in the composition of membrane lipids, while phosphatidylcholines were the minor components. The main difference in the composition of membrane lipids was the threefold lower share of sterols at 4°C. During growth under optimal conditions, the proportion of phosphatidic acids decreased against the background of a slight increase in the levels of sterols, phosphatidylethanolamines, and phosphatidylcholines, while at 4°C the proportion of phosphatidic acids decreased slightly and the proportion of phosphatidylcholines increased. The fatty acids composition of phospholipids during growth at 20°C did not change significantly; linoleic, oleic, linolenic, and palmitic acids were predominant. At 4°C, the proportion of palmitic acid decreased and that of oleic acid increased, while the proportion of γ -linolenic acid decreased by half while that of α -linolenic acid increased. However, these changes did not lead to a significant change in the unsaturation degree of phospholipids, which varied between 1.5 and 1.6. Trehalose and glucose were the predominant osmolytes of the cytosol; glycerol was present in minor amounts only at 4°C. At both temperatures, the amount of osmolytes reached 3% of the dry weight in the course of growth, and the proportion of trehalose reached 70%. At both temperatures, a constant composition of osmolytes and slight changes in the composition of membrane lipids and their degree of unsaturation were observed, which probably contributes to the high growth rate of the fungus over a wide temperature range.

Keywords: psychrotolerance, osmolytes, trehalose, membrane lipids, phosphatidic acids, sterols, degree of unsaturation

УДК 57.083.18+574.472

МИКРОВОДОРОСЛИ ЭРОДИРОВАННЫХ ПОЧВ СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ ФЕРГАНСКОЙ ДОЛИНЫ, УЗБЕКИСТАН

© 2024 г. Ю. А. Тухтабоева^а, Е. С. Кривина^б, В. В. Редькина^б, А. Д. Темралеева^б *

^аНаманганский государственный университет, Наманган, 160119, Узбекистан

^бВсероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ),

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, 142290, Россия

*e-mail: temraleeva.anna@gmail.com

Поступила в редакцию 01.12.2023 г.

После доработки 26.01.2024 г.

Принята к публикации 08.02.2024 г.

Впервые изучено культивируемое разнообразие микроводорослей эродированных почв северной части Ферганской долины (Узбекистан) на основе морфологического и молекулярно-генетического анализов. Было обнаружено 10 штаммов зеленых микроводорослей (Chlorophyta) и 1 – харофитовых (Charophyta). Только 7 штаммов микроводорослей было определено до вида: *Chlorella vulgaris*, *Chromochloris zofingiensis*, *Deuterostichococcus epilithicus*, *Pseudomuriella schumacherensis* и *Pseudostichococcus monallantoides*. Еще 4 штамма идентифицированы только до рода и нуждаются в дальнейших исследованиях: *Bracteacoccus* sp., *Chlorosarcinopsis* sp., *Klebsormidium* sp. и *Tetrastichococcus* sp. Невысокое видовое разнообразие микроводорослей можно объяснить как эродированностью и малопродуктивностью почв на склонах, так и особенностями культурального подхода, выявляющего только часть от реального разнообразия микроорганизмов. Колонизировать эродированные почвы в условиях засушливой предгорной зоны микроводоросли могут с помощью различных адаптаций: мелкие клеточные размеры, продукция внеклеточных экзополисахаридов, микоспорин-подобные аминокислоты и вторичные каротиноиды. Проведенное исследование может стать основой для дальнейшей разработки высокофункциональных консорциумов на основе микроводорослей с целью улучшения и устойчивого развития низкопродуктивных, засушливых, деградированных наземных экосистем.

Ключевые слова: микроводоросли, разнообразие, морфология, *rbcL*, ITS2, почвы, эрозия

DOI: 10.31857/S0026365624040024

Эрозия представляет собой деградацию почвенного покрова под действием поверхностного стока и (или) ветра с последующим перемещением и переотложением почвенного материала. Проблема охраны почв от эрозии актуальна для многих стран аридной зоны мира. Так, в Центральной Азии общая площадь, затронутая водной эрозией, составляет более 30 млн. гектаров, а ветровой эрозией – около 67 млн. гектаров; в частности, в Узбекистане до 80% сельскохозяйственных земель затронуты водной эрозией (ФАО ООН, 2015). При этом темпы, масштабы и интенсивность эрозии возрастают из-за некачественного управления почвенными ресурсами. Учитывая, что за последние 50 лет население Центральной Азии выросло в 3 раза, а водные ресурсы в сложных климатических условиях сокращаются, страны региона сталкиваются с серьезными вызовами в сфере продовольственной безопасности (ФАО ООН, 2015). Известно, что почвенные

биокорочки образуют наиболее продуктивную микробную биомассу во многих засушливых и нарушенных территориях, включая эродированные почвы, где высшая растительность редка, а ключевым компонентом биокорочек являются микроводоросли и цианобактерии (Glaser et al., 2018). Их можно охарактеризовать как “экосистемных инженеров”, которые играют важную экологическую роль в первичной продукции углерода, круговороте азота, минерализации, удержании воды, образовании водостойчивых агрегатов и стабилизации почв в целом (Evans, Johansen, 1999; Castillo-Monroy et al., 2010). Многие микроводоросли и цианобактерии выделяют высокогидратированные полимеры – экзополисахариды (ЭПС) в окружающую среду (Xiao, Zheng, 2016). Они имеют основополагающее значение для микробной жизни и обеспечивают идеальную среду для химических реакций, адсорбцию питательных веществ, защиту от стрессов окружающей среды,

таких как засоление и засуха, усиливая агрегацию почвенных частиц и поддерживая влажность окружающей среды (Costa et al., 2018). Таким образом, водоросли защищают нарушенные территории от эрозии (Metting, 1981), улучшают почвенные условия для колонизации более поздних сукцессионных видов, в том числе, способствуя успешному возобновлению роста сосудистых растений (Seitz et al., 2017). В связи с этим были предложены природоподобные технологии по восстановлению деградированных почв с помощью инокуляции микроводорослей и цианобактерий (Perera et al., 2018; Lu et al., 2022; Rabiei et al., 2023).

Цель данной работы – изучить культивируемое разнообразие микроводорослей эродированных почв северной части Ферганской долины (Узбекистан) с использованием методов световой микроскопии и ДНК-анализа. Молекулярно-генетическая идентификация почвенных микроводорослей Узбекистана проведена впервые.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описание районов исследования. Ферганская долина представляет собой межгорную впадину в горах Средней Азии, разделенную между тремя

государствами: Узбекистаном, Таджикистаном и Киргизией. В северной части Ферганской долины, на правом берегу реки Сырдарья расположена Наманганская область Республики Узбекистан. Климат в области континентальный, с сухим летом и мягкой, влажной зимой. Средняя температура в январе составляет 4°C, в июле 35°C. На равнинах количество осадков колеблется от 135 мм до 370 мм в год, в предгорных районах – от 460 до 630 мм. Почвенно-альгологические образцы были отобраны в трех административных единицах Наманганской области – Папском, Чустском и Чартакском районах (рис. 1).

Ниже приводим описание точек пробоотбора:

1. Чуст-Папские холмы (Папский район). Высота над уровнем моря 496 м. В результате размыва гравийные и третичные засоленные глины, а также каменно-гравийные оштукатуренные, осыпчато-скелетные, слабозбитые серо-бурые почвы. GPS-координаты: 40°52'37.14" с.ш. 70°59'44.76" в.д.

2. Резаксайские овраги (Чустский район). Высота над уровнем моря 502 м. Окрестности оврагов подвержены водной эрозии. Почвы аллювиальные, светло-серые со средним суглинком. GPS-координаты: 40°58'34.92" с.ш. 71°19'21.8" в.д.

3. Левые холмы (Чартакский район). Высота над уровнем моря 707 м. Почвы представлены

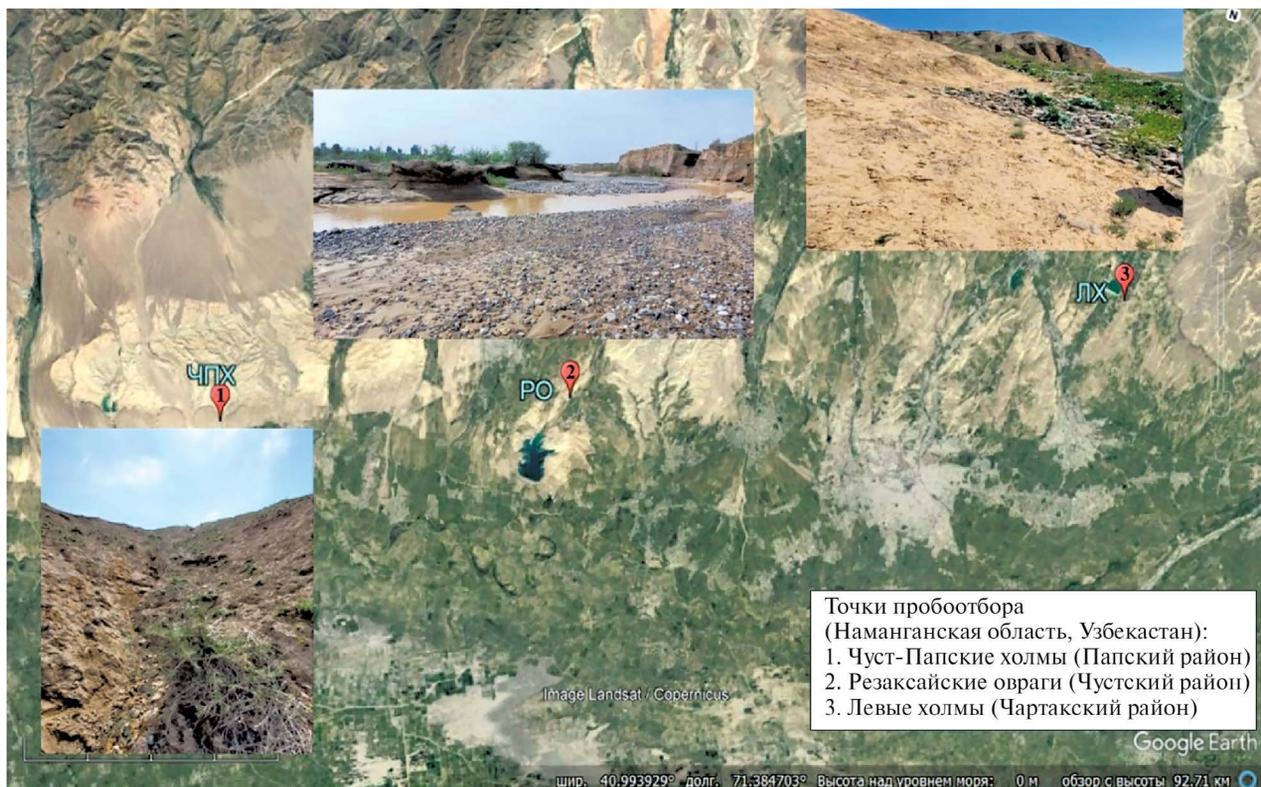


Рис. 1. Фотографии мест отбора почвенно-альгологических образцов и карта районов исследования эродированных почв северной части Ферганской долины с указанием точек отбора.

типичными сероземами с тяжелыми и средними суглинками, в разной степени промыты, места-ми покрыты гравием толщиной 0.5–1 м. GPS-координаты: 41°10'22.14" с.ш. 71°49'29.34" в.д.

Географические координаты были получены с помощью программы Google Earth Pro 7.1 (<https://www.google.com/earth/>).

Отбор почвенно-альгологических образцов. Почвенные пробы стерильно отбирали в апреле 2022 года из верхнего горизонта A1 на глубину 5–10 см. Металлический нож для пробоотбора обрабатывали 96%-ным этиловым спиртом и обжигали в пламени горелки. Пробы помещали в стерильные пакеты и транспортировали в лабораторию для дальнейших анализов. Всего было отобрано 4 смешанных почвенных пробы: по одной из Левых холмов и Резаксайских оврагов и две – из Чуст-Папских холмов.

Изоляция и культивирование штаммов микроводорослей. Для выделения водорослей применяли метод накопительных водно-почвенных и чашечных культур, а также посев почвенной суспензии на жидкие и агаризованные среды Bristol и BG-11 (Темралеева и соавт., 2014). Для получения монокультур использовали метод посева штрихом и изоляции отдельных колоний с помощью пипетки Пастера (Темралеева и соавт., 2014). Далее штаммы культивировали на твердой питательной среде BG-11 с азотом (pH 7.0; агар 1%) в климатостате при стандартных условиях (температура 23–25°C, интенсивность освещения 60–75 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, фотопериод 12 ч). Все изученные штаммы были депонированы в Альгологическую коллекцию ACCSI (<http://acssi.org/>).

Световая микроскопия. Морфологию и жизненные циклы штаммов микроводорослей изучали методом световой микроскопии с помощью микроскопа Leica DM750 (Германия). Результаты наблюдений документированы фотографиями,

снятыми с помощью цветной цифровой камеры Leica Flexacam C3 (Германия). Сроки наблюдения составляли от 1 до 12 недель. При морфологической идентификации штаммов микроводорослей учитывали важные диакритические признаки, такие как тип организации таллома, форма и размеры клеток, количество и тип хлоропласта, присутствие пиреноида, наличие и толщина слизистых оболочек, способ размножения и др. Для морфометрических измерений использовали программу Leica Application Suite X. Для сравнения размеров измеряли 100 клеток каждого штамма. При морфологической идентификации микроводорослей использовали тематические определители (Андреева, 1998; Ettl, Gärtner, 1995) и избранные статьи (Fucíková et al., 2011; Fucíková, Lewis, 2012; Pröschold, Darienko, 2020). За основу в данной работе выбрана система водорослей, принятая в международной электронной базе данных Algae Base (Guiry, Guiry, 2023).

Выделение тотальной ДНК, амплификация, очистка и секвенирование ампликонов. Суммарную ДНК из штаммов выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь Screen Mix-HS (“Евроген”, Россия). Условия и праймеры для амплификации *rbcL* (McManus, Lewis, 2011) и ITS2 (Johnson et al., 2007), которые были выбраны в качестве молекулярных маркеров для штамма *Klebsormidium* sp. и всех остальных микроводорослей, соответственно, указаны в таблице 1.

Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Standard (“Евроген”, Россия). Секвенирование осуществляли в коммерческой компании “Евроген” (Россия).

Молекулярно-филогенетический анализ. Для молекулярно-генетической идентификации штаммов

Таблица 1. Праймеры и условия амплификации ITS2 и *rbcL*

Локус	Праймер	Последовательность (5'–3')	Условия амплификации
ITS2	ITS-AF	CGTTTTCCGTAGGTGAACCTGC	95°C – 3 мин.; 95°C – 30 с, 57.6°C – 30 с, 72°C – 40 с, 30 циклов 72°C – 10 мин
	ITS-BR	CATATGCTTAAGTTCAGCGGG	
<i>rbcL</i>	M28F	GGTGTTGGATTWAAAGCTGGTGT	94°C – 5 мин; 94°C – 1 мин 15 с, 56°C – 2 мин, 72°C – 2 мин 15 с, 30 циклов; 72°C – 7 мин
	M1390Ra	CTTTCCAAAYTTCACAAGCAGCAG	
	M633F*	CATGCGTTGGAGAGACCGT	
	M650R*	CGGTCTCTCCAACGCATGA	

*Внутренние секвенирующие праймеры.

микроводорослей был осуществлен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей ITS2/*rbcL* по алгоритму BLASTn в GenBank NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Отбор последовательностей осуществляли исходя из критериев максимального родства (сходство $\geq 95\%$), качества прочтения (без вырожденных и неизвестных нуклеотидов), длины прочтения и принадлежности к типовым видам и коллекционным аутентичным штаммам. Множественное выравнивание было выполнено в программе BioEdit по алгоритму ClustalW. Выбор нуклеотидных замен осуществляли с помощью программы IQ-TREE v. 2.2, ориентируясь на минимальное значение BIC критерия (Bayesian information criterion). Оценка топологии ветвей с помощью теста SH-aLRT была реализована в блоке построения филогенетического дерева uGENE. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей с помощью метода максимального правдоподобия (ML) осуществляли в программе PhyML, с использованием байесовского вывода (BI) – с использованием программного пакета BEAST 2 v. 2.7.5 и рекомендаций Barrido-Sottani et al. (2018). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT-поддержки (SH-aLRT), бутстреп-поддержки ML (BP) и апостериорных вероятностей BI (PP). Филогенетические деревья были визуализированы в программе FigTree v. 1.3.1. Различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических различий, мерой которых являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выровненных последовательностей, вычисленный в программе MEGA 11. Для сравнения топологий деревьев использовали данные статей Fuciková, Lewis (2012); Mikhailuyk et al. (2015); Samolov et al. (2018); Pröschold, Darienko (2020); Krivina et al. (2023) и др.

Для анализа вторичной структуры ITS2 была выполнена аннотация спейсера в ITS2-DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) и его фолдинг с помощью веб-сервера RNAfold web server (<http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), руководствуясь принципом минимальной энергии. Правильность фолдинга ITS2 микроводорослей оценивали, ориентируясь на работу Caisová et al. (2013). Сравнение вторичной структуры ITS2 между штаммами и поиск компенсаторных замен (CBCs) осуществляли между всеми штаммами выборки в программе 4SALE. При анализе вторичных структур ITS2 для разделения видов особое внимание было уделено подходу, предложенному A. Coleman (2009), который показал, что наличие хотя бы одной CBC в консервативных регионах ITS2 (5 п.н. I шпильки, 10 п.н. II шпильки, вся III шпилька) у двух микроводорослей коррелирует с их полной половой несовместимостью. Напротив, CBC в менее консервативных регионах не были связаны со способностью скрещиваться.

Все полученные последовательности были депонированы в GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами OR838744 (*rbcL*) и OR852641–OR852650 (ITS2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате изоляции и очистки были получены 2 штамма микроводорослей из почв Левых холмов, 4 штамма из почв Чуст-Папских холмов и 5 штаммов из почв Резаксайских оврагов. Из 11 альгологически чистых культур 10 принадлежали зеленым микроводорослям (Chlorophyta) и 1 – харофитовым (Charophyta). Ниже приводим их морфологическое описание и молекулярно-генетический анализ по районам исследования.

Морфологический и молекулярно-генетический анализ штаммов микроводорослей

***Klebsormidium* sp. ACSSI 436 (Чуст-Папские холмы).** Клетки в однорядных неразветвленных, легко распадающихся нитях, цилиндрической формы, на концах нитей – закругленные, 7–8 мкм шириной, 7–22 мкм длиной. Клеточная стенка тонкая и гладкая. Хлоропласт один – пристенный, с одним пиреноидом в центре, окруженным крахмальной оберткой. Бесполое размножение фрагментацией нитей, зооспорогенез в культуре не наблюдали. Таким образом, штамм является единственным представителем харофитовых водорослей и, в целом, соответствует описанию рода *Klebsormidium* (рис. 2а).

Для него ген 18S рРНК, а также внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) являются консервативными молекулярными маркерами; последние не позволяют провести четкое разделение между некоторыми кладами (особенно В и С) и между видами (особенно в кладе Е) по данным Mikhailuyk et al. (2015). Поэтому для видовой идентификации представителей данной группы используют более вариабельный пластидный ген *rbcL*. Исследуемый штамм ACSSI 436 вошел в состав клады Е рода *Klebsormidium* в соответствии с классификацией, предложенной F. Rindi et al. (2011). В рамках данной клады он совместно с рядом неаутентичных штаммов *Klebsormidium* spp. формировал независимый кластер (рис. 3).

Генетические дистанции внутри данного кластера варьировали в диапазоне 0–2.2%. Между ACSSI 436 и аутентичным штаммом *K. subtile* SAG 384-1, формирующим сестринскую филогенетическую линию, уровень генетических различий составлял 3.7%. На примере представителей клад F и G, видовое разнообразие которых в настоящее время наиболее полно описано (Mikhailuyk et al., 2015; Samolov et al., 2018), можно сказать, что

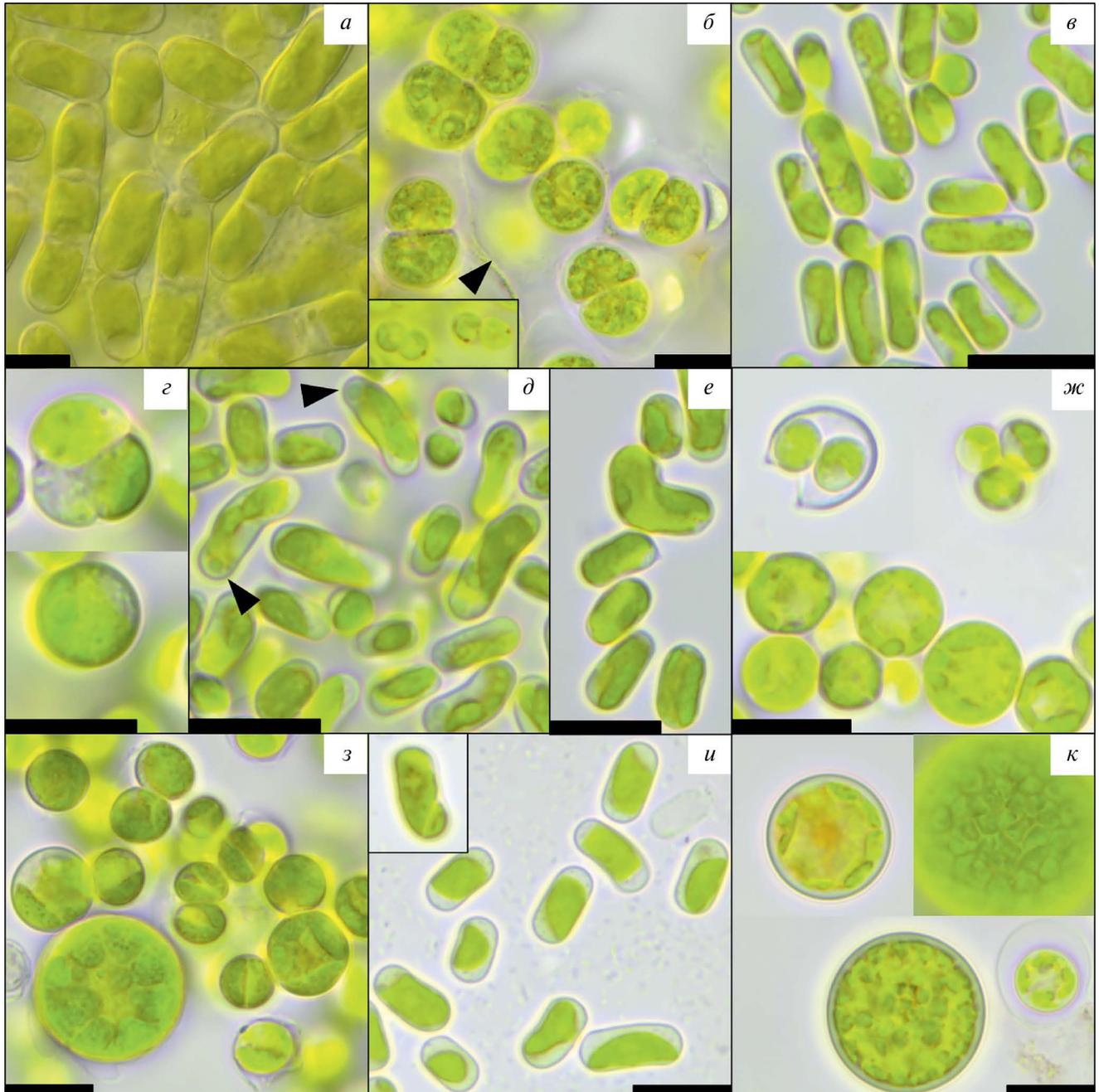
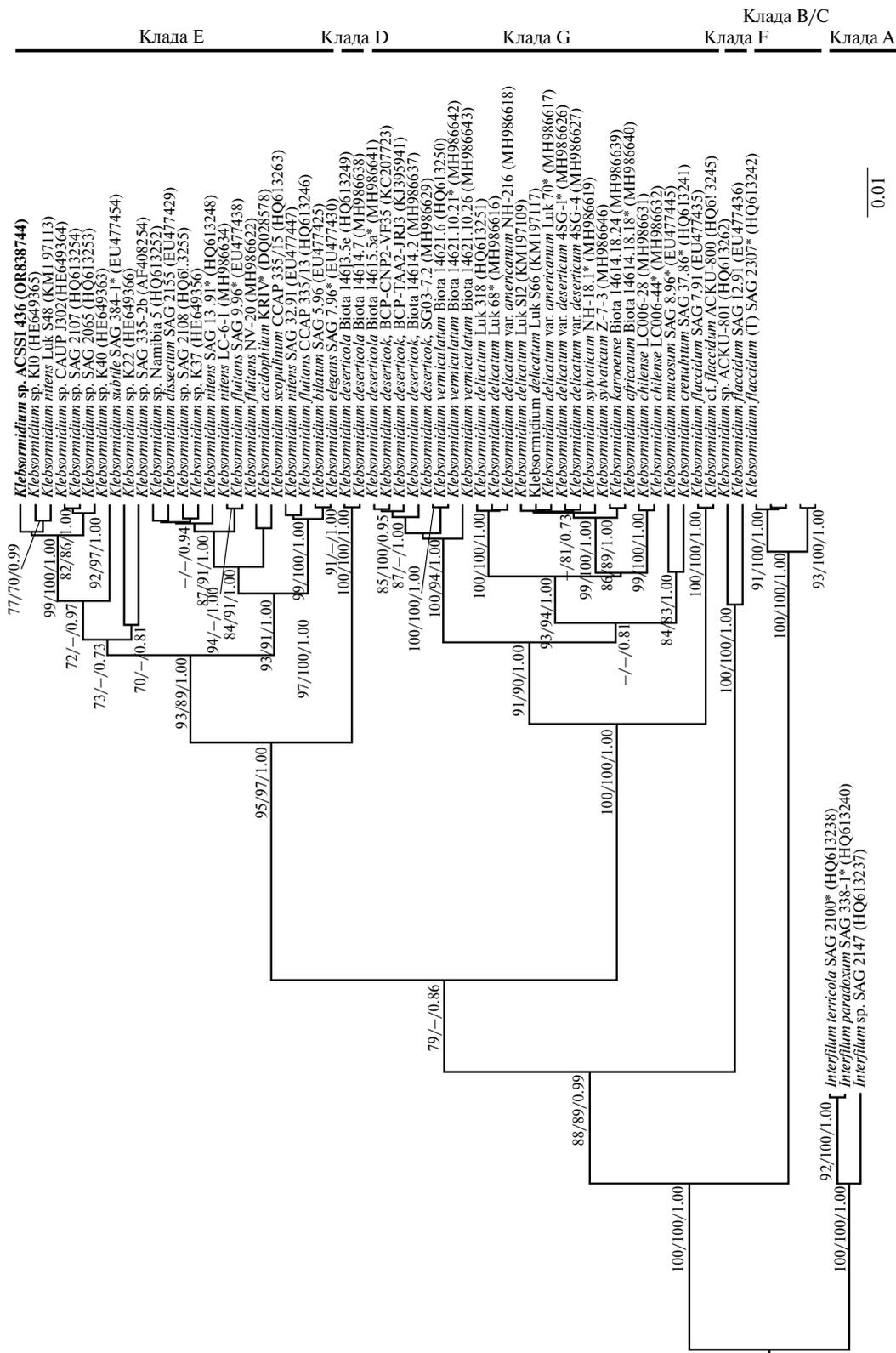


Рис. 2. Фотографии штаммов микроводорослей, выделенных из эродированных почв Ферганской долины: а – *Klebsormidium* sp. ACSSI 436; б – *Chlorosarcinopsis* sp. ACSSI 445, на вставке продемонстрированы зооспоры, стрелка указывает на слизь; в – *Tetrastichococcus* sp. ACSSI 446; г – *Chlorella vulgaris* ACSSI 441; д – *Pseudostichococcus monallantoides* ACSSI 438, стрелки указывают на капли масла; е – *P. monallantoides* ACSSI 439; ж – *Chromochloris zofingiensis* ACSSI 437; з – *Pseudomuriella schumacherensis* ACSSI 444; и – *Deuterostichococcus epilithicus* ACSSI 440; к – *Bracteacoccus* sp. ACSSI 443. Масштабная метка – 10 мкм.

уровень межвидовых различий внутри рода колеблется от 2 до 16.6% по *rbcL*. Таким образом, учитывая независимое филогенетическое положение исследуемого штамма ACSSI 436 и уровень генетических различий с сестринским аутентичным

штаммом *K. subtile* SAG 384-1, он, вероятно, является кандидатом в новый неописанный вид и пока идентифицирован как *Klebsormidium* sp.

***Chlorosarcinopsis* sp. ACSSI 445 (Чуст-Панские холмы).** Клетки в пакетах по 2–4 и более клеток



0,01

Рис. 3. Укорененное филогенетическое дерево харофитовых микроводорослей рода *Klebsormidium*, построенное методом Байеса, на основе последовательностей пластидного гена *rbcL* (1255 н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT/VP/PP. Значения SH-aLRT и VP менее 70% и PP менее 0.7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: TIM2 + F + I + G4. Обозначения: * – аутентичные штаммы; (T) – типовой вид.

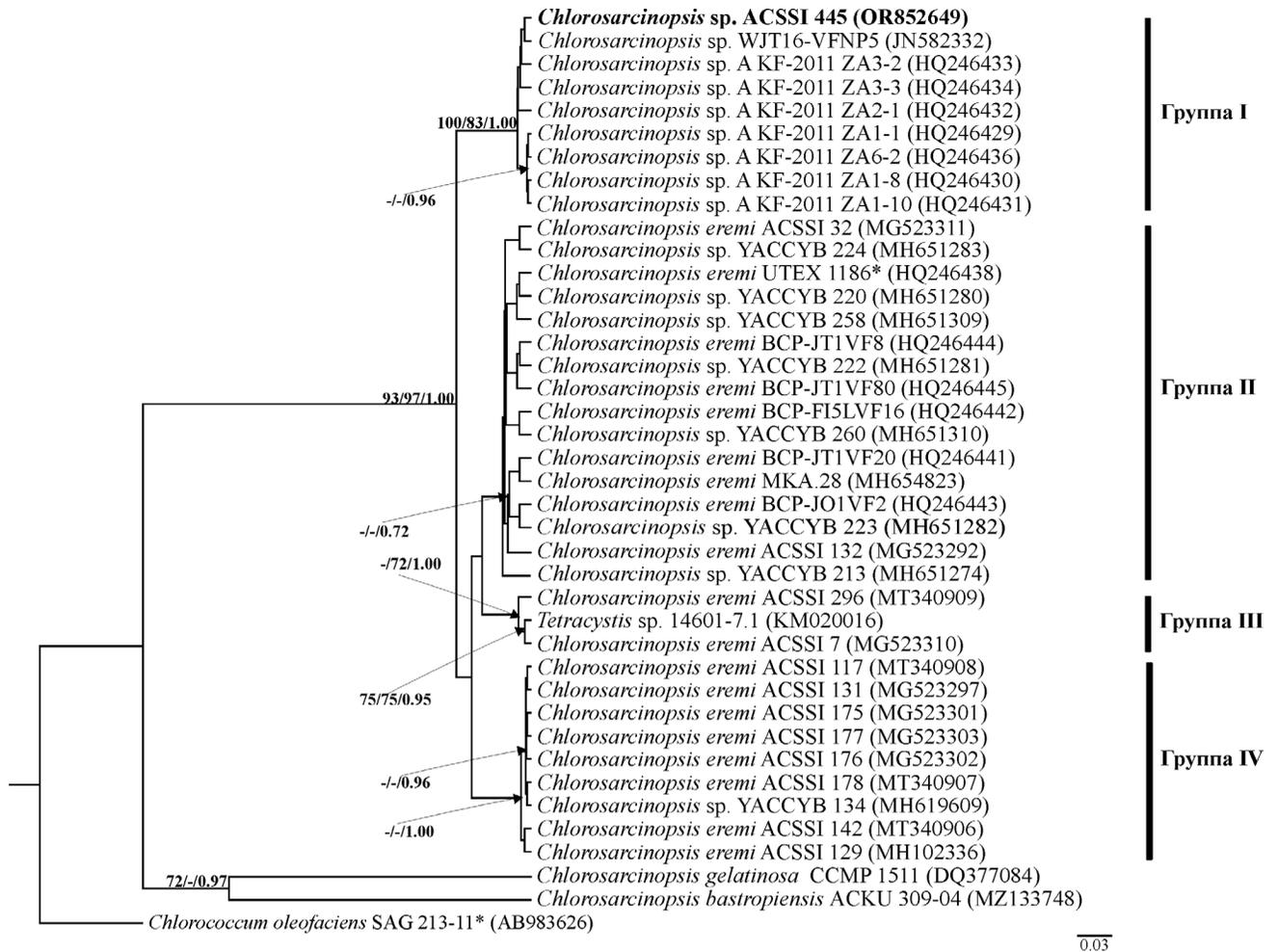


Рис. 4. Укорененное филогенетическое дерево исследуемых зеленых микроводорослей рода *Chlorosarcinopsis*, построенное методом Байеса, на основе последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 (284 н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT/BP/PP. Значения SH-aLRT и BP менее 70% и PP менее 0.7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: TIM2e + G4. Обозначения: * – аутентичные штаммы.

со слизью, иногда образуют псевдонитчатые скопления. Одиночные клетки шаровидные, в клеточных агрегатах – слегка уплощенные, до 12 мкм в диаметре. Хлоропласт один, в молодых клетках пристенный чашевидный, во взрослых занимает всю полость клетки, с одним пиреноидом, окруженным крахмальной оберткой. Запасные продукты – оранжевые липидные капли. При старении культура краснеет. Размножение голыми зооспорами широко эллипсоидной или шаровидной формы 3.5–4 мкм в диаметре, со стигмой. От описания *C. eremi* отличается наличием слизи (рис. 2б), формой и размерами зооспор – в диагнозе вида указана яйцевидная форма и длина до 11 мкм (Андреева, 1998). По данным молекулярно-генетического анализа ITS2, исследуемый штамм ACSII 445 вошел в состав кластера, объединяющего штаммы *Chlorosarcinopsis eremi*, но разделенного на 4 группы (рис. 4).

Штамм ACSII 445 вошел в состав группы I. Уровень генетических различий между ним и другими членами – 0–1.6%. Аутентичный штамм UTEX 1186 вошел в состав группы II, в рамках которой генетические дистанции составляли 0–0.5%. Генетические различия в группе III варьировали в диапазоне 1.1–2.2%, в группе IV – 0–1.1%. При этом генетические дистанции между штаммом ACSII 445 и аутентичным штаммом UTEX 1186 были равны 3.8%, а в целом между представителями разных групп – от 1.6 до 5.5%. Различия ITS2 между кластером *C. eremi*, неаутентичным штаммом *C. gelatinosa* и неаутентичным штаммом *C. bastropiensis* составляли 33–40.6%. CBCs отсутствовали. В связи с ограниченной выборкой видов *Chlorosarcinopsis*, у которых есть доступные последовательности ITS2, четко идентифицировать границы межвидовой и внутривидовой изменчивости

не представляется возможным. Поэтому штамм ACSSI 445 определен как *Chlorosarcinopsis* sp.

***Tetratostichococcus* sp. ACSSI 446 (Чуст-Папские холмы).** Клетки цилиндрические с закругленными концами, иногда слегка искривленные (рис. 2в). Размеры клеток 4–19 × 2.5–3.9 мкм. Средний размер 7.8 × 3.2 мкм при отношении длины к ширине 2.4. Хлоропласт один, пристенный, с пиреноидом. Изредка в культуре наблюдали короткие нити из 2 клеток. Размножение осуществлялось вегетативным делением клеток или фрагментацией нитей. В целом соответствует описанию вида *Tetratostichococcus jenerensis* (Neustupa et al., 2007; Pröschold, Darienko, 2020). Штамм ACSSI 446 группировался со штаммами *Tetratostichococcus jenerensis* (рис. 5).

Уровень генетических различий ITS2 с аутентичным штаммом SAG 2138 составил 3.5%, со штаммом KS126SM6L – 2.1%. При этом была обнаружена 1 CBC в вариабельном регионе шпильки I (10 п.н.) (ESM_1), отличающая штамм KS126SM6L от других представителей кластера (дополнительные материалы). Так как род *Tetratostichococcus* монотипный и включает всего три опубликованные последовательности ITS2, данная группа нуждается в дополнительном изучении. Штамм ACSSI 446 был идентифицирован как *Tetratostichococcus* sp.

***Chlorella vulgaris* ACSSI 441 (Чуст-Папские холмы), ACSSI 442 (Резаксайские овраги).** Клетки одиночные или в скоплениях, шаровидные, 3–11 мкм в диаметре (рис. 2г). Хлоропласт один, пристенный, чашевидный, с одним пиреноидом, окруженным крахмальным оберткой. Размножение 2–8 автоспорами. В целом соответствует описанию вида *Chlorella vulgaris* (Андреева, 1998). Исследуемые штаммы ACSSI 441 и ACSSI 442 в рамках клады *Chlorella* формируют кластер с представителями *C. vulgaris* (рис. 6), в т.ч. аутентичным штаммом SAG 211-11b.

Генетические дистанции между ACSSI 441 и ACSSI 442 – 1.4%, ACSSI 441 и SAG 211-11b – менее 0.6%, ACSSI 442 и SAG 211-11b – 1.3%. В рамках клады *Chlorella* такой уровень генетических различий ITS2 соответствует внутривидовому уровню. Для сравнения наименьшие межвидовые генетические различия в рамках данной клады отмечены между *Micractinium variabile* и *M. singulare* – 1.5%. CBCs отсутствуют. Таким образом, штаммы ACSSI 441 и ACSSI 442 отнесены к виду *C. vulgaris*.

***Pseudostichococcus monallantoides* ACSSI 438, ACSSI 439 (Резаксайские овраги).** Штамм ACSSI 438 характеризовался цилиндрическими клетками с закругленными концами, иногда искривленными или расширенными с одной из сторон (рис. 2д). Размеры клеток 3.6–13 × 2.7–4.1 мкм. Средний

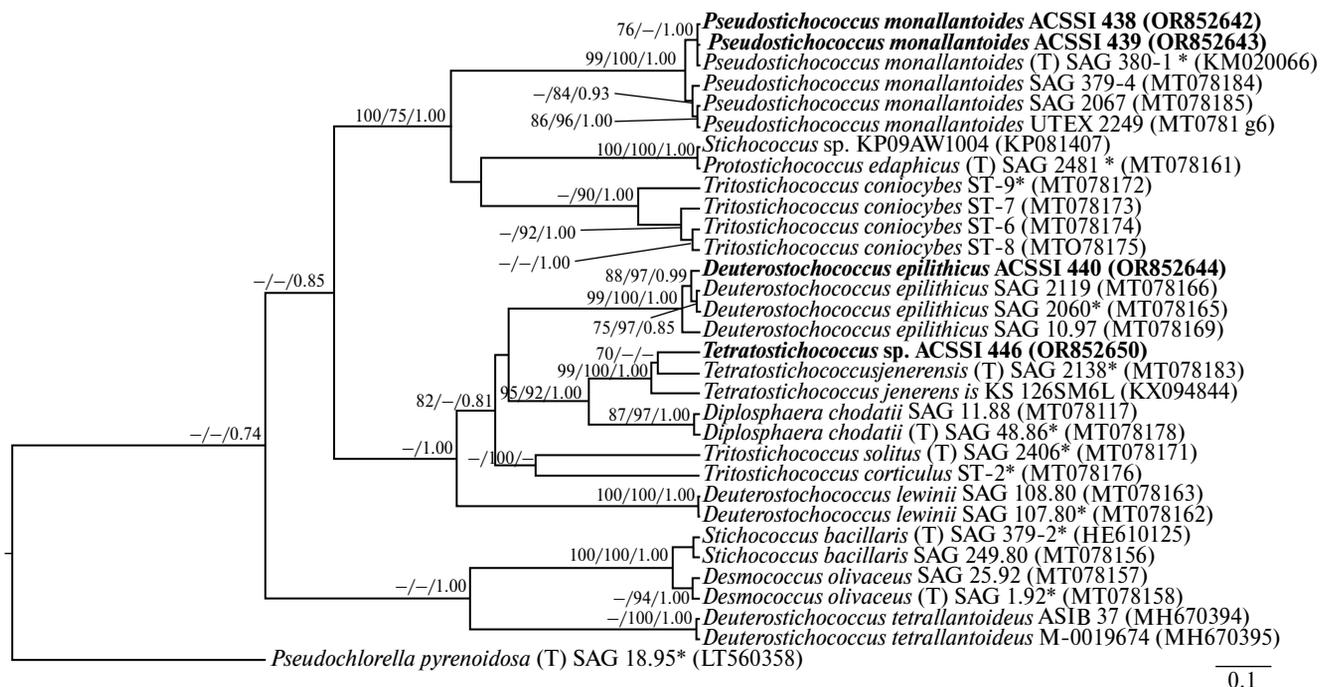


Рис. 5. Укорененное филогенетическое дерево зеленых микроводорослей *Stichococcus*-клады, построенное методом Байеса, на основе последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 (375 н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT/VP/PP. Значения SH-aLRT и VP менее 70% и PP менее 0.7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: НКУ + F+ G4. Обозначения: * – аутентичные штаммы; (T) – типовый вид.

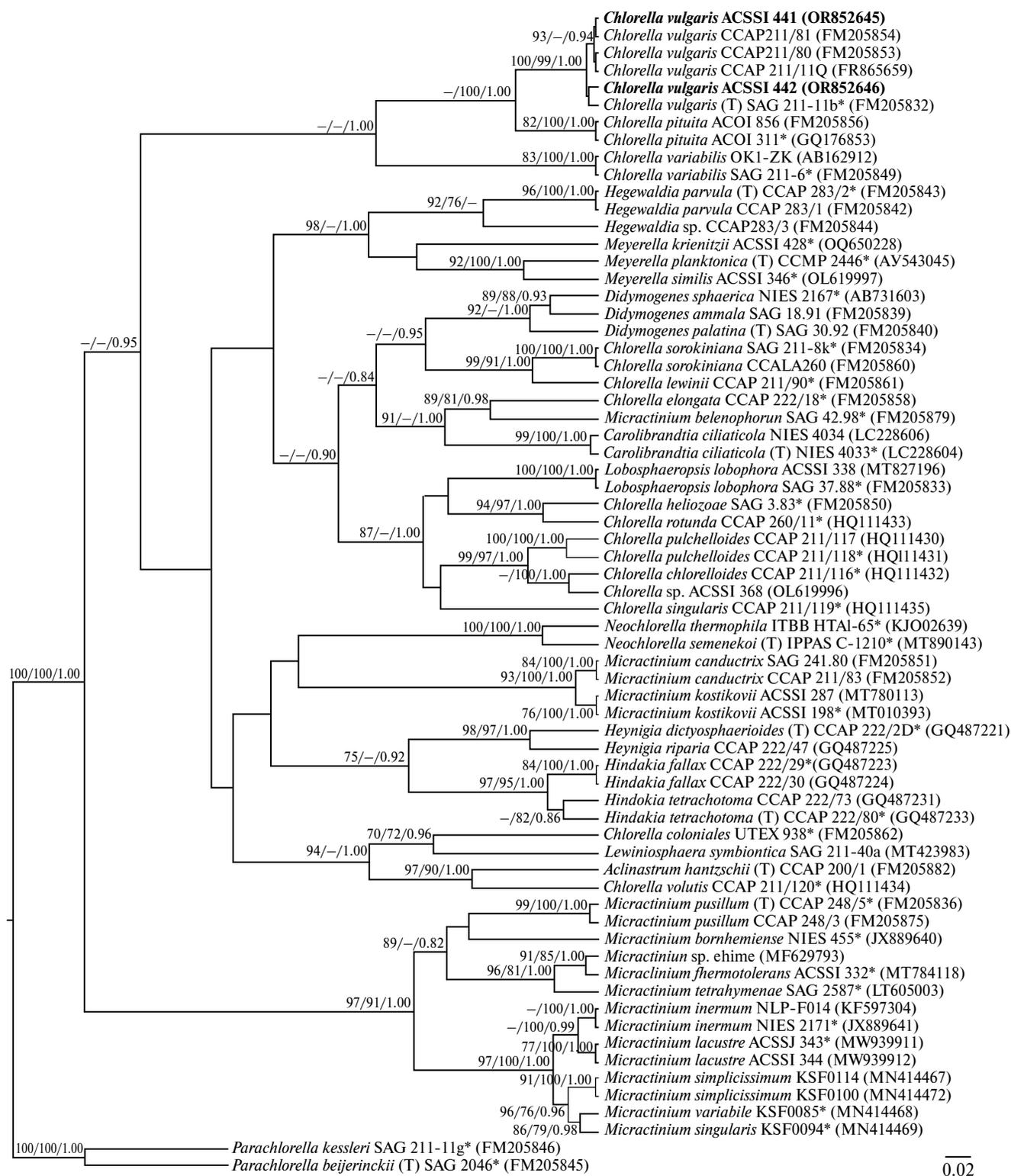


Рис. 6. Укорененное филогенетическое дерево зеленых микроводорослей клады *Chlorella*, построенное методом Байеса, на основе последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 (287 н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT/VP/PP. Значения SH-aLRT и VP менее 70% и PP менее 0.7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: TIM2 + F + I + G4. Обозначения: * – аутентичные штаммы; (T) – типовой вид.

размер 6×3.3 мкм при отношении длины к ширине 1.8. Хлоропласт один, пристенный, без пиреноида. В клетках хорошо заметны липидные капли. Образование нитей в культуре не наблюдали. Размножение осуществлялось вегетативным делением клеток. Штамм ACSSI 439 имел сходную морфологию: цилиндрические клетки с закругленными концами, иногда искривленные или расширенные с одной из сторон. Размеры клеток $4.8-14 (-28) \times 3.4-4.6$ мкм. Средний размер 7.8×4.3 мкм при отношении длины к ширине 1.8. Хлоропласт один, пристенный, без пиреноида. Характерно формирование коротких нитей из 2–4 клеток. При длительном культивировании наблюдали аэрофильную фазу – образование длинных нитей в воздухе. О подобном явлении сообщалось и в работе Л. Моевус (1951). При старении культуры встречались уродливые гигантские клетки. Размножение осуществлялось вегетативным делением клеток или фрагментацией нитей. Морфологические характеристики штаммов в целом соответствует описанию вида *Pseudostichococcus monallantoides*. Однако в оригинальном описании указаны несколько меньшие размеры клеток – $4-6 \times 2-2.5$ мкм (Моевус, 1951). Кроме того, Л. Моевус сообщал об образовании зооспор, что впоследствии подтверждено не было (Pröschold, Darienko, 2020; данное исследование). По итогам филогенетического анализа ITS2 штаммы ACSSI 438 и ACSSI 439 кластеризовались с представителями *Pseudostichococcus monallantoides* с высокими статистическими поддержками (рис. 5). При этом генетические различия с аутентичным штаммом SAG 380-1 отсутствовали, CBCs, соответственно, тоже. На основе этого штаммы ACSSI 438 и ACSSI 439 были отнесены к виду *P. monallantoides*.

***Chromochloris zofingiensis* ACSSI 437 (Резаксайские овраги).** Клетки одиночные, зрелые – шаровидные, молодые и автоспоры – шаровидные, яйцевидные или полигональные (рис. 2е). Диаметр зрелых клеток – до 11 мкм, автоспор – от 3.5 мкм. Хлоропласт один пристенный, в молодых клетках – чашевидный, в зрелых – почти поло-сферический, лопастной или с неровными краями, или разделенный на многоугольные диски, без пиреноида. Размножение 2–4 автоспорами. При длительном культивировании (более 6 мес.) отмечено наличие оранжевых липидных капель, что свидетельствует о накоплении вторичных каротиноидов. В целом штамм соответствует описанию вида *Chromochloris zofingiensis* (Андреева, 1998; Fucíková, Lewis, 2012). Филогенетический анализ с использованием ITS2 показал, что штамм ACSSI 437 принадлежит виду *Chromochloris zofingiensis* (рис. 7а). Это также подтверждается низким уровнем генетических различий с аутентичным штаммом SAG 211-14 (0.6%) и отсутствием CBCs.

***Pseudomuriella schumacherensis* ACSSI 444 (Резаксайские овраги).** Клетки одиночные, шаровидные или слегка неправильной формы, 6–20 мкм в диаметре (рис. 2ж). Хлоропласт один, пристенный, без пиреноида, в молодых клетках разделенный на две доли, в зрелых – на несколько сегментов. Запасные вещества – оранжевые липидные капли. Бесполое размножение путем образования автоспор (от 2 штук в материнском спорангии), иногда разного размера. В целом соответствует описанию вида *Pseudomuriella schumacherensis*. Однако в диагнозе приводятся меньшие размеры зрелых клеток в культуре – до 11 мкм. Кроме того, мы не наблюдали образование апланоспор и зооспор. Результаты филогенетического анализа подтвердили это предположение (рис. 7б). Генетические дистанции между исследуемым штаммом и аутентичным штаммом *P. schumacherensis* UTEX 2252 были равны 0.5%, что соответствовало внутривидовому уровню различий. Межвидовые генетические дистанции в рамках рода *Pseudomuriella* составляют 1.6–21%. CBCs также не обнаружены.

***Deuterostichococcus epilithicus* ACSSI 440 (Левые холмы).** Клетки цилиндрические с закругленными концами, иногда слегка искривленные (рис. 2з). Размеры клеток $6-23 \times 3.9-4.8$ мкм. Средний размер 8.6×4.6 мкм при отношении длины к ширине 1.9. Хлоропласт один, пристенный, с голым пиреноидом. Изредка в культуре наблюдали короткие нити из двух клеток. Размножение осуществлялось вегетативным делением клеток или фрагментацией нитей. В целом соответствует описанию вида *Deuterostichococcus epilithicus* (Pröschold, Darienko, 2020), однако для нашего штамма характерны несколько большие размеры клеток. Исследуемый штамм ACSSI 440 вошел в состав группы, объединяющей представителей *Deuterostichococcus epilithicus* (рис. 5) с высоким уровнем статистической поддержки. Генетические дистанции с аутентичным штаммом SAG 2060 составили 1.4%. Для сравнения, внутривидовые генетические дистанции у других представителей рода *Deuterostichococcus* составляли от 0 до 3.5%, межвидовые – от 23 до 29%. CBCs между ACSSI 440 и SAG 2060 отсутствовали. Таким образом, штамм ACSSI 440 был отнесен к виду *Deuterostichococcus epilithicus*.

***Bracteaococcus* sp. ACSSI 443 (Левые холмы).** Клетки одиночные, шаровидные, 4–40 мкм в диаметре (рис. 2и). Клеточная оболочка с возрастом утолщается до 2.3 мкм. В молодых клетках по 2–4 хлоропласта, в зрелых – многочисленные, без пиреноидов. Запасные вещества – оранжевые липидные капли. Бесполое размножение путем образования автоспор (от 4 штук в материнской клетке), зооспорогенез в культуре не наблюдали. В целом соответствует описанию вида *Bracteaococcus minor* (Андреева, 1998). Штамм ACSSI 443 объединился с представителями

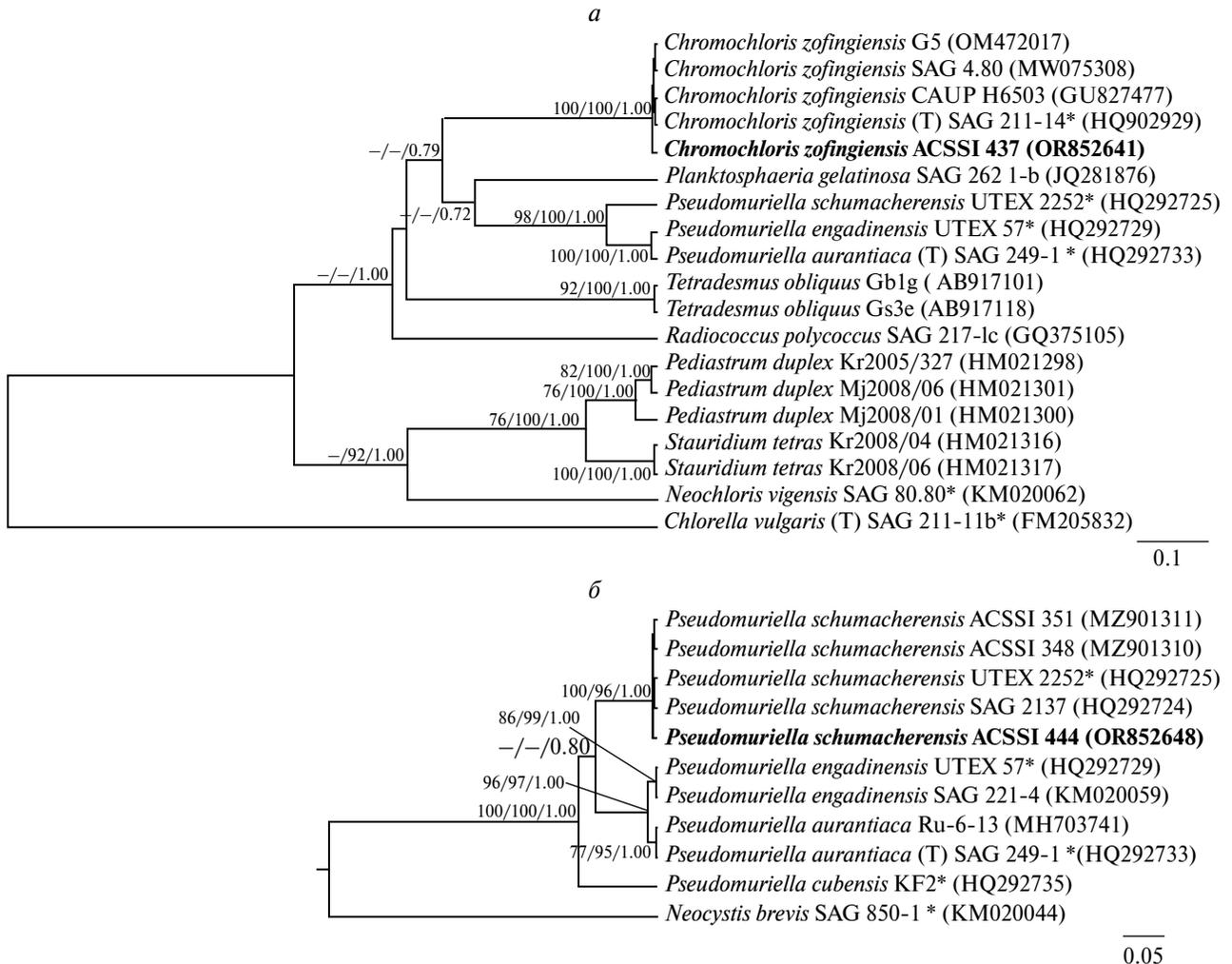


Рис. 7. Укорененные филогенетические деревья зеленых микроводорослей рода *Chromochloris* (а) и *Pseudomuriella* (б), построенные методом Байеса, на основе последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 (321 и 280 н., соответственно). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT/BP/PP. Значения SH-aLRT и BP менее 70% и PP менее 0.7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: TIM2 + G4 и TNe + G4, соответственно. Обозначения: * – аутентичные штаммы; (T) – типовой вид.

B. aggregatus, *B. occidentalis*, *B. minor*, *B. medionucleatus*, *B. grandis* с высокой статистической поддержкой в один кластер (рис. 8).

Уровень генетических различий ITS2 между исследуемым штаммом и остальными представителями кластера варьировал от 1 до 2.2%. СВС отсутствовали. Систематика рода *Bracteacoccus* сложна: диапазоны межвидовых и межродовых генетических различий перекрываются. Так, внутривидовые дистанции, как правило, составляли 0–1.6%. Однако между штаммами внутри вида *B. glacialis* – 4.8%, *B. aerius* – 8.2%. Межвидовые дистанции колебались 0–30.7%. Например, между *B. minor* и *B. grandis* генетические различия в ITS2 отсутствовали. В связи с этим данный штамм был идентифицирован как *Bracteacoccus* sp.

Особенности альгофлоры эродированных почв

Верхний горизонт почв всех трех районов исследования вследствие высокой степени эродированности и изреженности растительного покрова являлся малопродуктивным, с нейтральными значениями рН, низким содержанием гумуса, аммонийного азота, подвижного фосфора и калия (Тухтабоева и соавт., 2023). Изученные штаммы зеленых микроводорослей принадлежали классам Chlorophyceae (*Chlorosarcinopsis*, *Chromochloris*, *Pseudomuriella*, *Bracteacoccus*) и Trebouxiophyceae (*Chlorella*, *Tetradostichococcus*, *Pseudostichococcus*, *Deuterostichococcus*). Единственный штамм харофитовых микроводорослей *Klebsormidium* sp. – отнесен к классу Klebsormidiophyceae. Невысокое видовое

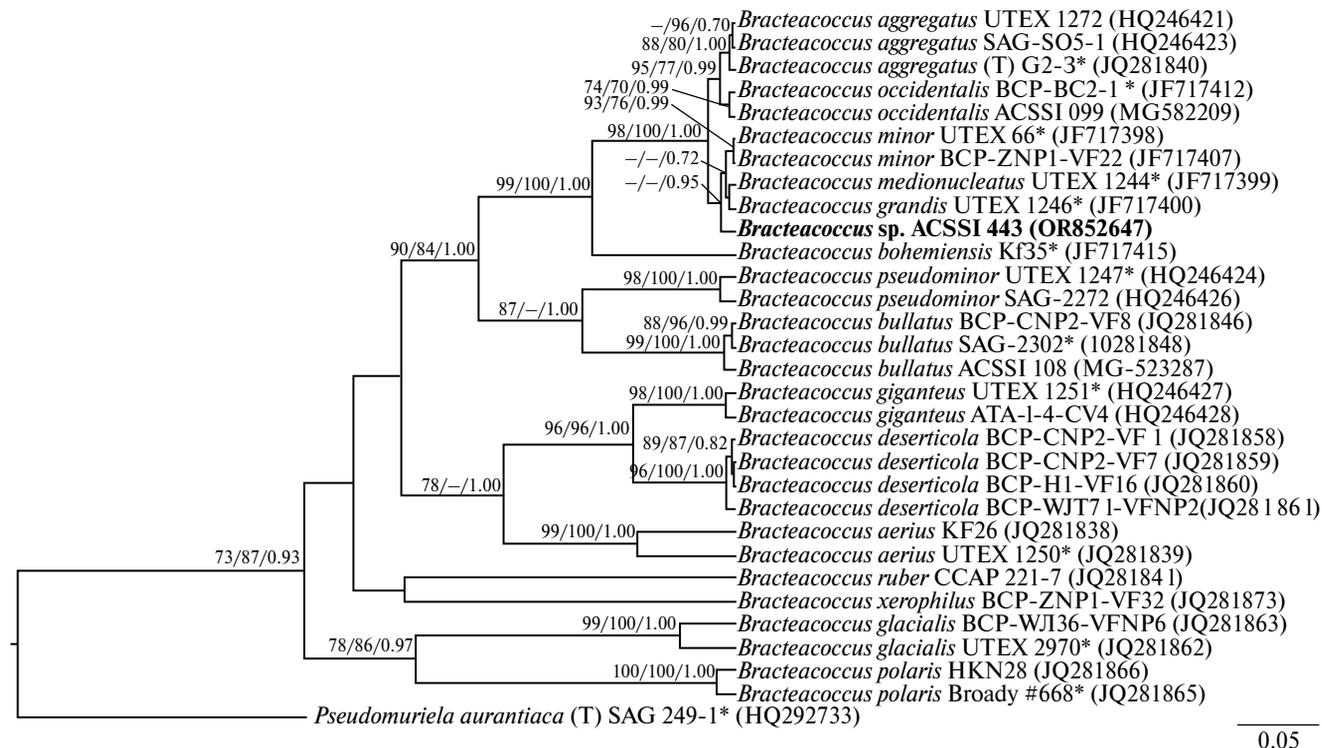


Рис. 8. Укорененное филогенетическое дерево зеленых микроводорослей рода *Bracteacoccus*, построенное методом Байеса, на основе последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 (347 н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT/BP/PP. Значения SH-aLRT и BP менее 70% и PP менее 0.07 не указаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + F + G4. Обозначения: * – аутентичные штаммы; (T) – типовый вид.

разнообразии микроводорослей – 11 штаммов, принадлежащих 8 родам, 3 классам и 2 отделам, можно объяснить как нестабильными условиями окружающей среды, вызванными постоянной водной эрозией исследованных почв на крутых склонах, так и особенностями культурального подхода. Последний занижает реальное богатство микроводорослей, сводя его к культивируемому разнообразию, что составляет лишь небольшую часть от реального (Langhans et al., 2009). Так, при сравнении данных высокопроизводительного секвенирования с данными, полученными при микроскопии культур микроводорослей почвенных биокорочек Шпицбергена и острова Ливингстон, богатство (на уровне родов) различалось в 11 раз (Rippin et al., 2018).

Полученные штаммы микроводорослей имеют космополитное распространение во многих наземных и (или) пресноводных экосистемах (Ettl, Gärtner, 1995; Андреева, 1998). Многие из них, а именно представители родов *Klebsormidium*, *Chlorosarcinopsis*, *Chlorella*, *Bracteacoccus*, *Pseudomuriella*, *Pseudostichococcus* были отмечены в составе альгофлоры эродированных почв и почвенных биокорочек холодных, засушливых,

засоленных, загрязненных местообитаний (Дубовик, 1995, 2004; Pluis, 1994; Evans, Johansen, 1999; Lukešová, 2001; Fischer, Subbotina, 2014; Karsten et al., 2016; Sommer et al., 2020; Rybalka et al., 2023). Нитчатые (*Klebsormidium*) и сарциноидные/псевдонитчатые (*Chlorosarcinopsis*) водоросли стабилизируют почвенные частицы, склеивая их вместе за счет выделения слизи. Они обычно встречаются в небольшом разнообразии, но могут производить высокую биомассу. Коккоидные водоросли (в нашем исследовании это *Chlorella*, *Chromochloris*, *Pseudomuriella*, *Bracteacoccus*, *Tetratostichococcus*, *Pseudostichococcus*, *Deuterostichococcus*) прикрепляются к частицам почвы и обычно встречаются с более высоким разнообразием, но с меньшей биомассой (Büdel et al., 2016). Пустынные и другие наземные зеленые водоросли представляют собой микроскопические, в основном одноклеточные шаровидные или палочковидные формы диаметром 10–50 мкм, в некоторых случаях образуют небольшие клеточные агрегаты (Cardon et al., 2008). Колонизировать эродированные почвы микроводоросли могут с помощью различных адаптаций. К ним относится способность к вторичному каротиногенезу зеленых микроводорослей родов *Chromochloris*,

Pseudomuriella и *Bracteacoccus*, которая является защитным механизмом против неблагоприятных условий окружающей среды, например, яркого света, недостатка питательных веществ, образования активных форм кислорода, осмотического стресса и др. (Chekanov, 2023). Для членов *Prasiola*-клады, в которую входят роды *Tetratostichococcus*, *Pseudostichococcus* и *Deuterostichococcus* (Karsten et al., 2005), а также рода *Klebsormidium* (Kitzing et al., 2014; Hartmann et al., 2020), показана способность к продукции микоспорин-подобных аминокислот, которые защищают клетки от ультрафиолетового излучения и окислительного повреждения при высокой инсоляции, дефиците влаги, осмотическом и тепловом стрессах. Кроме того, перечисленные роды микроводорослей были устойчивы к высыханию (Holzinger et al., 2014; Van, Glaser, 2022).

Более того, некоторые из описанных таксонов были ранее обнаружены в экосистемах Узбекистана. Так, представители рода *Klebsormidium* были неоднократно описаны, например, *K. dissectum* (как *Hormidium dissectum*) – в почвах виноградников (Мусаев, 1960), в почвах пустыни Кызылкум (Троицкая, 1961), *K. flaccidum* (как *H. flaccidum*) и *K. nitens* (как *H. nitens*) – в пахотных и целинных почвах (Бут, 1959; Мусаев, 1960; Троицкая, 1961), *K. rivulare* (как *H. rivulare*) – в почвах пустыни Кызылкум (Троицкая, 1961), *K. subtile* (как *H. subtile* и *Ulothrix subtilissima*) – в почвах рисовых полей, болотах (Киселев, 1931) и в пахотных почвах (Мусаев, 1960; Мухамедиев, 1960), в почвах пустыни Кызылкум (Троицкая, 1961) соответственно. *Stichococcus*-подобные таксоны также встречались в почвах пахотных полей и садов (Мусаев, 1960), в почвах пустыни Кызылкум (Троицкая, 1961). Зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* была обнаружена во многих почвах (Бут, 1959; Мусаев, 1960; Троицкая, 1961; Умарова, 1964), представители *Chlorosarcinopsis*, например, *Chlorosarcinopsis angulosa* (как *Chlorosphaera angulosa*) встречались редко (Троицкая, 1961; Музафаров, 1965), как и *Bracteacoccus*, например, *B. anomalus* (как *Pleurochloris anomala*) – только в городских почвах (Mamasoliev, 2019). Упоминаний об обнаружении видов *Chromochloris* и *Pseudomuriella* в наземных и водных биотопах Узбекистана не найдено. Однако стоит отметить, что все перечисленные таксоны микроводорослей были определены на основе морфологии, что исключает точность и надежность такой идентификации.

Таким образом, впервые изучено культивируемое разнообразие микроводорослей эродированных почв северной части Ферганской долины (Узбекистан) на основе морфологического и молекулярно-генетического анализов. Было обнаружено 10 штаммов зеленых микроводорослей (Chlorophyta) и 1 – харофитовых (Charophyta). Только 7 штаммов микроводорослей было определено до вида: *Chlorella vulgaris*,

Chromochloris zofingiensis, *Deuterostichococcus epilithicus*, *Pseudomuriella schumacherensis* и *Pseudostichococcus monallantoides*. Еще 4 штамма идентифицированы только до рода и нуждаются в дальнейших исследованиях: *Bracteacoccus* sp., *Chlorosarcinopsis* sp., *Klebsormidium* sp. и *Tetratostichococcus* sp. Невысокое видовое разнообразие микроводорослей можно объяснить как эродированностью и малоплодородностью почв на склонах, так и особенностями культурального подхода, выявляющего только часть от реального разнообразия микроорганизмов. Колонизировать эродированные почвы в условиях засушливой предгорной зоны микроводоросли могут с помощью различных адаптаций: мелкие клеточные размеры, продукция внеклеточных экзополисахаридов, микоспорин-подобных аминокислот и вторичных каротиноидов. Проведенное исследование может стать основой для дальнейшей разработки высокофункциональных консорциумов на основе микроводорослей с целью улучшения и устойчивого развития низкопродуктивных, засушливых, деградированных наземных экосистем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1051).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность инженеру лекции АСССИ Р. Л. Бакулиной за помощь в культуральной работе.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука, 1998. 351 с.

- Бут И.П. Почвенные водоросли некоторые районов Сурхандарийской области // *Узбекский биологический журнал*. 1959. № 2. С. 26–38.
- Дубовик И.Е. Влияние овражной эрозии на развитие водорослей в лесостепных почвах Предуралья // *Почвоведение*. 2004. № 4. С. 474–479.
- Dubovik I.E. The effect of gully erosion on the diversity of algae in forest-steppe soils of the cis-Ural region // *Euras. Soil Sci.* 2004. V. 37. P. 409–414.
- Дубовик И.Е. Водоросли эродированных почв и альгологическая оценка почвозащитных мероприятий. Уфа: Изд-во Башкирского ун-та, 1995. 154 с.
- Киселев Е.И. Материалы к изучению микрофлоры рисовых полей окрестностей г. Самарканда // *Журнал Русского ботанического общества*. 1931. Т. 6. № 4. С. 20–22.
- Музафаров А.М. Флора водорослей водоемов Средней Азии. Ташкент: Изд-во “Наука” Узбекской ССР, 1965. 569 с.
- Мусаев К.Ю. Водоросли орошаемых земель и их значение для плодородия почв. Ташкент: Изд-во Академии Наук Узбекской ССР, 1960. 211 с.
- Мухамедиев А.М. Материалы к гидробиологии рисовых полей Ферганской долины // *Ученые записки Ферган. пед. института. Сер. Биол.* 1960. № 6. С. 3–75.
- Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). Кострома: Костромской печатный дом, 2014. 215 с.
- Троицкая Е.К. Водоросли основных почв юго-Западных Кызылкумов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ташкент, 1961. 19 с.
- Тухтабоева Ю.А., Редькина В.В., Темралеева А.Д. *Stichococcus*-подобные микроводоросли (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) в эродированных почвах Ферганской долины // *Узбекский биологический журнал*. 2023. № 4 (в печати).
- Умарова Ш.У. Водоросли хлопковых полей и влияние некоторых агротехнических факторов на развитие и распространение. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ташкент, 1964. 25 с.
- ФАО ООН. Европейская комиссия по сельскому хозяйству. 2015 // Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН. URL: <https://www.fao.org/3/mo297r/mo297r.pdf> (дата обращения: 24.11.2023).
- Büdel B., Darienko T., Deuschewitz K., Dojani S., Friedl T., Mohr K.I., Salisch M., Reisser W., Weber B. Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency // *Microb. Ecol.* 2009. V. 57. P. 229–247. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9449-9>
- Caisová L., Marin B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction // *Protist.* 2013. V. 164. P. 482–496. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.04.005>
- Cardon Z.G., Gray D.W., Lewis L.A. The green algal underground: evolutionary secrets of desert cells // *BioScience*. 2008. V. 58. P. 114–122. <https://doi.org/10.1641/B580206>
- Castillo-Monroy A., Maestre F., Delgado-Baquerizo M., Gallardo A. Biological soil crusts modulate nitrogen availability in semi-arid ecosystems: insights from a Mediterranean grassland // *Plant Soil*. 2010. V. 333. P. 21–34. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0276-7>
- Chekanov K. Diversity and distribution of carotenogenic algae in Europe: a review // *Mar. Drugs*. 2023. V. 21. Art. 108. <https://doi.org/10.3390/md21020108>
- Coleman A.W. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009. V. 50. P. 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.008>
- Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M., Kuramae E.E. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 1636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Ettl H., Gärtner G. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtentalgen*. Stuttgart: Gustav Fischer, 1995. 721 p.
- Evans R.D., Johansen J.R. Microbiotic crusts and ecosystem processes // *Crit. Rev. Plant Sci.* 1999. V. 18. P. 183–225. <https://doi.org/10.1080/07352689991309199>
- Fischer T., Subbotina M. Climatic and soil texture threshold values for cryptogamic cover development: a meta analysis // *Biologia (Bratisl.)*. 2014. V. 69. P. 1520–1530. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0464-7>
- Fučíková K., Lewis L.A. Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta) // *Fottea*. 2012. V. 12. P. 83–93. <https://doi.org/10.5507/fot.2012.007>
- Fučíková K., Rada J.C., Lewis L.A. The tangled taxonomic history of *Dictyococcus*, *Bracteacoccus* and *Pseudomuriella* Chlorophyceae, Chlorophyta) and their distinction based on a phylogenetic perspective // *Phycologia*. 2011. V. 50. № 4. P. 422–429. <https://doi.org/10.2216/10-69.1>
- Glaser K., Baumann K., Leinweber P., Mikhailyuk T. Karsten U. Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling // *Biogeosciences*. 2018. V. 15. P. 4181–4192. <https://doi.org/10.5194/bg-15-4181-2018>
- Guiry M.D., Guiry G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2023. <http://www.algaebase.org>
- Hartmann A., Glaser K., Holzinger A., Ganzera M., Karsten U. Klebsormidin A and B, two new UV-sunscreen compounds in green microalgal *Interfilum* and *Klebsormidium* species (Streptophyta) from terrestrial habitats // *Front. Microbiol.* 2020 V. 11. Art. 499. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00499>
- Holzinger A., Kaplan F., Blaas K., Zechmann B., Komšić-Buchmann K., Becker B. Transcriptomics

- of desiccation tolerance in the streptophyte green alga *Klebsormidium* reveal a land plant-like defense reaction // PLoS One. 2014. V. 9. Art. e110630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110630>
- Johnson J.L., Fawley M.W., Fawley K.P. The diversity of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* (Chlorophyceae) in Itasa State Park, Minnesota, USA // Phycologia. 2007. V. 46. P. 214–229. <https://doi.org/10.2216/05-69.1>
- Karsten U., Friedl T., Schumann R., Hoyer K., Lembcke S. Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxiophyceae (Chlorophyta) // J. Phycol. 2005. V. 41. P. 557–566. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00081.x>
- Karsten U., Herburger K., Holzinger A. Living in biological soil crust communities of African deserts – Physiological 20 traits of green algal *Klebsormidium* species (Streptophyta) to cope with desiccation, light and temperature gradients // J. Plant Physiol. 2016. V. 194. P. 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.002>
- Kitzing C., Pröschold T., Karsten U. UV-induced effects on growth, photosynthetic performance and sunscreen contents in different populations of the green alga *Klebsormidium fluitans* (Streptophyta) from alpine soil crusts // Microb. Ecol. 2014. V. 67. P. 327–340. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0317-x>
- Krivina E.S., Bobrovnikova L.A., Temraleeva A.D., Markelova A.G., Gabrielyan D.A., Sinetova M.A. Description of *Neochlorella semenenkoi* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), a novel Chlorella-like alga with high biotechnological potential // Diversity. 2023. V. 15. Art. 513. P. 1–22. <https://doi.org/10.3390/d15040513>
- Langhans T.M., Storm C., Schwabe A. Community assembly of biological soil crusts of different successional stages in a temperate sand ecosystem, as assessed by direct determination and enrichment techniques // Microb. Ecol. 2009. V. 58. P. 394–407. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9532-x>
- Lu Q., Xiao Y., Lu Y. Employment of algae-based biological soil crust to control desertification for the sustainable development: a mini-review // Algal Res. 2022. V. 65. Art. 102747. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102747>
- Lukešová A. Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in Central Europe (Czech Republic and Germany) // Restor. Ecol. 2001. V. 9. P. 341–350. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100X.2001.94002.x>
- Mamasoliev S.T. Soil algae of urban ecosystems (on the example of Andijan). Avtoreferat dis. Namangan, 2019. 25 p.
- McManus H.A., Lewis L.A. Molecular phylogenetic relationships in the freshwater family Hydrodictyaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae), with an emphasis on *Pediastrum duplex* // J. Phycol. 2011. V. 47. P. 152–163. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00940.x>
- Metting B. The systematics and ecology of soil algae // Bot. Rev. 1981. V. 47. P. 195–312. <https://doi.org/10.1007/BF02868854>
- Mikhailyuk T., Glaser K., Holzinger A., Karsten U., Gabrielson P. Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy) // J. Phycol. 2015. V. 51. P. 750–767. <https://doi.org/10.1111/jpy.12316>
- Mikhailyuk T., Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E., Karsten U. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria // Eur. J. Phycol. 2019. V. 54. P. 263–290. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1557257>
- Moewus L. Systematische Bestimmung einzelliger grüner Algen auf Grund von Kulturversuchen (*Sphaerosorus composita*, *Oocystis marina* und *Pseudostichococcus monallantoides*) // Botaniska Notiser. 1951. P. 287–318.
- Neustupa J., Eliás M., Sejnohová L. A taxonomic study of two *Stichococcus* species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with a starch-enveloped pyrenoid // Nova Hedwigia. 2007. V. 84. P. 51–63. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2007/0084-005>
- Perera I., Subashchandrabose S.R., Venkateswarlu K., Naidu R., Megharaj M. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria in desert soils: an underexplored microbiota // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 7351–7363. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9192-1>
- Pluis J.L.A. Algal crust formation in the inland dune area, Laarder Wasmeer, the Netherlands // Vegetatio. 1994. V. 113. P. 41–51. <https://doi.org/10.1007/BF00045462>
- Pröschold T., Darienko T. The green puzzle *Stichococcus* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): New generic and species concept among this widely distributed genus // Phytotaxa. 2020. V. 441. P. 113–142. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.441.2.2>
- Rabiei A., Zomorodian S.M.A., O’Kelly B.C. Reducing the erodibility of sandy soils engineered by cyanobacteria inoculation: a laboratory investigation // Sustainability. 2023. V. 15. Art. 3811. <https://doi.org/10.3390/su15043811>
- Rindi F., Mikhailyuk T.I., Sluiman H.J., Friedl T., López-Bautista J.M. Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) // Mol. Phylogenet. Evol. 2011. V. 58. P. 218–231. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.030>
- Rippin M., Borchhardt N., Williams L., Colesie C., Jung P., Büdel B., Karsten U., Becker B. Genus richness of microalgae and Cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches // Polar Biol. 2018. V. 41. P. 909–923. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2252-2>

- Rybalka N., Blanke M., Tzvetkova A., Noll A., Roos C., Boy J., Boy D., Nimptsch D., Godoy R., Friedl T. Unrecognized diversity and distribution of soil algae from Maritime Antarctica (Fildes Peninsula, King George Island) // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Art. 118747.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1118747>
- Samolov E., Mikhailyuk Y., Lukešová A., Glaser K. Büdel B., Karsten U. Usual alga from unusual habitats: biodiversity of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated from biological soil crusts // *Mol. Phyl. Evol.* 2019. V. 133. P. 236–255.
<https://doi.org/10.1016/j.ympcv.2018.12.018>
- Seitz S., Nebel M., Goebes P., Käppeler K., Schmidt K., Shi X., Song Z., Webber C.L., Weber B., Scholten T. Bryophyte-dominated biological soil crusts mitigate soil erosion in an early successional Chinese subtropical forest // *Biogeosci.* 2017. V. 14. P. 5775–5788.
<https://doi.org/10.5194/bg-14-5775-2017>
- Sommer V., Karsten U., Glaser K. Halophilic algal communities in biological soil crusts isolated from potash tailings pile areas // *Front. Ecol. Evol.* 2020. V. 8. Art. 46.
<https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00046>
- Van A. T., Glaser K. *Pseudostichococcus* stands out from its siblings due to high salinity and desiccation tolerance // *Phycology.* 2022. V. 2. P. 108–119.
<https://doi.org/10.3390/phycolgy2010007>
- Xiao R., Zheng Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications // *Biotechnol. Adv.* 2016. V. 34. P. 1225–1244.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Microalgae from Eroded Soils in the Northern Fergana Valley, Uzbekistan

Yu. A. Tukhtaboeva¹, E. S. Krivina², V. V. Red'kina², and A. D. Temraleeva^{2,*}

¹Namangan State University, Namangan, 160119 Uzbekistan

²All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: temraleeva.anna@gmail.com

Received December 1, 2023; revised January 26, 2024; accepted February 8, 2024

Abstract. For the first time, the cultivated diversity of microalgae in eroded soils in the northern part of the Fergana Valley in Uzbekistan has been studied based on both morphological and molecular genetic analysis. Ten strains of green microalgae (*Chlorophyta*) and one *Charophyta* strain were revealed. Only seven strains could be identified at the species level: *Chlorella vulgaris*, *Chromochloris zofingiensis*, *Deuterostichococcus epilithicus*, *Pseudomuriella schumacherensis*, and *Pseudostichococcus monallantoides*. Another four strains were identified only at the genus level and require further study: *Bracteacoccus* sp., *Chlorosarcinopsis* sp., *Klebsormidium* sp., and *Tetratostichococcus* sp. The low species diversity in the microalgae is likely due to both the low fertility of the eroded soils on the slopes, and the limitations of the culture-based approach that only reveals a fraction of the overall microbial diversity. Microalgal colonization of eroded soils in the arid foothill zone can be facilitated by various adaptations, such as small cell size and the production of extracellular polysaccharides, mycosporine-like aminoacids, and secondary carotenoids. The present work may contribute to the further development of highly functional microalgae-based consortia, which can lead to improvements and sustainable development of low-productivity, arid, and degraded terrestrial ecosystems.

Keywords: microalgae, diversity, morphology, *rbcL*, ITS2, soils, erosion

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МИКРОВОДОРОСЛИ ЭРОДИРОВАННЫХ ПОЧВ
СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ ФЕРГАНСКОЙ ДОЛИНЫ, УЗБЕКИСТАН

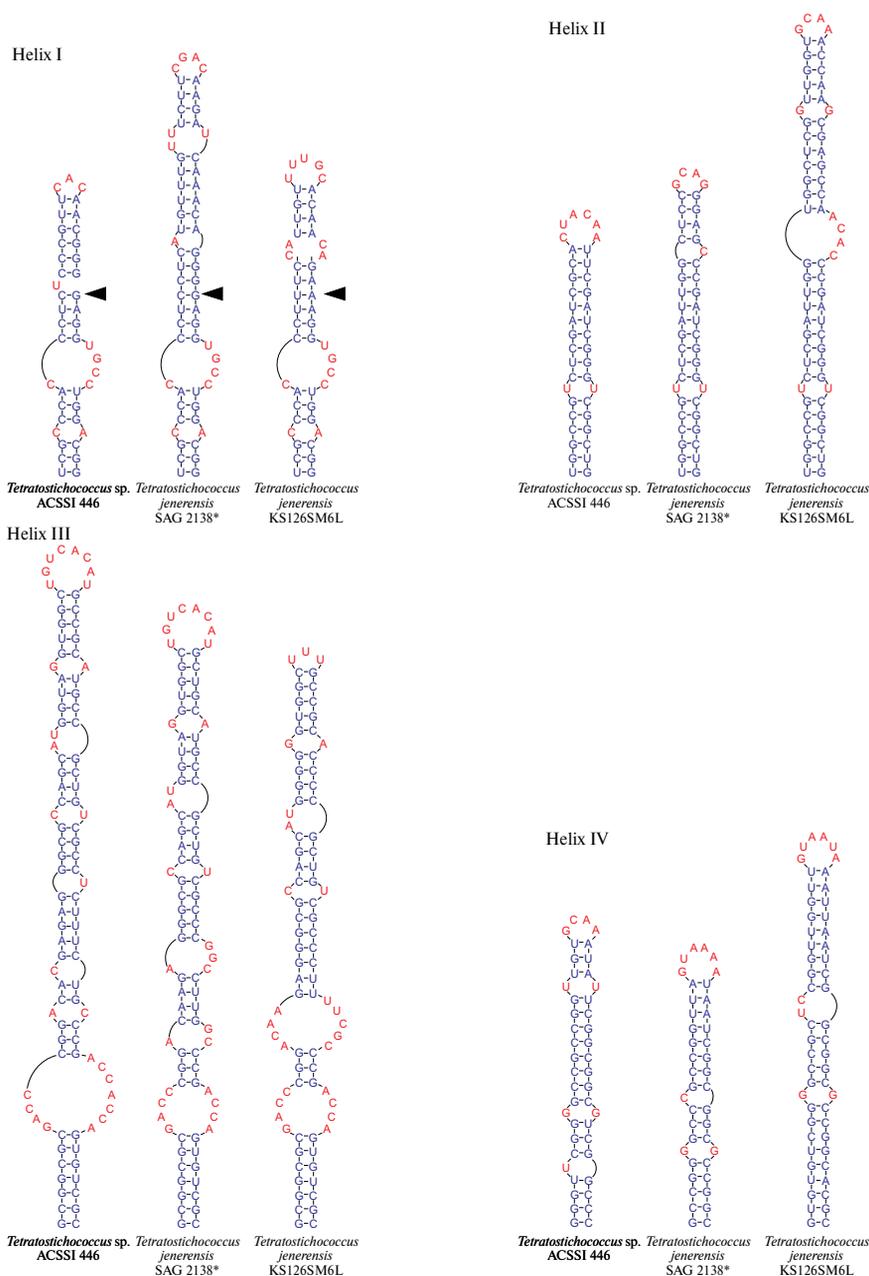
© 2024 г. Ю. А. Тухтабоева^a, Е. С. Кривина^b, В. В. Редькина^b, А. Д. Темралева^b, *

^aНаманганский государственный университет, Наманган, 160119, Узбекистан

^bВсероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ),

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, 142290, Россия

*e-mail: temraleeva.anna@gmail.com



УДК 579.252.5

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМИДЫ БИОСИНТЕЗА СИДЕРОФОРОВ pSID БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5AP

© 2024 г. М. И. Мандрик^{а, *}, А. А. Высоцкая^а, Ю. В. Егорова^а,
Д. В. Суржик^а, А. Ю. Ларченко^а, С. Л. Василенко^а

^аБелорусский государственный университет, Минск, 220030, Беларусь

*e-mail: charynmi@bsu.by

Поступила в редакцию 06.12.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к публикации 31.12.2023 г.

В клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в результате секвенирования полной последовательности генома выявлена плазмида pSID (CP063453.1) размером 250428 п.н. За репликацию данной плазмиды, по всей вероятности, отвечает ген *dnaB*. Гены, которые могут быть вовлечены в репликацию (*dnaB*, *ssb*) и разделение плазмид после репликации (*parA*), проявляют наибольшую степень сходства с детерминантами, расположенными на крупных (224–343 т.п.н.) плаزمидях родококков: unnamed1 *R. pyridinivorans* YF3, unnamed1 *R. rhodochrous* LH-B3, pRJH1 *R. pyridinivorans* YC-JH2, pRDE01 *Rhodococcus* sp. RDE2 и pRho-VOC14-C342 *R. opacus* VOC-14. На плазмиде pSID выявлено два локуса, ответственных за синтез вторичных метаболитов, один из которых определяет синтез поликетидного соединения (сходные последовательности выявлены на плазмидях родококков), а второй – предположительно, синтез сидерофора: гены биосинтеза (*sid1–5*) данного соединения проявляют наибольшую степень сходства (не более 75%) с последовательностями бактерий *Streptomyces vilmorinianum* YP1 (CP040244.1), *S. ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1), *Streptomyces* sp. NBC00162 (CP102509.1) и некоторых других стрептомицетов, но не обладают сходством с какими-либо известными генами биосинтеза сидерофоров у родококков. Локус плазмиды pSID, отвечающий за синтез сидерофора, имеет уникальную организацию, т.к. ген *sid5* (*iucC*) транскрибируется во встречном направлении, тогда как у других бактерий он входит в состав оперона и располагается в начале или в конце. Установлено, что при инактивации гена *sid1* снижается антагонистическая активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap против фитопатогенных бактерий *P. carotovorum* 2.18, снижается устойчивость к ионам железа, кадмия и арсенатам, а также появляются фитотоксические свойства в отношении редиса красного, тогда как бактерии дикого типа обладают стимулирующей рост растений активностью.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, плазмиды, сидерофоры, стимулирующая рост растений активность, антагонистическая активность, устойчивость к тяжелым металлам

DOI: 10.31857/S0026365624040034

Бактерии рода *Rhodococcus* широко известны как деструкторы органических соединений различной природы и в основном применяются в составе биопрепаратов для биоремедиации сред, загрязненных углеводородами. Такие среды характеризуются изменением физико-химических свойств почвы, нарушением состава микробиоценоза, а также растительного покрова. Результатом же биоремедиации должно стать не только разложение загрязнителя, но и восстановление всех характеристик почвы. Соответственно, наиболее перспективными будут те бактерии-деструкторы, которые не только разрушают загрязнители, но и способствуют росту растений, т.е.

обладающие рост-стимулирующими и защитными свойствами. В этом плане родококки являются привлекательными объектами природоохранной биотехнологий, т.к. помимо углеводородов, способны разлагать токсины, в том числе микотоксины, продуцируемые фитопатогенными грибами (Kriszt et al. 2012; Cserháti et al., 2013; Ji et al., 2016), а также продуцируют ряд соединений с рост-стимулирующей активностью по отношению к растениям и антагонистической активностью по отношению к разным группам микроорганизмов, в том числе фитопатогенным (Kundu et al., 2016; Stevens et al., 2017; Kuhl et al., 2019; Iminova et al., 2022).

Одной из важных групп соединений с антагонистической и стимулирующей рост растений активностью являются сидерофоры (Глик, Пастернак, 2002). Родококки, как и другие бактерии, продуцируют в среду различные виды сидерофоров для эффективной добычи ионов железа, входящих в состав активных центров многочисленных оксигеназ — ферментов, обеспечивающих окисление широкого спектра углеводов. На этом участие сидерофоров в биодegradативной активности не заканчивается. Показано, что они способны индуцировать возникновение в средах активных форм кислорода, которые, в свою очередь, обеспечивают окисление органических загрязнителей (Roskova et al., 2022). Сидерофоры, наряду с биосурфактантами, обеспечивают бактериям устойчивость к тяжелым металлам и металлоидам за счет неспецифического связывания с некоторыми из них (Presentato et al., 2020). Такое неспецифическое связывание играет важную роль при фитобиоремедиации загрязненных тяжелыми металлами сред, поскольку делает ионы тяжелых металлов более доступными для поглощения растениями (Saha et al., 2013). Кроме того, сидерофоры являются факторами антагонизма, обеспечивая своим продуцентам селективное преимущество в средах с дефицитом железа (Глик, Пастернак, 2002; Saha et al., 2013).

Положительное действие бактерий — продуцентов сидерофоров на растения обеспечивается за счет нескольких механизмов. Во-первых, бактериальные сидерофоры более активны по сравнению с грибными, поэтому бактерии выигрывают в конкурентной борьбе с фитопатогенными грибами в ризосфере растения (Глик, Пастернак, 2002). Во-вторых, показано, что сидерофоры способствуют выработке бактериальных ауксинов в ризосфере растения в условиях загрязнения тяжелыми металлами (Dimkra et al., 2008). В-третьих, установлено, что сидерофоры обладают элиситорным воздействием и стимулируют иммунный ответ растения (Aznar et al., 2014).

Таким образом, бактерии рода *Rhodococcus* можно рассматривать не только как деструкторов опасных поллютантов, перспективных для использования при биоремедиации и фитобиоремедиации загрязненных сред, но и как перспективных агентов для защиты растений и продуцентов ценных биологически активных метаболитов.

Способность продуцировать биологически активные соединения, так же как и способность утилизировать различные трудно разлагаемые соединения, часто определяется мобильными генетическими элементами, в частности, плазмидами.

Целью данного исследования был анализ вклада плазмиды pSID в устойчивость, антагонистическую и стимулирующую рост растений активность бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap — деструкторов углеводов нефти.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовались бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap (депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номером БИМ В-939 Г). Для клонирования фрагмента гена биосинтеза сидерофоров использовали суицидальный вектор pK18mob (Km^r, LacZ') (Schäfer et al., 1994). Для отбора рекомбинантных молекул ДНК и последующего их введения в клетки родококков использовали штаммы *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., 1987) и BW19851 (Metcaff et al., 1994). В качестве тест-культуры для проверки антагонистической активности использовали бактерии *Pectobacterium carotovorum* 2.18 (депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номером БИМ В-1640). Для определения стимулирующих рост растений свойств использовали семена редиса красного *Raphanus sativus* L. var. *sativus* сорта Гранат. Анализируемая нуклеотидная последовательность плазмиды pSID бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap депонирована в GenBank NCBI под номером CP063453.1.

Среды и растворы. Для культивирования бактерий использовали пептонно-дрожжевую среду (жидкую — ПДБ: пептон — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, NaCl — 8 г/л, pH 7.0–7.2; плотную — ПДА — добавляли агар бактериологический — 7 или 15 г/л); среду Мейнелла с 2% мелассой (Мейнелл, Мейнелл, 1967), плотную минеральную среду М9 (Миллер, 1976) с добавлением глюкозы (0.2%), сульфидната (0.2%) или нафталина (пары) в качестве единственного источника углерода. Для проращивания семян растений использовали 1% водный агар (агар бактериологический — 10 г/л).

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) тяжелых металлов и металлоидов. Исследуемые бактерии культивировали в среде ПДБ с аэрацией (140 об./мин) в течение 24 ч при 28°C. Полученной культурой (20 мкл) инокулировали среду ПДБ (3 мл) с различными концентрациями тяжелых металлов и металлоидов, вносимых в виде солей: NiCl₂ (0.1; 0.2; 0.5; 1; 1.5; 2; 3; 4; 5 ммоль/л), ZnSO₄ (0.5; 0.6; 0.75; 0.9; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 ммоль/л), CoCl₂ (0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5 ммоль/л), CuCl₂ (0.1; 0.2; 0.5; 1; 1.5; 1.6; 1.7; 1.8; 1.9; 2; 4; 6; 8; 10 ммоль/л), CdCl₂ (0.1; 0.2; 0.5; 0.75; 1; 1.5 ммоль/л), Hg(NO₃)₂ (0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.5; 1 ммоль/л), Pb(NO₃)₂ (0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 ммоль/л), FeCl₃ (0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 4; 5 ммоль/л), Na₃AsO₃ (0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 ммоль/л). Инкубировали с аэрацией (140 об./мин) в течение 48 ч при 28°C. Визуально оценивали рост культур и производили измерение ОП₆₀₀ (положительный результат регистрировали при достижении значения ОП₆₀₀ 0.2). За МИК

принимали концентрацию, следующую за той, при которой наблюдался рост.

Антагонистическую активность оценивали с помощью метода отсроченного антагонизма. На поверхность агаризованной среды (ПДА, М9 с глюкозой (0.2%), М9 с сукцинатом (0.2%) или М9 с нафталином (пары)) в чашке Петри медальонами засеивали штаммы исследуемых бактерий, культивировали при температуре 28°C в течение 48 ч. Ночную культуру фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum* 2.18 выращивали с аэрацией при 28°C. В 5 мл 0.7% ПДА добавляли 100 мкл культуры фитопатогенных бактерий. Далее наслаивали 0.7% ПДА на чашку Петри с медальонами и инкубировали при температуре 28°C. Размер зоны задержки роста тест-штамма вокруг медальонов измеряли через 24 ч культивирования от края медальона до начала роста тест-культуры.

Стимулирующую рост растений активность оценивали на растениях редиса красного сорта Гранат. Ночную культуру исследуемых штаммов выращивали в среде Мейнелла при температуре 28°C в течение 24 или 48 ч. Семена редиса предварительно замачивали в течение 30 мин в культуральной жидкости каждого штамма, среде Мейнелла и воде (контроли). Помещали семена на поверхность 1% водного агара, инкубировали при комнатной температуре. Через 7 сут определяли морфометрические показатели (длина гипокотыля, длина корня).

Трансформацию *E. coli* осуществляли по методике, описанной в руководстве (Маниатис и соавт., 1984).

Тотальную ДНК бактерий выделяли саркозидоловым методом (te Riele et al., 1986).

Выделение плазмидной ДНК. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit ("Jena Bioscience", Германия).

ПЦР проводили с использованием набора реактивов производства ThermoFisher Scientific (ЕС), ОДО "Праймтех" (РБ) и праймеров производства ОДО "Праймтех" (РБ). Реакцию проводили в объеме 25–50 мкл. Реакционная смесь содержала 1× буфер с ионами Mg²⁺ для соответствующей ДНК-полимеразы, смесь дНТФ (0.2 ммоль/л каждого нуклеотида), 0.5 мкмоль/л каждого праймера, 1.25–2.5 ед. ДНК-полимеразы (Taq или Pfu).

Амплификацию фрагмента плазмидного гена *sid* проводили при режимах: 95°C – 3 мин (1 цикл); 95°C – 1 мин, 57°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (30 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл). Использовали праймеры Sid-fw (AGGAGCAGGCCACCACTTAC) и Sid-rev (AGGAGGTTAGAGAGCGATCC), размер получаемого фрагмента составил 562 п.н.

ПЦР-анализ результатов инсерционного мутагенеза осуществляли с использованием пары праймеров M13 Forward (CACGACGTTGTAAAACGAC) или M13 Reverse (GGATAACAATTTTCACACAGG)

и Sid-fw и режимов: 94°C – 5 мин; 94°C – 30 с, 48°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (5 циклов); 94°C – 30 с, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (25 циклов); 72°C – 10 мин.

Инактивация гена *sid1* в опероне биосинтеза сидерофоров была осуществлена с помощью направленного инсерционного мутагенеза (Чернявская, 2016). Полученные на среде ПДА с рифампицином (100 мкг/мл) и канамицином (25 мкг/мкл) клоны рассеивали на среде М9 с канамицином (25 мкг/мкл) и нафталином (пары) в качестве единственного источника углерода.

Инструменты биоинформационного анализа. Для анализа нуклеотидных последовательностей и построения генетической карты использовали программу SnapGene Viewer 5.0.8 и онлайн ресурс <https://proksee.ca/> (Grant et al., 2023). Поиск фрагментов, которые были приобретены в результате горизонтального переноса, производили с помощью инструмента Alien Hunter (Vernikos, Parkhill, 2006). Для идентификации кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов использовали онлайн ресурс antiSMASH, версии 7.0.1 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) (Blin et al., 2023). Уровень синтении генов биосинтеза сидерофора оценивали с помощью ресурса SyntTax (<https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/synttax/>) (Oberto, 2013).

Статистический анализ проводили с использованием пакета статистики MS Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Плазмида pSID размером 250428 п.н. (рис. 1) была выявлена в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar в результате секвенирования полной последовательности генома (Мандрик и соавт., 2024).

При аннотации плазмиды pSID не было выявлено генов *rep*, кодирующих специфические белки инициации репликации. В целом, далеко не все плазмиды обладают данными генами (в частности, плазмиды тета-типа репликации групп В и Е грамотрицательных и грамположительных бактерий) (Титок, 2004). В составе репликона выявлены гены *dnaB* (INP59_27530) и *ssb* (INP59_27510), располагающиеся в пределах области размером 5265 п.н. и разделенные 3 генами, кодирующими неизвестные белки; а также единственный ген *parA* (INP59_26825), локализованный на большем расстоянии от вышеупомянутых генов.

DnaB – это хеликаза, обеспечивающая расплетение ДНК в точке начала репликации. Как правило, при репликации плазмид используется хозяйский белок DnaB, кодируемый хромосомными генами. Однако есть отдельные группы плазмид (Turner et al., 2002), несущие эти гены в своем составе. В частности, на плазмиде pQBR55 (NZ_LN713927.1) вблизи точки начала репликации локализованы два

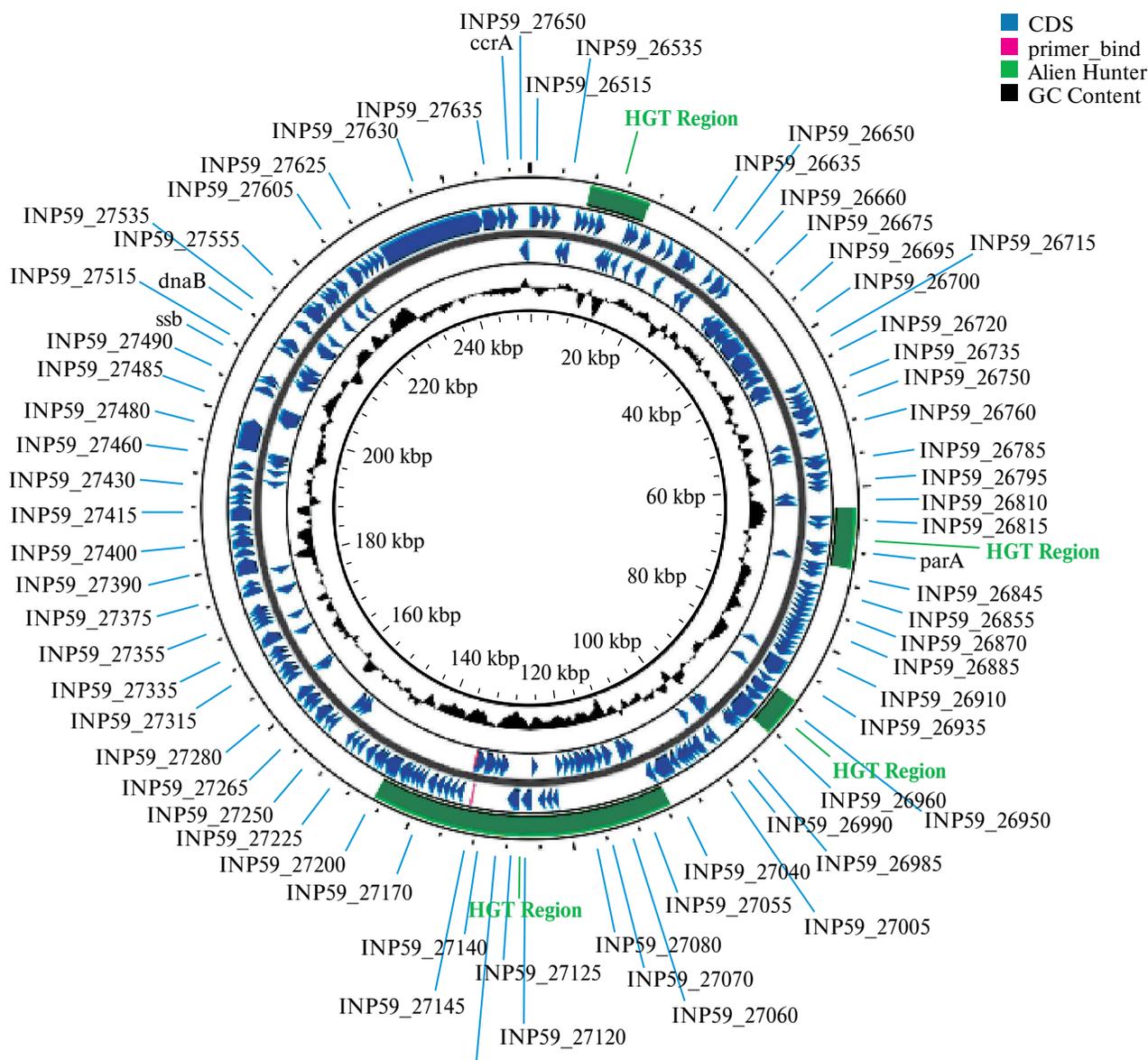


Рис. 1. Генетическая карта плазмиды pSid. INP – обозначение белок-кодирующих последовательностей, HGT Region – участок, который, предположительно, был привнесен в результате горизонтального переноса.

гена *dnaB* (PQBR55_RS00220 и PQBR55_RS00225). S.L. Turner et al. (2002) показали, что, по крайней мере, второй из них необходим для репликации. Белковые продукты этих генов сходны между собой на 64% (на 79% с учетом синонимичных замен). Сравнение белков DnaB, кодируемых плазмидами pSID (QOW01910.1, 441 а.к.о.) и pQBR55 (для сравнения использовали последовательность белка, участие которого в репликации было установлено экспериментально, WP_011031943.1, 464 а.к.о.), выявило сходство по аминокислотному составу 31% (46% с учетом синонимичных замен).

Известно также, что плазмидный ген *dnaB* входит в состав мини-репликона линейной плазмиды

SLP2 бактерий *Streptomyces lividans* 1326 (Ahsan, Kabir, 2013). Кодированный плазмидным геном белок DnaB (AAO61160.1, 451 а.к.о.) проявляет сходство 26% (44% с учетом синонимичных замен) с белком исследуемых бактерий, в то время как гены не обнаруживают значимого сходства.

Все вышеперечисленное дает основания предполагать, что в репликации плазмиды pSID участвует белок DnaB, а вблизи его гена можно ожидать наличие сайта начала репликации *oriV*. Поиск повторов, потенциально составляющих DnaA-боксы, вблизи гена *dnaB* не дал результатов. Однако известно, что не всем плазмидам они свойственны. В частности, у плазмид групп В и С

они отсутствуют, как и АТ-богатые области (Титок, 2002).

Выше гена *dnaB* на плазмиде pSID расположена ОРС (INP59_27525), 3'-конец которой перекрывается с 5'-концом гена *dnaB*. Сравнение их нуклеотидных последовательностей выявило сходство 90.48%, однако белковые продукты сходства не проявляют. Очевидно, в первом гене могли произойти мутации, в результате которых он утратил свою функциональность.

SSB-белки выполняют при репликации функцию стабилизации одноцепочечных участков ДНК. Обычно они кодируются хромосомными генами: сходство с хромосомным геном (INP59_23825, 519 п.н.) составляет 85.29%. В то же время на некоторых плаزمиде гены *ssb* обнаруживаются рядом с точкой начала конъюгационного переноса *oriT* (а с противоположной стороны локализованы гены *tra*), хотя их значимое участие в конъюгации не показано (Howland et al., 1989). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов *ssb* плазмид pSID и ColIb-P9 (M25505.1, 528 п.н.) не выявило значимого сходства, тогда как аминокислотные последовательности белков сходны на 29.55% (47% с учетом синонимичных замен). Генов, непосредственно связанных с конъюгационным переносом плазмиды pSID, вблизи гена *ssb* не выявлено. Близкое расположение гена *ssb* к гену *dnaB* позволяет предполагать его участие в процессе репликации плазмиды pSID.

Продукт гена *parA* в клетках бактерий отвечает за разделение плазмид после репликации. Как правило, он работает в паре с белком ParB, являющимся продуктом гена, входящего в состав одного оперона с *parA*. Однако известна плаزمиды pSK1 бактерий *Staphylococcus aureus*, за распределение которой отвечает лишь один белок Par (AAF63251.1, 245 а.к.о.), ген которого расположен рядом с *rep*-геном и транскрибируется в противоположном направлении (Chan et al., 2022). Сравнение белка ParA (QOW01990.1, 384 а.к.о.) исследуемых бактерий с белком Par *S. aureus* pSK1 не выявило гомологии. Вблизи гена *parA* не выявлено ОРС, обладающих сходством с известными *rep*-генами. Сравнение последовательностей плазмидного и хромосомного (QOV96885.1, 327 а.к.о.) белков ParA выявило сходство 25% (42% с учетом синонимичных замен).

Сходные нуклеотидные последовательности генов *dnaB*, *ssb* и *parA* были выявлены только в составе плазмид бактерий рода *Rhodococcus* (табл. 1).

Причем все три гена (*dnaB*, *ssb* и *parA*) обнаруживались в составе более крупных плазмид (224–343 т.п.н.), тогда как на плазмиде меньшего размера (117–167 т.п.н.) обнаруживался только гомологичный ген *parA*. В то же время на плазмиде меньшего размера выявлены гены *parB*.

На плазмиде pRJH1, pRDE01, pRho-VOC14-C342 перед геном *dnaB*, так же как на плазмиде pSID,

Таблица 1. Сравнительный анализ систем репликации плазмиды pSID с известными

Штамм	Источник	Плаزمида	Размер (п.н.)	Номер в базе данных GeneBank NCBI	Степень сходства, %			Наличие других детерминант с репликацией и сегрегацией
					гена <i>dnaB</i>	гена <i>ssb</i>	гена <i>parA</i>	
<i>R. ruydii</i> YF3	Денитрифицирующий биореактор, разлагающий хинолин, Китай	Unnamed1	337 275	CP040720.1	99.92	100.00	99.74	Не аннотирована
<i>R. rhodochrous</i> LH-B3	Загрязненная нефтепродуктами почва, Китай	Unnamed1	300 219	CP120357.1	98.57	99.80	99.74	Не аннотирована
<i>R. ruydii</i> YC-JH2	Почва, Шеньян, Китай	pRJH1	327 914	CP050179.1	98.57	99.80	99.74	—
<i>Rhodococcus</i> sp. RDE2	Япония	pRDE01	224 658	AP025187.1	86.74	99.22	99.65	—
<i>R. oracus</i> VOC-14	Дерново-подзолистая почва, загрязненная сольвентом, Минск, Беларусь	pRho-VOC14-C342	342 121	CP130954.1	84.33	86.32	73.18	—
<i>R. oracus</i> 9	Грунтовые воды, загрязненные нитрофенолом и трихлорэтиленом, Австралия	Unnamed1	139 990	CP095405.1	—	—	73.57	<i>parB</i> (локализован далеко от <i>parA</i>)
<i>R. oracus</i> PD630	Завод в 10 км от Геттингена, Германия	pRoPD630_2	167 985	CP080956.1	—	—	73.11	<i>parB</i> (локализован далеко от <i>parA</i>)
<i>Rhodococcus</i> sp. USK10	Аллювиальные осадки, Китай	Unnamed1	117 483	CP076046.1	—	—	73.84	<i>parAB</i> (локализован рядом с отдельно стоящим <i>parA</i>)

Примечание. “—” — детерминанты не выявлено.

Таблица 2. Гены биосинтеза вторичных метаболитов

№ ОРС	Название продукта	Размер гена, п.н.	Размер белка, а.к.о.	Сходство нуклеотидной последовательности гена с известными: штамм, № в GenBank NCBI, %
Локус 1 – Биосинтез сидерофора				
INP59_27105	Аминотрансфераза IV класса	921	306	–
INP59_27110	Фосфотрансфераза	939	312	<i>Rhodococcus</i> sp. 2G plasmid p1 (CP018064.1, 74.51%)
INP59_27115	SAM-зависимая метилтрансфераза I класса	747	248	–
INP59_27120	MFS-транспортер	1347	448	<i>Nocardioides</i> sp. TF02-7 (CP092535.1, 71.28%)
INP59_27125 (sid5)	Белок биосинтеза сидерофора семейства IucA/IucC*	1692	563	<i>Streptomyces</i> sp. NBC00162 (CP102509.1, 68.86%)
INP59_27130 (sid4)	Моноксигеназа семейства SidA/IucD/PvdA**	1311	436	<i>S. ficellus</i> NRRL 8067 (CP034279.1, 75.25%)
INP59_27135 (sid3)	Ацетилтрансфераза**	555	184	<i>Streptomyces</i> sp. NBC00162 (CP102509.1, 69.89%)
INP59_27140 (sid2)	Сидерофорсинтаза*	1800	599	<i>S. vilmorinianum</i> YP1 (CP040244.1, 73.69%)
INP59_27145 (sid1)	Аминотрансфераза**	1512	503	<i>S. vilmorinianum</i> YP1 (CP040244.1, 72.95%)
INP59_27150	Альфа/бета-гидролаза**	978	325	–
INP59_27155	Гидролаза семейства HAD	687	228	–
Локус 2 – Биосинтез поликетидного соединения				
INP59_27520	Белок, содержащий SH3-домен	333	110	<i>R. pyridinivorans</i> YF3, плаزمида unnamed1 (CP040720.1, 99.10%), <i>R. rhodochrous</i> LH-B3, плазмида unnamed1 (CP120357.1, 99.10%), <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2, плазмида pRJH1 (CP050179.1, 99.10%)
INP59_27530	АТФаза семейства AAA	1326	441	<i>R. pyridinivorans</i> YF3, плазмида unnamed1 (CP040720.1, 99.92%)
INP59_27585	Транскрипционный регулятор, содержащий домен wHTH	312	103	<i>R. pyridinivorans</i> YF3, плазмида unnamed1 (CP040720.1, 98.72%)
INP59_27605	Субстрат-связывающий белок ABC-транспортера	1584	527	<i>R. rhodochrous</i> LH-B3, плазмида unnamed1 (CP120357.1, 97.92%), <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2, плазмида pRJH1 (CP050179.1, 97.92%)
INP59_27610	Пермеаза ABC-транспортера	954	317	<i>R. rhodochrous</i> LH-B3, плазмида unnamed1 (CP120357.1, 97.17%), <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2, плазмида pRJH1 (CP050179.1, 97.17%)
INP59_27615	Пермеаза ABC-транспортера	837	278	<i>Rhodococcus</i> sp. GA1 (CP097186.1, 96.65%)
INP59_27620	АТФ-связывающий белок ABC-транспортера	933	310	<i>R. rhodochrous</i> LH-B3, плазмида unnamed1 (CP120357.1, 96.46%), <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2, плазмида pRJH1 (CP050179.1, 96.46%)
INP59_27625	Белок, содержащий АТФ-связывающую кассету	783	260	–
INP59_27630	НАД(Ф)-зависимая оксидоредуктаза семейства SDR*	14484	4827	<i>R. pyridinivorans</i> P23 плазмида pB (CP113800.1, 96.25%)
INP59_27635	Белок, содержащий тиоэфирредуктазный домен**	2292	763	<i>R. pyridinivorans</i> Y6 плазмида unnamed4 (CP096039.1, 96.29%)
INP59_27640	Альфа/бета-гидролаза**	1074	357	<i>R. pyridinivorans</i> Y6 плазмида unnamed4 (CP096039.1, 96.28%)
INP59_27645	Кротонил-КоА-карбоксилаза/редуктаза**	1353	450	<i>R. pyridinivorans</i> Y6 плазмида unnamed4 (CP096039.1, 96.30%)

*Основные гены биосинтеза. **Вспомогательные гены биосинтеза.

расположена перекрывающаяся с ним рамка считывания, но не проявляющая с ним какого-либо сходства. Для плазмид бактерий *R. pyridinivorans* YF3 и *R. rhodochrous* LH-B3 такой анализ не проведен, т.к. они не аннотированы. Гены *ssb* располагаются вблизи генов *dnaB*, тогда как гены *parA* обнаруживаются в ином локусе плазмид.

Анализ генома плазмиды на наличие генов, отвечающих за синтез вторичных метаболитов, позволил выявить два локуса (табл. 2), один из которых определяет биосинтез сидерофора (121628–137136 п.н.), а второй – поликетидного соединения (209405–250428 п.н.).

Многие детерминанты локуса 2 (INP59_27520–INP59_27620), определяющие синтез поликетидного соединения, проявляют высокую степень сходства с гомологичными генами, локализованными на плаزمиде *unnamed1 R. pyridinivorans* YF3, *unnamed1 R. rhodochrous* LH-B3, *pRJH1*, *pRDE01* и немного меньшую с плазмидными генами *pRHOVOC14-C342*, для которых было установлено сходство детерминант, определяющих репликацию, конъюгацию и распределение по дочерним клеткам. Это может говорить об общем происхождении данных плазмид. В то же время основные биосинтетические детерминанты (INP59_27630–INP59_27645) проявляют наибольшую степень подобия с гомологичными генами, расположенными на других плазмиде: *pB R. pyridinivorans* P23 (CP113800.1), *unnamed4 R. pyridinivorans* Y6 (CP096039.1), *unnamed2 R. pyridinivorans* YF3 (CP040721.1).

Большой интерес представляет локус 1 (табл. 2), т.к. гены биосинтеза сидерофора проявляют наибольшую степень сходства (хотя она и не превышает 75%) с последовательностями бактерий *S. vilmorinianum* YP1 (CP040244.1), *S. ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1), *Streptomyces* sp. NBC00162 (CP102509.1) и некоторых других стрептомицетов, но не обладают сходством с какими-либо известными генами биосинтеза сидерофоров у родококков. Данный локус расположен на фрагменте плазмиды, который, предположительно, приобретен в результате горизонтального переноса (рис. 1).

В локусе 1 гены *sid1–4*, по всей видимости, образуют оперон, а ген *sid5* транскрибируется во встречном направлении. Такая организация является уникальной для плазмиды pSID, т.к. у известных бактерий ген *sid5* (*iucC*) транскрибируется в том же направлении и находится либо в начале, либо в конце оперона (рис. 2).

Для оценки вклада сидерофора, за синтез которого отвечает локус 1, в биологическую активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap был проведен инсерционный мутагенез первого гена в опероне – *sid1*. Полученный мутантный вариант бактерий обозначили *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid::pK18mob*.

При инактивации гена *sid1* у исследуемых бактерий снижается устойчивость к железу, кадмию и арсенатам (табл. 3). Это согласуется с данными об участии сидерофоров во внеклеточной биосорбции мышьяка, железа, свинца, цинка, кадмия и др. (Presentato, 2020).

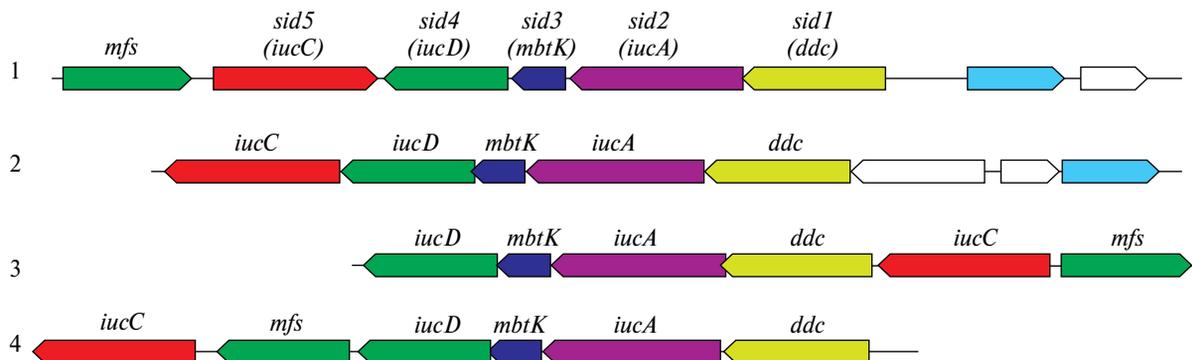


Рис. 2. Организация кластера биосинтеза сидерофоров у различных бактерий: 1 – плазмиды pSID *R. pyridinivorans* 5Ap; 2 – *Paenactinomyces guangxiensis* s-10 (NZ_JACEIQ000000000.1); 3 – *Streptomyces ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1); 4 – *Muxococcus hansupus* mixurus (CP012109.1).

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) ионов тяжелых металлов и арсената для бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа и его мутантного варианта

Штамм	МИК иона, ммоль/л								
	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Co ²⁺	Fe ²⁺	Ni ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Zn ²⁺	As ₂ O ₄ ²⁻
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap (дикий тип)	0.15	4	<0.5	1	3	0.5	<0.05	2	3
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap Rif ^R <i>sid::pK18mob</i>	0.15	4	<0.5	0.5	3	0.2	<0.05	2	2

Таблица 4. Антагонистическая активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа и мутантного варианта

Штаммы-антагонисты	Зона задержки роста тест-штамма <i>P. carotovorum</i> 2.18, мм			
	ПДА	M9 + глюкоза	M9 + сукцинат	M9 + нафталин
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap (дикий тип)	19.0 ± 0.5	37.3 ± 8.0	0	0
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap Rif ^R <i>sid</i> ::pK18mob	13.3 ± 0.7*	16.0 ± 2.0*	0	0

*Значение имеет достоверное отличие ($p < 0.05$) от дикого типа.

Антагонистическая активность мутантных бактерий по отношению к фитопатогенным бактериям *P. carotovorum* 2.18 снижается (табл. 4), что говорит об антимикробной активности продуцируемого соединения.

Однако способность подавлять рост тест-штамма не исчезает полностью, что говорит либо о синтезе соединения с более низкой активностью (т.к. ген *sid1* относится к вспомогательным генам биосинтеза, а один из основных биосинтетических генов *sid5* и вовсе не входит в состав оперона), либо о синтезе других соединений с антимикробной активностью (в частности, локус 2 определяет синтез поликетидного соединения). Интересно и то, что синтез антимикробных метаболитов происходит на полноценной среде (ПДА) и минеральной среде с глюкозой, в то время как на средах с сукцинатом или нафталином бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap таких метаболитов не производят.

Бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap обладают стимулирующим воздействием на корни редиса красного (рис. 3), в то время как мутантный вариант *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob по какой-то причине вызывает достоверное уменьшение длины корней проростков.

На рост гипокотила негативное влияние оказывала сама среда Мейнелла, в то время как при обработке культурой (как 24-, так и 48-часовой) бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap, а также 24-часовой культурой *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob значения длины гипокотила не отличаются от контрольных с водой. 48-часовая культура мутантных бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob оказывает угнетающее, по сравнению с водой, воздействие. Вероятно, инактивация гена *sid1* приводит к образованию соединения, обладающего фитотоксичностью.

Таким образом, в результате полногеномного секвенирования в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap была выявлена плазида pSID размером 250428 п.н. За репликацию данной плазмиды, по всей вероятности, отвечает ген *dnaB*, хотя вблизи него не выявлено характерных для *oriV* структур (повторов, DnaA-боксов, AT-богатых участков). Гены, которые могут быть вовлечены в репликацию (*dnaB*, *ssb*) и разделение плазмид после репликации (*parA*), проявляют наибольшую степень

сходства с детерминантами, расположенными на крупных (224–343 т.п.н.) плазмидах родококков: unnamed1 *R. pyridinivorans* YF3, unnamed1 *R. rhodochrous* LH-B3, pRJH1 *R. pyridinivorans* YC-JH2, pRDE01 *Rhodococcus* sp. RDE2 и pRho-VOC14-C342 *R. opacus* VOC-14.

Плазида pSID определяет способность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap синтезировать биологически активное соединение, обладающее антагонистической активностью против фитопатогенных бактерий *P. carotovorum* 2.18, стимулирующей рост активностью в отношении редиса красного и определяющее устойчивость к ионам железа, кадмия и арсенатам. Нарушение гена *sid1* (одного из вспомогательных биосинтетических генов, первого гена в опероне *sid1–4*) приводит к снижению антагонистической активности бактерий и появлению у них фитотоксических свойств. Гены биосинтеза (*sid1–5*) данного соединения (предположительно, сидерофора)

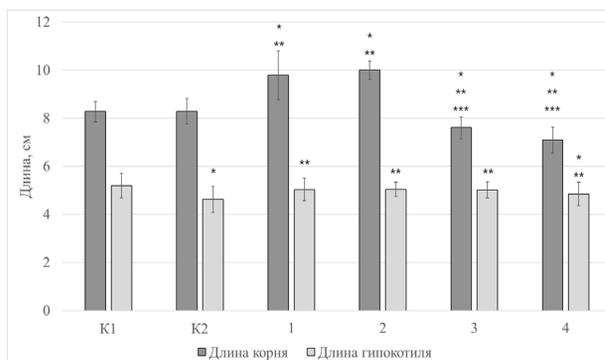


Рис. 3. Влияние бактерий рода *Rhodococcus* на морфометрические показатели проростков редиса красного. K1 – вода; K2 – среда Мейнелла; 1 – 24-часовая культура бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap; 2 – 48-часовая культура бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap; 3 – 24-часовая культура бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob; 4 – 48-часовая культура бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob. * – Отличия от K1 достоверны при $p \leq 0.05$; ** – отличия от K2 достоверны при $p \leq 0.05$; *** – отличия от дикого типа достоверны при $p \leq 0.05$. Высота столбцов отражает среднее значение, планки погрешностей – среднее квадратичное отклонение.

проявляют наибольшую степень сходства (не более 75%) с последовательностями бактерий *S. vilmorinianum* YP1 (CP040244.1), *S. ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1), *Streptomyces* sp. NBC00162 (CP102509.1) и некоторых других стрептомицетов, но не обладают сходством с какими-либо известными генами биосинтеза сидерофоров у родококков. Кроме того, данный локус плазмиды pSID имеет уникальную организацию, т.к. ген *sid5* (*iucC*) транскрибируется во встречном направлении, тогда как у других бактерий он входит в состав оперона и располагается в начале или в конце.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансировании в рамках грантов БРФФИ Б18М-075, Б22МВ-029 и задания 3.6.2 ГПНИ “Биотехнологии” (2021–2023 гг.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают, что конфликты интересов отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М: Мир, 2002. 589 с.
- Мандрик М.И., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н., Трушлиц Э.В., Ларченко А.Ю., Василенко С.Л. Характеристика генетических локусов, определяющих деградацию фенола, в геноме бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap // Экспериментальная биология и биотехнология. 2024. №1. С. 27–40.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
- Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. М.: Мир, 1967. 320 с.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
- Титок М.А. Плазмиды грамположительных бактерий. Минск: Изд-во БГУ, 2004. 120 с.
- Чернявская М.И. Характеристика штаммов нафталинутилизирующих бактерий рода *Rhodococcus* // Труды БГУ: Микробиология. 2016. Т. 11. Ч. 1. С. 190–197.
- Ahsan S., Kabir M.S. Linear plasmids and their replication // Stamford J. Microbiol. 2013. V. 2. P. 1–5.
- Aznar A., Chen N.W., Rigault M., Riache N., Joseph D., Desmaële D., Mouille G., Boutet S., Soubigou-Taconnat L., Renou J.P., Thomine S., Expert D., Dellagi A. Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores // Plant Physiol. 2014. V. 164. P. 2167–2183.
- Blin K., Shaw S., Augustijn H.E., Reitz Z.L., Biermann F., Alanjary M., Fetter A., Terlouw B.R., Metcalf W.W., Helfrich E.J.N., van Wezel G.P., Medema M.H., Weber T. antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualization // Nucl. Acids Res. 2023. V. 51. P. W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
- Bullock W.O. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // BioTechniques. 1987. V. 5. P. 376–378.
- Chan H.Y., Jensen S.O., LeBard R.J., Figgitt W.A., Lai E., Simpson A.E., Brzoska A.J., Davies D.S., Connolly A.M., Cordwell S.J., Travis B.A., Salinas R., Skurray R.A., Firth N., Schumacher M.A. Molecular analysis of pSK1 par: a novel plasmid partitioning system encoded by staphylococcal multiresistance plasmids // J. Mol. Biol. 2022. V. 434. Art. 167770.
- Cserhádi M., Kriszt B., Krifaton Cs., Szoboszlai S., Háhn J., Tóth Sz., Nagy I., Kukolya J. Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains // Int. J. Food Microbiol. 2013. V. 166. P. 176–185.
- Dimkpa C.O., Svatoš A., Dabrowska P., Schmidt A., Boland W., Kothe E. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. // Chemosphere. 2008. V. 74. P. 19–25.
- Grant J.R., Enns E., Marinier E., Mandal A., Herman E.K., Chen C., Graham M., Van Domselaar G., Stothard P. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes // Nucl. Acids Res. 2023. V. 51. P. W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
- Howland C.J., Rees C.E., Barth P.T., Wilkins B.M. The *ssb* gene of plasmid ColIb-P9 // J. Bacteriol. 1989. V. 171. P. 2466–2473.
- Iminova L., Delean Y., Frantsuzova E., Bogun A., Zvonarev A., Suzina N., Anbumani S., Solyanikova I. Physiological and biochemical characterization and genome analysis of *Rhodococcus qingshengii* strain 7B capable of crude oil degradation and plant stimulation // Biotech. Rep. 2022. V. 35. Art. e00741.
- Ji C., Fan Yu, Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins // Animal Nutr. 2016. V. 2. P. 127–133.
- Kriszt R., Krifaton C., Szoboszlai S., Cserhádi M., Kriszt B., Kukolya J., Czéh Á., Fehér-Tóth S., Török L., Szöke Z., Kovács K.J., Barna T., Ferenczi S. New zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain // PLoS One. 2012. V. 7. Art. e43608.

- Kuhl T., Felder M., Nussbaumer T., Fischer D., Kublik S., Chowdhury P.S., Schloter M., Rothballer M. De novo genome assembly of a plant-associated *Rhodococcus qingshengii* strain (RL1) isolated from *Eruca sativa* Mill. and showing plant growth-promoting properties // Microbiol. Res. Announc. 2019. V. 8. Art. e01106-19. <https://doi.org/10.1128/mra.01106-19>
- Kundu D., Hazra C., Chaudhari A. Biodegradation of 2,6-dinitrotoluene and plant growth promoting traits by *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: identification and toxicological analysis of metabolites and proteomic insights // Biocat. Agric. Biotech. 2016. V. 8. P. 55–65.
- Metcaff W.W., Jiang W., Wanner B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6Kgamma origin plasmids at different copy numbers // Gene. 1994. V. 138. P. 1–7.
- Oberto J. SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy // BMC Bioinformatics. 2013. V. 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-4>
- Presentato A., Piacenza E., Turner R.J., Zannoni D., Capelletti M. Processing of metals and metalloids by Actinobacteria: cell resistance mechanisms and synthesis of metal (loid)-based nanostructures // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 2027.
- Roskova Z., Skarohlid R., McGachy L. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? // Sci. Tot. Environ. 2022. V. 819. Art. 153144.
- Saha R., Saha N., Donofrio R.S., Bestervelt L.L. Microbial siderophores: a mini review // J. Bas. Microbiol. 2013. V. 53. P. 303–317.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
- Stevens V., Thijs S., McAmmond B., Langill T., Van Hamme J., Weyens N., Vangronsveld J. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* VSD3, a diesel fuel-degrading and plant growth-promoting bacterium isolated from *Hedera helix* leaves // Gen. Announc. 2017. V. 5. <https://doi.org/10.1128/genomea.01680-16>
- te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Turner S.L., Lilley A.K., Bailey M.J. Two *dnaB* genes are associated with the origin of replication of PQBR55, an exogenously isolated plasmid from the rhizosphere of sugar beet // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 42. P. 209–215.
- Vernikos G.S., Parkhill J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella pathogenicity* islands // Bioinf. 2006. V. 22. P. 2196–2203.

 EXPERIMENTAL ARTICLES

Bioinformatic and Functional Analysis of the pSID Siderophore Biosynthesis Plasmid of *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

M. I. Mandryk¹,*, A. A. Vysotskaya¹, Yu. V. Yahorava¹, D. U. Surzhyk¹,
A. Yu. Larchenka¹, and S. L. Vasylenko¹

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus
*e-mail: charynyi@bsu.by

Received December 6, 2023; revised December 29, 2023; accepted December 31, 2023

Abstract. Complete genome sequencing of *R. pyridinivorans* strain 5Ap revealed the pSID plasmid (CP063453.1) 250428 bp in size. The gene responsible for replication of this plasmid is, most probably, *dnaB*. The genes which may be involved in the replication (*dnaB*, *ssb*) and plasmid separation after replication (*parA*) showed the highest similarity to the determinants located on large (224–343 kb) plasmids of rhodococci: unnamed1 of *R. pyridinivorans* YF3, unnamed1 of *R. rhodochrous* LH-B3, pRJH1 of *R. pyridinivorans* YC-JH2, pRDE01 of *Rhodococcus* sp. RDE2, and pRho-VOC14-C342 of *R. opacus* VOC-14. The pSID plasmid was found to contain two loci responsible for the synthesis of secondary metabolites, one of them determining the synthesis of a polyketide compound (similar sequences have been revealed on plasmids of other rhodococci) and the other one probably determines the synthesis of a siderophore: the genes for biosynthesis of this compound (*sid1–5*) exhibited the highest similarity (not exceeding 75%) with the sequences from *Streptomyces vilmorinianum* YP1 (CP040244.1), *S. ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1), *Streptomyces* sp. NBC00162 (CP102509.1), and some other streptomycetes, while showing no similarity to the known siderophore biosynthesis genes of rhodococci.

The locus of the pSID plasmid responsible for the siderophore synthesis had a unique organization, since transcription of the *sid5 (iucC)* gene occurs in the opposite direction, while in other bacteria it belongs to an operon and is located at one of its termini. Inactivation of the *sidI* gene was found to result in decreased antagonistic activity of *R. pyridinivorans* 5Ap against plant-pathogenic bacteria *P. carotovorum* 2.18, lower resistance to iron and cadmium ions and arsenate, as well as in emergence of phytotoxic properties against radish, while wild-type bacteria exhibit plant growth-promoting activity.

Keywords: Rhodococcus, plasmids, siderophores, plant growth-promoting activity, antagonistic activity, heavy metal resistance

УДК 579.262

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА РЕКОМБИНАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

© 2024 г. Ан. Х. Баймиев^а, *, И. С. Коряков^а, Е. С. Акимова^а,
А. А. Владимирова^а, Ал. Х. Баймиев^а

^аИнститут биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, 450054, Россия

*e-mail: baymiev@anrb.ru

Поступила в редакцию 30.10.2023 г.

После доработки 29.01.2024 г.

Принята к публикации 29.01.2024 г.

Бобово-ризобиальный симбиоз является уникальным природным явлением, благодаря которому растение получает необходимый ему минеральный азот за счет фиксации его из атмосферы. В этом взаимодействии участвуют два партнера: бобовое растение и клубеньковые бактерии (ризобии). В дикой природе представители семейства Fabaceae вступают в симбиоз с полиморфной группой специфичных к ним ризобий, механизм и причины формирования гетерогенности которых на сегодняшний день являются предметами активного исследования. В своей работе на примере штамма бактерии *Rhizobium leguminosarum*, строго специфичного к фасоли обыкновенной, мы продемонстрировали, что в течение 30 сут при привнесении его в почву в клетках возникают генетические перестройки, проявляющиеся в изменении картины генетического профиля. Кроме того, обнаружено, что на рекомбинационную активность клеток оказывают влияние и корневые экссудаты, полученные при прорастании семян, что может свидетельствовать об участии растения в формировании полиморфизма своих микросимбионтов. Данный факт позволяет взглянуть на этот процесс не как на спонтанное, а как на контролируемое со стороны растения событие.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, симбиотические гены, филогения, симбиоз, бобовые растения

DOI: 10.31857/S0026365624040046

Клубеньковые бактерии (ризобии) — микроорганизмы, образующие азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, в результате которого на их корнях формируются специализированные структуры, называемые клубеньками, где, собственно, и происходит фиксация атмосферного азота с превращением его в аммонийную форму.

Важность бобово-ризобиального симбиоза очевидна не только для сельского хозяйства и для всего живого в целом в связи с огромным значением биологической фиксации азота, но и для изучения взаимоотношений партнеров в данном симбиотическом взаимодействии, являясь отличной моделью для этой цели. Бактерии рода *Rhizobium* являются типичными клубеньковыми бактериями, образующими клубеньки на широком круге бобовых растений. Вид *R. leguminosarum* обычно разделяют на три симбиовара по специфичности к своим растениям-хозяевам: bv. *viciae* — к растениям трибы *Vicia* (*Faba*); bv. *trifolii* — к растениям рода клевер; и bv. *phaseoli* — к фасоли (Jordan et al., 1889; Rogel et al., 2011).

У бобовых растений, особенно у дикорастущих видов, клубеньки формируются бактериями, которые фиксируют азот с разной степенью эффективности (Баймиев и соавт., 2022). К этому приводит высокий полиморфизм данных микроорганизмов. Теоретически, за многие тысячелетия совместной эволюции бобовых растений и ризобий для каждого вида растения уже должны были быть отобраны наиболее оптимальные штаммы бактерий, которые за счет размножения в клубеньках должны были сформировать основной пул микроорганизмов, с которыми растение каждый сезон вступало бы в эффективный азотфиксирующий симбиоз. На самом деле каждый год на корнях бобовых образуются клубеньки, сформированные полиморфной группой бактерий. Этому способствует необычайно высокая пластичность геномов ризобий (Martinez et al., 1990; Romero, Palacios, 1997), связанная с наличием большого количества инсерционных элементов (IS), транспозонов и повторяющихся последовательностей (Minamisawa et al., 1999; Romero et al., 1995), наибольшая концентрация

которых обнаруживается вблизи кластеров симбиотических генов (*sym*-генов). Кроме того, активное участие клубеньковых бактерий в процессе горизонтального переноса генов приводит к образованию разнообразных штаммов путем комбинации различных участков генома (Проворов, Воробьев, 2012).

Высокая вариабельность ризобий, приводящая к образованию генетического разнообразия данных микроорганизмов в ризосфере, дает возможность бобовому растению в начале вегетации “выбирать” наиболее подходящие для него варианты в зависимости от своих потребностей в азоте и возможностей обеспечивать успешную азотфиксацию в клубеньках (Проворов, Воробьев, 2012). Это позволяет макросимбионту очень гибко “настраивать” свой азотфиксирующий аппарат в зависимости от климатических и эдафических факторов.

Поскольку растение-хозяин в обмен на фиксированный азот обеспечивает своих микросимбионтов углеводным питанием, то ему приходится отдавать предпочтение бактериям с такой азотфиксирующей активностью, которая не была бы для них слишком затратной и не могла бы вместо пользы принести вред. Для того чтобы этот выбор был возможен, необходимо наличие в почве специфичных для данного бобового растения штаммов ризобий, отличающихся генетическим разнообразием. Кроме того, возникновение гетерогенности в популяции клубеньковых бактерий, несомненно, играет также важную роль и в приспособлении самих микроорганизмов к изменяющимся условиям обитания. Но только до сих пор не совсем понятно, как формируются генетические варианты ризобий: возникают ли они произвольно по типу генерации случайных чисел до появления удачной комбинации, или же имеют некоторые закономерности, которые являются движущей силой, определяющей вектор изменений.

Таким образом, целью данной работы являлось исследование влияния внешних факторов на формирование разнообразия бактерий, образующих клубеньки на модельном растении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и условия культивирования. В качестве модельного объекта была использована фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.) и два специфичных к этому растению штамма ризобий *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Pvu2 и St4. Бактерии из клубеньков изолировали методом получения пункций из зоны размножения бактерий и рассевали ее на питательную агаризованную среду YM (0.1%

дрожжевой экстракт, 1% маннит, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4$, 0.01 NaCl, 1.5% агар) до отдельных колоний (Баймиев и соавт., 2010). Из каждого клубенька в работу брали по одному изоляту.

Выделение тотальной ДНК. ДНК из бактерий выделяли лизированием клеток в 1% Triton X100 и 1% суспензии Chelex100. Для этого в 1.5 мл пробирки со 100 мкл 1% Triton X100 и 1% суспензии Chelex100 помещали небольшое количество бактериальной массы и после суспензирования инкубировали при температуре 95°C 10 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость брали в качестве матрицы для ПЦР.

Генетический анализ штаммов. Генетическое разнообразие собранных штаммов исследовали с помощью RAPD-анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990) с использованием следующих “случайных” праймеров: LMBD 5'-gggcgctg-3'; 2. AFK-1 5'-acggtggacg-3'; 3. OPA 5'-cgctcattc-3'.

Для выявления влияния активных компонентов, выделяемых корнями при прорастании семян на рекомбинационную активность клубеньковых бактерий, семена проращивали в дистиллированной воде в стерильных условиях до начала появления зеленых проростков, после чего остаток жидкости отбирали в новую стерильную посуду. В разные стерильные пробирки на 50 мл добавляли 1 мл и 0.1 мл отобранной жидкости и приливали к ним по 1 мл культуры клеток бактерий *R. leguminosarum* с концентрацией 1×10^8 КОЕ/мл и по 8 мл свежей питательной среды YM. Бактерии культивировали в течение 1 сут при 28°C при слабом покачивании, после чего ими обработали стерильный песок. После 30 дней инкубации в песок посадили стерилизованные семена фасоли. После появления клубеньков у растений их собирали и из них получали чистые культуры ризобий.

Стерилизацию семян проводили в течение 2 мин в растворе 10% гипохлорита натрия и после трехкратной отмывки стерильной водой еще раз обрабатывали 2 мин 70% раствором этилового спирта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ризобии характеризуются высокой пластичностью генома, и для лучшего понимания закономерностей генетических процессов, происходящих у данных бактерий, по нашему мнению, необходимо их изучать именно в естественных условиях существования. Поскольку бактерии *R. leguminosarum* являются почвенными микроорганизмами (особенно те, которые способны участвовать в образовании бобово-ризобиального симбиоза, обозначаемые как клубеньковые бактерии), то на начальных этапах работы нами было исследовано влияние

данной среды на генетическую изменчивость взятых в анализ штаммов. В первую очередь нами была проведена проверка штаммов *R. leguminosarum* Pvu2 и St4 на их способность образовывать клубеньки на корнях фасоли. Для этого ее стерильные семена инокулировали обоими анализируемыми штаммами по отдельности и выращивали на стерильном песке. После месяца прорастивания на корнях растений были обнаружены клубеньки, из которых в дальнейшем были выделены бактерии. Анализ на генетическую идентичность выявил абсолютное сходство изолятов микроорганизмов, полученных из клубеньков, с исходными штаммами, которыми осуществляли предпосевную инокуляцию. Это говорит о том, что изменения генома бактерий внутри клубенька за счет внутренней рекомбинации не произошло.

На следующем этапе нами была выбрана почва, на которой фасоль обыкновенная не формирует клубеньки ввиду отсутствия в ней специфичных для данного растения штаммов ризобий. Хотя другие бобовые, такие как представители рода клевер (*Trifolium*) и горошек (*Vicia*), которые также вступают в симбиоз с бактериями вида *R. leguminosarum*, клубеньки здесь успешно образуют. В дальнейшем данная почва была инокулирована выбранными для исследования штаммами (Pvu2 и St4), являющимися специфичными к фасоли обыкновенной. Причем инокуляцию проводили одновременно обоими штаммами для того, чтобы оценить их конкурентоспособность. Через 30 дней инкубации в анализируемую почву посадили стерильные семена фасоли. После месяца выращивания из образованных клубеньков были выделены изоляты бактерий, которые в дальнейшем исследовали методом фингерпринт-анализа с целью сопоставления профилей их геномов с таковыми у исходных штаммов. Ввиду высокой специфичности клубеньки могут быть сформированы только за счет привнесенных в почву микроорганизмов. Таким образом, появляется возможность из общего микробиома почвы обратно вычленить искусственно добавленные бактерии, которые какое-то время находились в почве.

При анализе изолятов, выделенных из клубеньков фасоли, было выявлено, что все клубеньки образованы только дериватами одного из привнесенных штаммов — Pvu2, что говорит о большей конкурентоспособности данного штамма по сравнению с St4. Кроме того, было обнаружено, что многие изоляты приобрели отличия в своих генетических профилях по сравнению с исходным вариантом. В RAPD профилях анализируемых микроорганизмов, по сравнению с исходным штаммом, можно наблюдать появление и исчезновение полос, что свидетельствует о произошедших рекомбинационных событиях в геномах данных бактерий (рис. 1, А).

В то время как у изолятов, полученных из клубеньков фасоли, обработанные этими же штаммами семена которой были высажены в стерильный песок, в RAPD профилях изменений практически не выявляется. Это, с одной стороны, показывает изначальную однородность бактерий, с другой — отсутствие внутренней рекомбинации микроорганизмов после заражения растения, что исключает влияние растения на изменение их генетического профиля при эндофитном состоянии (рис. 1, Б).

В статье приведены фореграммы RAPD анализов с использованием праймера AFK-1. Именно этот праймер оказался наиболее информативным и лучше всего показал полиморфизм образцов. С применением остальных олигонуклеотидов образовывалось меньше полос, и результаты оказались менее наглядными. Но тем не менее, использование нескольких праймеров в RAPD анализе дало возможность более уверенно утверждать в некоторых случаях об отсутствии изменений в структуре генома.

Бобовое растение для своего успешного роста и развития нуждается в эффективном симбиозе с клубеньковыми бактериями, где важную роль играет наличие в его ризосфере подходящих штаммов, специфичных для него ризобий. Формирование их разнообразия для макросимбионта имеет жизненно важное значение. С целью исследования участия растения в регуляции процессов рекомбинации у клубеньковых бактерий нами было

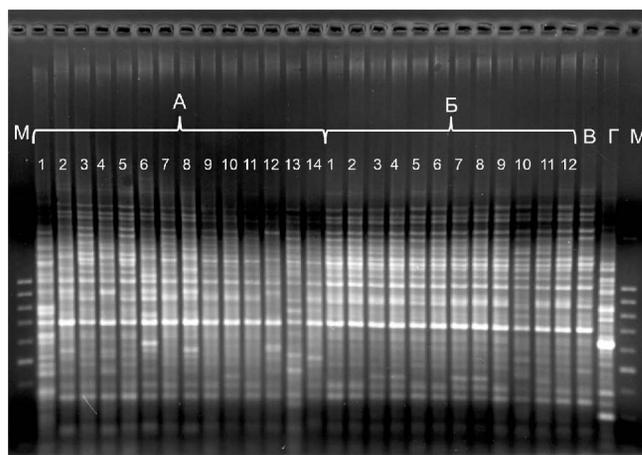


Рис. 1. Фореграмма RAPD-профилей изолятов ризобий, полученных из клубеньков фасоли обыкновенной, с использованием праймера AFK-1: А — профили изолятов, выделенных из клубеньков растения, выращенного на почве, инокулированной штаммами *R. leguminosarum* Pvu2 и St4 после 30-дневной инкубации; Б — профили изолятов, полученных из клубеньков растения, выращенного на стерильном песке сразу после инокуляции штаммами *R. leguminosarum* Pvu2 и St4; В — профиль штамма Pvu2; Г — профиль штамма St4; М — 100 п.н. маркер.

проанализировано влияние экссудатов, выделяемых корнями при прорастании семян, на изменение генетического профиля исследуемых штаммов микроорганизмов. Для этого были взяты корневые выделения проростков фасоли обыкновенной, которыми были обработаны ризобии штамма Pvu2. Затем этими бактериями инокулировали стерильный песок. После 30 дней инкубации данных микроорганизмов в песке в него были посажены стерилизованные семена фасоли. При анализе изолятов, полученных из образовавшихся на корнях растения клубеньков, было обнаружено, что корневые выделения прорастающих семян оказывают влияние на генетические перестановки у исследуемого штамма бактерий (рис. 2). Таким образом, можно предположить, что растение способно активно участвовать в образовании генетического разнообразия у потенциальных микросимбионтов.

В естественных условиях дикорастущие бобовые растения редко растут в монокультурах, и в сообществе с одними бобовыми часто произрастают и другие представители этого семейства. Рядом могут оказаться растения, вступающие в симбиоз с одними и теми же видами ризобий, но имеющими разную специфичность по отношению к макросимбионту. В этой связи мы провели опыт по исследованию влияния одного растения на изменение генетического профиля микросимбионтов другого. Для этого в инокулированную штаммами Pvu2 и St4 почву после 30 дней инкубации вначале были высажены семена гороха посевного, который образует клубеньки с аборигенными бактериями *R. leguminosarum*, присутствующими во взятой в работу почве, но который при этом не вступает в симбиоз со штаммами, специфичными к фасоли обыкновенной. После прорастания гороха на стадии 4-го листа проростки были срезаны на уровне почвы и в их корневую систему были посажены стерилизованные семена фасоли обыкновенной. Таким образом, достигалось наибольшее соприкосновение ризосферы гороха посевного и вновь посаженной фасоли обыкновенной. Параллельно на ту же инокулированную почву были посажены семена фасоли, но без предварительного проращивания в ней гороха. Через месяц с ее корней были собраны клубеньки и выделены чистые культуры ризобий. С полученными изолятами также был проведен фингерпринт-анализ, в ходе которого были получены интересные данные. Обнаружено, что растения фасоли, посаженные на корневище гороха, образовали клубеньки с группой бактерий, которые имели меньше отличий в картине своих генетических профилей по сравнению с исходным штаммом, чем микроорганизмы, полученные из клубеньков растений, выращенных на почве без предварительного проращивания в ней гороха (рис. 3).

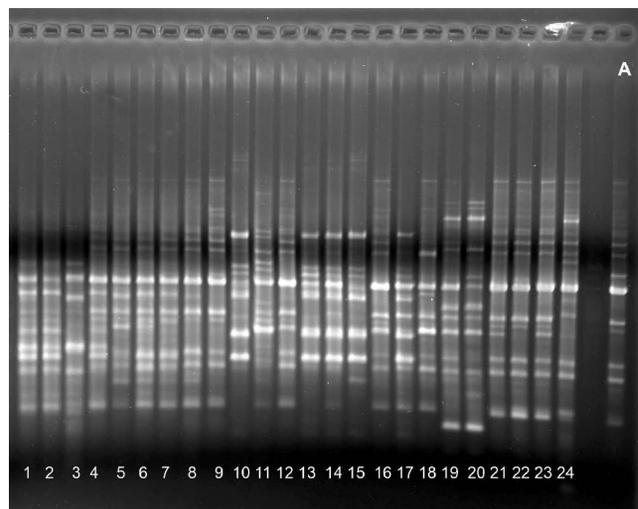


Рис. 2. Фореграмма RAPD-профилей изолятов ризобий, полученных из клубеньков фасоли обыкновенной, инокулированной бактериями после 30-дневной инкубации с корневыми выделениями проростков с использованием праймера AFK-1. А – профиль исходного штамма Pvu2.

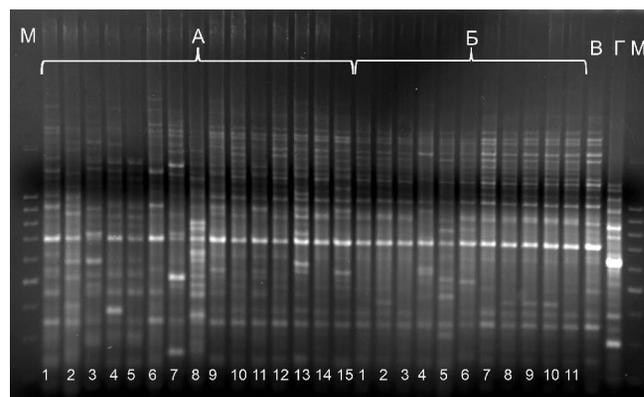


Рис. 3. Фореграмма RAPD-профилей изолятов ризобий, выделенных из клубеньков фасоли обыкновенной с использованием праймера AFK-1. А – профили изолятов, полученных из клубеньков растения, выращенного на почве, инокулированной штаммом *R. leguminosarum* Pvu2 после 30-дневной инкубации; Б – профили изолятов, полученных из клубеньков растения, выращенного в корневой системе гороха посевного на почве, инокулированной штаммом *R. leguminosarum* Pvu2; В – профиль штамма Pvu2; Г – профиль штамма St4; М – 100 п.н. маркер.

Высокая пластичность геномов ризобий, о которой известно давно, является основной причиной большого разнообразия штаммов данных бактерий. Благодаря этому в начале каждого цикла своего развития растения имеют возможность выбирать среди такого разнообразия наиболее

оптимальные варианты в зависимости от условий произрастания (Fischer, 1994; Проворов, Воробьев, 2000; Nandasena et al., 2006; Andam et al., 2007; Barcellos et al., 2007; Zhao et al., 2008). В своей работе по анализу возникновения перестроек в геномах у двух штаммов клубеньковых бактерий в условиях почвенной среды мы обнаружили, что у исследуемых микроорганизмов довольно быстро, а именно уже через 30 дней инкубации, происходят различные генетические перестройки, проявляющиеся в виде изменения генетического профиля. Мы на данном этапе работы пока не можем утверждать, происходит ли это за счет внутренних рекомбинационных процессов или связано с горизонтальным переносом генов. Но, очевидно, что почвенная среда и, скорее всего, ее микробиом благоприятно влияют на эти процессы. И можно сказать, что уже через относительно непродолжительное время привнесенные штаммы “растворяются” в общем микробиоме, образуя большое количество других генетических вариантов этого вида. Новые штаммы ризобий при привнесении их в почву, вероятно, недолго сохраняются в неизменном виде, но при этом каждый из них может быть источником новых генов или их сочетаний для общего пангенома микробного сообщества этой среды.

Для успешного роста бобовым растениям жизненно важно взаимодействовать со специфичными для них клубеньковыми бактериями, формирование разнообразия которых для них крайне необходимо. В литературе уже появляются работы, свидетельствующие о влиянии растений на генетические процессы бактерий в своей ризосфере (Ling et al., 2016). Полученные нами данные о способности макросимбионта через корневую экссудацию оказывать воздействие, а, возможно, и контролировать процессы генетических перестроек у микросимбионтов подтверждает, что бобовые являются непосредственными участниками формирования разнообразия штаммов ризобий в своей ризосфере, что заставляет под другим углом взглянуть на эти процессы.

Обнаруженный нами интересный факт о том, что растения фасоли, посаженные на корневище гороха, образовали клубеньки с группой бактерий, которые имели меньше различий в картине своих генетических профилей по сравнению с исходным штаммом, в отличие от микроорганизмов, полученных из клубеньков растений, выращенных на почве без предварительного проращивания в ней гороха, говорит об очень непростых отношениях бобовых и бактерий. В данном случае мы можем предположить, что растения способны активировать отдельно взятые штаммы, которые в дальнейшем будут формировать большую часть клубеньков. А также возможно, что одни растения способны через корневые выделения оказывать влияние на рекомбинационные

процессы определенной группы ризобий других растений. Но все это требует дальнейшего, более детального исследования.

В данной работе мы использовали специфичность образования симбиоза между фасолью и взятыми в работу штаммами как инструмент, позволяющий направленно отбирать среди множества разнообразных бактерий, образующих микробиом почвы, только те из них, которые имеют фенотип, узнаваемый этим растением-хозяином. И поскольку данным фенотипом обладали только привнесенные нами штаммы микроорганизмов, то клубеньки могли образовывать лишь только они, их дериваты, или же получившие этот фенотип посредством горизонтального переноса генов бактерии. Тридцать дней инкубации, вероятно, небольшой срок, и мы в своих опытах в клубеньках встречаем в основном производные только одного штамма, но тем не менее, уже получившие некоторые изменения в своем генетическом профиле. Но тут нельзя забывать и о том, что мы не можем судить о степени изменений в генотипах бактерий в целом, поскольку не имеем возможности отследить все микроорганизмы, а лишь только те, которые смогли образовать клубеньки на корнях растений. Здесь особое значение приобретает элемент конкурентоспособности, поскольку даже при внесении нами двух разных штаммов ризобий, способных по отдельности активно образовывать клубеньки, по факту их формируют только производные одного из них. Любое изменение в генотипе бактерий может сказаться на их клубенкообразующей активности, и те варианты микроорганизмов, которых коснулись изменения областей генома, связанных с механизмами взаимодействия с растением, могут выпасть из поля зрения. Но тем не менее, по тем результатам, которые нами были получены, уже можно с уверенностью судить о том, что новые штаммы *R. leguminosarum* формируются с высокой интенсивностью, и они не являются статичными единицами, а представляют собой находящиеся в постоянной генетической динамике организмы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-24-00207 (<https://rscf.ru/project/22-24-00207/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баймиев А.Х., Акимова Е.С., Коряков И.С., Владимирова А.А., Баймиев А.Х. Зависимость состава клубеньковых бактерий лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) от стадии вегетации растения-хозяина // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 586–596.
- Baymiev An. Kh., Akimova E.S., Koryakov I.S., Vladimirova A.A., Baymiev Al. Kh. The composition of *Lotus corniculatus* root nodule bacteria depending on the host plant vegetation stage // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 553–562.
- Баймиев Ан.Х., Птицын К.Г., Баймиев Ал.Х. Влияние интродукции караганы древовидной на состав ее клубеньковых бактерий // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 123–128.
- Baymiev An.K., Pritsyn K.G., Baimiev Al.K. Influence of the introduction of *Caragana arborescens* on the composition of its root nodule bacteria // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 115–120.
- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1573–1587.
- Provorov N.A., Vorob'ev N.I. Evolutionary genetics of nodule bacteria: molecular and population aspects // Russ. J. Genet. 2000. V. 36. P. 1323–1335.
- Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. СПб.: Информ-Навигатор, 2012. 400 с.
- Andam C.P., Mondo S.J., Parker M.A. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 4684–4690.
- Barcellos F.G., Menna P., Batista J.S., Hungria M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 2635–2643.
- Fischer H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia // Microbiol. Rev. 1994. V. 58. P. 352–386.
- Jordan D.C. Genus I. *Rhizobium* Frank // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds. Krieg N.R., Holt J.G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. V. 1. P. 235–242.
- Ling J., Wang H., Wu P., Li T., Tang Y., Naseer N., Zheng H., Masson-Boivin C., Zhong Z., Zhu J. Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P.13875–13880.
- Martinez E., Romero D., Palacios R. The *Rhizobium* genome // Crit. Rev Plant Sci. 1990. V. 9. P. 59–93.
- Minamisawa K., Nakatsuka Y., Isawa T. Diversity and field site variation of indigenous populations of soybean bradyrhizobia in Japan by fingerprints with repeated sequences RS α and RS β // FEMS Microbiol. Ecol. 1999. V. 29. P. 171–178.
- Nandasena K.G., O'Hara G.W., Tiwari R.P., Howieson J.G. Rapid in situ evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 7365–7367.
- Rogel M.A., Ormeño-Orrillo E., Romero E.M. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes // Syst. Appl. Microbiol. 2011. V. 34. P. 96–104.
- Romero D., Martinez-Salazar J., Girard L., Brom S., Dávila G., Palacios R., Flores M., Rodríguez C. Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 973–980.
- Romero D., Palacios R. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes // Annu. Rev. Genet. 1997. V. 31. P. 91–111.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6531–6535.
- 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.

EXPERIMENTAL ARTICLES

**Effect of Environmental Factors on Recombinant Activity
of Root Nodule Bacteria**

**An. Kh. Baymiev¹,*, I. S. Koryakov¹, E. S. Akimova¹,
A. A. Vladimirova¹, and Al. Kh. Baymiev¹**

¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*
**e-mail: baymiev@anrb.ru*

Received October 30, 2023; revised January 29, 2024; accepted January 29, 2024

Abstract. The legume-rhizobia symbiosis is a unique natural phenomenon, which supplies the plant with the necessary mineral nitrogen via fixation of atmospheric dinitrogen. This interaction involves two partners: the legume plant and root nodule bacteria (rhizobia). In the wild, members of the *Fabaceae* family enter into symbiosis with a polymorphic group of rhizobia specific to them; the mechanism and reasons for the formation of heterogeneity of rhizobia are currently the subject of active research. In the present work, a *Rhizobium leguminosarum* strain strictly specific to *Phaseolus vulgaris* L. was used to show that within 30 days upon its introduction into soil, genetic rearrangements occurred in the cells, as was revealed by changes in the pattern of its genetic profile. It was also found that recombination activity of the cells was also affected by the root exudates produced during seed germination, which may indicate involvement of the plant in the formation of polymorphism of its microsymbionts. These findings suggest interpretation of this process not as a spontaneous event, but rather as the event controlled by the plant.

Keywords: root nodule bacteria, symbiotic genes, phylogeny, symbiosis, legumes

УДК 579.252.2

СТРУКТУРА РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНОВ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ В *RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS* M8 – БИОКАТАЛИЗАТОРЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКРИЛОВЫХ ГЕТЕРОПОЛИМЕРОВ

© 2024 г. Е. Г. Гречишникова^{а,*}, А. О. Шемякина^а, А. Д. Новиков^а,
Т. И. Калинина^а, К. В. Лавров^а, А. С. Яненко^а

^аНИИЦ “Курчатовский институт”, Курчатовский геномный центр, Москва, 123182, Россия
*e-mail: sel-sanguine@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

После исправления 06.02.2024 г.

Принята к опубликованию 08.02.2024 г.

Штамм *Rhodococcus rhodochrous* M8 является платформенным для разработки биотехнологий биокаталитического получения акриловых мономеров, сырья для получения акриловых гетерополимеров. Сконструирована генетическая система для изучения кобальт-зависимой транскрипции генов нитрилгидратазы в этом штамме, на основе репортерного гена металл-независимой ациламидазы из *Rhodococcus qingshengii* TA37. Показано, что кобальт-регулируемый промотор расположен на значительном удалении (около 0.5 т.п.н.) от генов нитрилгидратазы. Удаление участка между промотором и генами нитрилгидратазы существенно снижает как активность промотора, так и степень регулируемости кобальтом. Полученные результаты улучшают возможности рационального конструирования регулируемых экспрессионных кассет с использованием промотора генов нитрилгидратазы в *Rhodococcus* и дальнейшей разработки биокатализаторов на основе этих бактерий.

Ключевые слова: нитрилгидратаза, *Rhodococcus*, биокатализ, регуляция транскрипции

DOI: 10.31857/S0026365624040059

Работа направлена на изучение особенностей системы кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов кобальт-содержащей нитрилгидратазы (далее – НГ) в *Rhodococcus rhodochrous* M8 (Pogorelova et al., 1996). Этот штамм является платформенным для разработки биотехнологий биокаталитического получения акриловых мономеров, сырья для получения акриловых гетерополимеров. Система регуляции транскрипции генов НГ в этом штамме состоит из регуляторной области генов НГ и гена кобальт-зависимого транскрипционного регулятора CblA (Lavrov et al., 2018). Эти генетические элементы используются для конструирования штаммов-биокатализаторов на основе *Rhodococcus* для получения акриловых мономеров и дальнейшего получения акриловых гетерополимеров (Lavrov et al., 2013; Lavrov, Yanenko, 2013; Lavrov et al., 2014; Lavrov et al., 2019; Shemyakina et al., 2021; Grechishnikova et al., 2023).

Структура регуляторной области генов НГ недостаточно изучена, в частности, неизвестна локализация в ней собственно промотора. В задачи работы входили биоинформатический анализ

межгенной области перед генами НГ для выявления предполагаемого кобальт-индуцибельного промотора и экспериментальная локализация этого промотора.

Культуры штамма *R. rhodochrous* M8 и его производных выращивали в колбах Эрленмейера (объем среды 50 мл) при 30°C и встряхивании при 300 об./мин на жидкой минимальной синтетической (МС) среде следующего состава (г/л): Na₂HPO₄ · 12H₂O – 2.5; KH₂PO₄ – 1.0; MgSO₄ · 7H₂O – 0.1; FeSO₄ · 7H₂O – 0.004; глюкоза – 5; мочевины – 6. Если указано в тексте, добавлялись также CoCl₂ · 6H₂O – 0.01 г/л и апрамицин – 0.1 г/л. Удельную ациламидазную активность клеток измеряли, как описано ранее (Lavrov et al., 2018), и выражали в единицах, соответствующих количеству мкМ 4'-нитроанилина, появившегося за 1 минуту в расчете на 1 мг клеток по сухому весу (мкМ_{п-на}/мин × мг с.в.кл). Биоинформатические инструменты использовали при их стандартных настройках, процедуры клонирования проводили согласно рекомендациям фирм-производителей ферментов. Конъюгационные скрещивания, введение плазмид электропорацией

и RT-qPCR проводили, как описано нами ранее (см. соответствующие ссылки в тексте).

Штаммы *R. rhodochrous* M8, M33, M33 aam и M50 хранятся в БРЦ ВКПМ НИЦ “Курчатовский институт” под номерами Ас-2021, Ас-2017, Ас-1960 и Ас-2133 соответственно.

Биоинформатический анализ промоторной области генов нитрилгидратазы. Протяженность межгенной области перед генами НГ, в которой может находиться промотор, определяли с использованием полной последовательности генома *R. rhodochrous* M8 (Novikov et al., 2021). Для обнаружения предполагаемых генов перед генами НГ использовали как аннотации, полученные с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2016), так и дополнительные проверки с помощью InterProScan 5 software (Jones et al., 2014). Ближайшей к *nhmB*, первому гену оперона НГ (на расстоянии около 0.6 т.п.н.), оказалась предполагаемая открытая рамка считывания, обозначенная $\Delta nhmE$, гомологичная части предполагаемого гена *nhhE* с неизвестной функцией из *R. rhodochrous* J1 (Komeda et al., 1996). Предполагаемая регуляторная область протяженностью 0.6 т.п.н. (обозначена также P_{nh569} , рис. 1а) была проанализирована с помощью ресурса BPROM (<http://www.softberry.com/>) и аналогов (PromoterHunter (http://www.phisite.org/main/index.php?nav=tools&nav_sel=hunter), NNPP2.2 (Reese, 2001), SAPPHERE.CNN (Coppens et al., 2022)).

В результате были выделены два предполагаемых промотора: P1 на расстоянии [–472; –419] от стартового кодона и P2 на расстоянии [–85; –39] (рис. 1б). Дополнительно, весь регион был проанализирован с помощью ресурса EMBOS palindrom (Rice et al., 2000) (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/help/palindrome>) для поиска предполагаемых сайтов посадки кобальт-зависимого регулятора, которые, по литературным данным (Busenlehner et al., 2003), могут быть несовершенными инвертированными повторами. Такие повторы были выявлены около обоих предполагаемых промоторов (рис. 1б).

Тестирование системы оценки кобальт-зависимой транскрипции в *Rhodococcus*. Экспериментальная проверка предсказаний промоторов в исследуемой регуляторной области требовала удобной системы оценки транскрипционной активности конструируемых вариантов этой области. Для этого была протестирована система оценки уровней кобальт-зависимой транскрипции, содержащая в качестве репортера ген металл-независимой ациламидазы из *R. qingshengii* TA37 (Lavrov, Yanenko, 2013). Активность этого фермента легко измеряется по цветной реакции гидролиза *n*-нитроацетанилида, без разрушения клеток (Lavrov et al., 2010).

Для тестирования системы использовали штамм *R. rhodochrous* M33 aam, полученный ранее (Lavrov et al., 2018) в результате введения гена ациламидазы

aam в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33, $\Delta nhmCD$ производный от штамма M8. Ген вводили таким образом, чтобы он оказался под транскрипционным контролем регуляторной области генов НГ. Для этого заменяли гены субъединиц нитрилгидратазы *nhmBA* на ген *aam* при сохранении структуры локуса нитрилгидратазы и его регуляторной области P_{nh569} . Замену *nhmBA* на *aam* проводили путем двойной рекомбинации с неспособной к автономной репликации в родококках плазмидой pRY1- P_{nh569} -aam-nhmG. Рекомбинация проходила после конъюгативного введения этой плазмиды по методике (Riabchenko et al., 2006) по плечам, содержащим последовательности P_{nh569} и *nhmG*, в результате чего был получен штамм *R. rhodochrous* M33 aam (рис. 1в).

Штамм *R. rhodochrous* M33 aam в течение 1 сут выращивали на жидкой среде в присутствии и в отсутствие ионов кобальта и измеряли ациламидазные активности клеточек и уровни транскрипции P_{nh569} (с помощью RT-qPCR). В присутствии

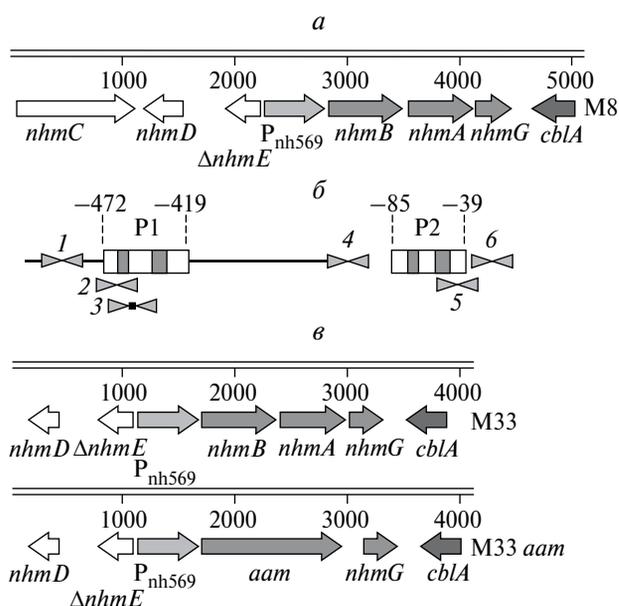


Рис. 1. Структуры ДНК-локусов, описываемых в работе: а – гены кластера НГ в *R. rhodochrous* M8. *nhmC*, *nhmD* – гены амид-зависимых регуляторов транскрипции генов НГ, $\Delta nhmE$ – предположительная открытая рамка считывания с неизвестной функцией, P_{nh569} – регуляторная область генов НГ, *nhmB*, *nhmA* – гены β и α субъединиц НГ соответственно, *nhmG* – ген белка металлошаперона НГ, *cblA* – ген кобальт-зависимого регулятора транскрипции генов НГ; б – предполагаемые промоторы (P1 и P2) и сайты связывания кобальт-зависимого регулятора *cblA* (пары стрелок 1–6) в регуляторной области P_{nh569} перед геном *nhmB*; в – структура кластера генов НГ в штаммах *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 aam (в последнем гены *nhmBA* заменены на ген ациламидазы *aam*). $\Delta nhmD$ – частично делегированный *nhmD*.

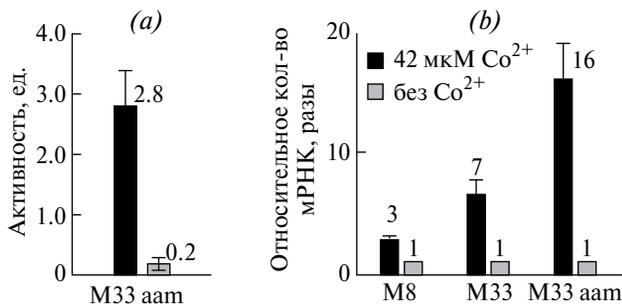


Рис. 2. Сравнение активностей промотора НГ по уровням транскрипции и активности репортерного гена *aam*: а – ациламидазные активности клеток в штамме *R. rhodochrous* M33 *aam*, выращенных с добавкой и без добавки CoCl_2 ; б – уровни транскрипции оперона P_{nh569} -*nhmBAG* в штаммах *R. rhodochrous* M8, M33 и оперона P_{nh569} -*aam-nhmG* в штамме *R. rhodochrous* M33 *aam*, выращенных в присутствии и в отсутствие CoCl_2 , определенные с помощью RT-qPCR. Все данные получены при отборе клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста.

ионов кобальта ациламидазные активности клеток и уровни транскрипции активировались сходно (в 14 и 16 раз выше, чем без ионов кобальта, рис. 2а и 2б). Дополнительно, сходные тенденции кобальт-зависимой активации транскрипции были обнаружены в тех же условиях роста в штаммах *R. rhodochrous* M8 и M33, содержащих под контролем P_{nh569} гены *nhmBA* (рис. 2б).

Таким образом, ациламидазная активность клеток, в которых *aam* находится под контролем P_{nh569} ,

может быть использована для оценки уровней транскрипции, инициирующихся в исследуемой регуляторной области.

Локализация кобальт-индуцируемого промотора.

Промоторная активность исследуемой регуляторной области была обнаружена ранее (Lavrov et al., 2018), однако детальная проверка предсказаний промоторов в ней требовала конструирования экспрессионных кассет, содержащих разные делеционные варианты этой области. Для проверки функционирования предполагаемых промоторов P1 и P2, входящих в регуляторную область P_{nh569} , была сконструирована серия автономно реплицирующихся плазмид на базе плазмиды pRY16 (Lavrov et al., 2018), содержащих варианты экспрессионной кассеты 2Tfd- P_{nhN} -*aam-nhmG-cblA*. В этих вариантах репортерный ген ациламидазы *aam* находился под контролем вариантов регуляторной области разной протяженности: P_{nh569} , P_{nh408} , P_{nh235} , P_{nh157} , P_{nh31} (индекс обозначает длину варианта от стартокодона). Фрагмент 2Tfd (двойной терминатор транскрипции из бактериофага *fd*) был введен для снижения влияния возможных вышележащих промоторов на активность исследуемого участка. Также был сконструирован контрольный вариант с максимально короткой регуляторной областью P_{nh31} , не содержащий 2Tfd (рис. 3а).

Плазмиды ввели в штамм *R. rhodochrous* M50, производный от штамма M8, не содержащий кластера НГ *nhmBAG-cblA*; полученные штаммы выращивали в присутствии апрамицина в течение 3 сут в присутствии и в отсутствие ионов кобальта. Штамм с наиболее длинным вариантом

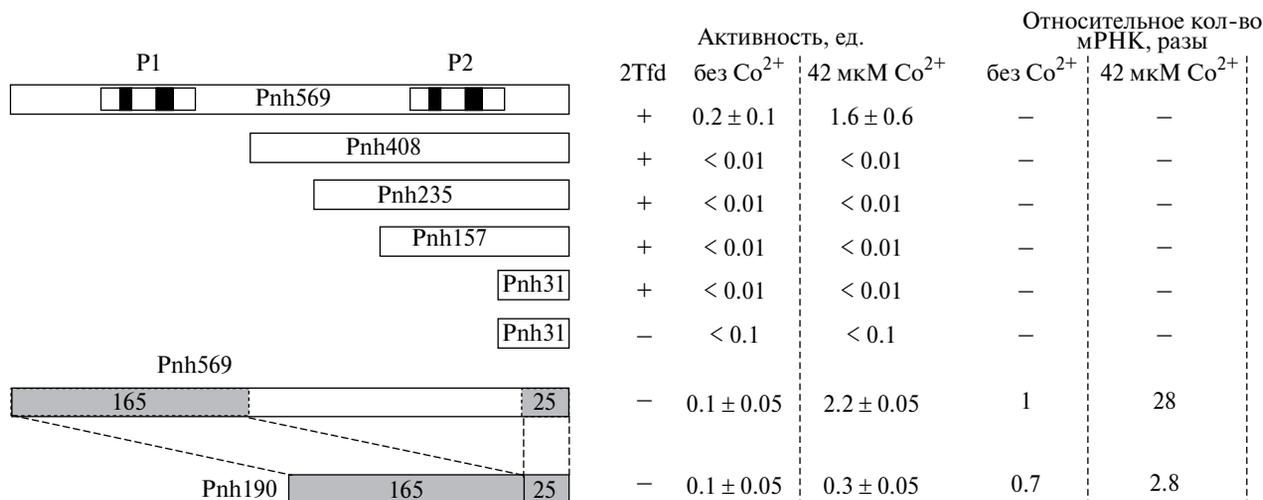


Рис. 3. Структуры делеционных вариантов регуляторной области P_{nh569} (слева), ациламидазные активности (в середине) и относительное количество мРНК *aam-nhmG* (справа) в штаммах *R. rhodochrous*, содержащих репортерный ген *aam* под контролем этих вариантов. а – Варианты регуляторной области, протестированные в составе экспрессионной кассеты P_{nhN} -*aam-nhmG-cblA* на автономной плазмиде pRY16 в штамме *R. rhodochrous* M50 (стационарные культуры); б – варианты регуляторной области, протестированные в составе такой же экспрессионной кассеты, введенной в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 *aam* (экспоненциально растущие культуры).

регуляторной области P_{nh569} проявил ациламидазную активность, и она регулировалась ионами кобальта (1.6 ± 0.6 и 0.2 ± 0.1 ед. \pm Co^{2+} соответственно). Штаммы с укороченными вариантами регуляторной области не проявили ациламидазной активности. Контрольный вариант без 2Tfd фрагмента проявлял минимальную активность, измерившуюся на пределе обнаружения использованной методики, около 0.05 ед. (рис. 3а). Последнее указывает на невысокий уровень транскрипции с вышележащих промоторов, не влияющий существенно на уровни активности исследуемых фрагментов регуляторной области. Полученные результаты указывают на то, что для инициации транскрипции требовался участок ДНК, содержащий предполагаемый промотор P1.

Для уточнения функции участков регуляторной области сконструировали уменьшенный вариант P_{nh569} , обозначенный P_{nh190} . Этот вариант был лишен внутреннего участка, содержащего предполагаемый промотор P2. P_{nh190} состоял из фрагмента 165 п.н., содержащего промотор P1, и фрагмента 25 п.н., прилегающего к старт-кодону *nhmB* (содержит SD-сайт; рис. 3б). Кассету P_{nh190} -aam в составе интегративной плазмиды ввели в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 aam и таким же образом сконструировали изогенный штамм для сравнения *R. rhodochrous* M33 P_{nh569} -aam с регуляторной областью полной длины. Оба штамма выращивали в жидких средах (без апрамицина) в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в течение 24 ч (до конца экспоненциальной фазы роста). Штамм с кассетой P_{nh190} -aam продемонстрировал ациламидазную активность и способность к индукции ионами кобальта, однако уровень его активности в присутствии ионов кобальта оказался в несколько раз ниже, по сравнению с уровнем активности штамма с кассетой P_{nh569} -aam в таких же условиях (рис. 3б).

Разницы в относительных количествах мРНК в присутствии и в отсутствие ионов кобальта у штаммов M33 P_{nh190} -aam и M33 P_{nh569} -aam коррелировали с различиями в их ациламидазных активностях в тех же условиях, т.е. различались в 4 раза и на порядок соответственно (рис. 3б).

Таким образом, промоторной активностью и способностью к регуляции ионами кобальта обладал участок ДНК, содержащий предсказанный промотор P1. Однако сниженные (по сравнению с более полным вариантом P_{nh569}) уровни активности указывают на существенную роль внутреннего участка регуляторной области от -404 до -26 , содержащего предполагаемый промотор P2. При этом, варианты регуляторной области, содержащие только предполагаемый P2 (P_{nh408} , P_{nh235} , P_{nh157}) не проявили промоторной активности. В этой связи интересно отметить, что ранее (Komeda et al., 1996) в сходной (но не идентичной) регуляторной

области генов нитрилгидратазы из штамма *R. rhodochrous* J1 сайты инициации транскрипции (TSS) картировались в районе 71 и 48 нуклеотидов перед стартовым кодоном *nhhB* (гомолог *nhmB*). Промотор НГ в штамме J1, соответствующий таким позициям TSS, может располагаться в районе, аналогичном участку P2 в штамме M8 (рис. 1б). К сожалению, Komeda и соавторы не приводят описания экспериментов по картированию TSS или ссылок на такие описания. Кроме того, в этой работе не проведено тестирование промоторной активности участка, аналогичного P2, с помощью какого-либо репортера, поэтому оценить достоверность результатов затруднительно. Данные, полученные нами при использовании гена-репортера, указывают на то, что если транскрипция и иницируется на участке P2, то количества такого транскрипта недостаточно для синтеза измеряемого количества ациламидазы.

Возможная роль внутреннего участка в транскрипционной активности исследуемой регуляторной области может быть связана с наличием РНК-эффекторов, например, рибопереключателей (Nudler, Mironov, 2004), и/или иных вторичных структур. Биоинформатически обнаружить рибопереключатели нам не удалось (инструментами Riboswitch Scanner (Mukherjee, Sengupta, 2016) и Infernal (Nawrocki, Eddy, 2013)), что позволяет лишь говорить об отсутствии в исследуемом участке известных структур такого рода.

Что касается вторичных структур мРНК, не относящихся к рибопереключателю, на расстояниях -398 и -237 п.н. от старт-кодона гена *nhmB* (внутри области, удаленной при конструировании P_{nh190} варианта) предсказываются две шпильки со стеблями протяженностью 10 и 7 пар нуклеотидов соответственно (с помощью Unafold (Markham, Zuker, 2008) и RNAstructure (Reuter, Mathews, 2010)). Возможное влияние предполагаемых шпилек на уровни активности регуляторной области, а также других возможных эффектов (например, кооперативных взаимодействий между отдаленными участками ДНК (Dandanell et al., 1987), взаимодействия транскрипционных регуляторов с анализируемыми участками ДНК в исследуемой регуляторной области) станут предметом дальнейшего экспериментального изучения.

В результате проведенной работы мы обнаружили, что кобальт-регулируемый промотор расположен на значительном удалении (около 0.5 т.п.н.) от контролируемых им генов НГ, что нехарактерно для бактериальных промоторов. Участок между обнаруженным нами промотором и НГ генами существенен как для уровня транскрипционной активности промотора, так и для степени его контроля в присутствии ионов кобальта. Полученные результаты выявляют сложность структуры регуляторной области генов нитрилгидратазы и создают

базис для дальнейших исследований этого практически значимого промотора, важных для дальнейшей разработки биокатализаторов на основе бактерий *Rhodococcus*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ Курчатовский институт, при частичной поддержке Соглашения МОН 075-15-2019-1659 о создании геномных центров мирового уровня (определение уровней транскрипции с помощью RT-qPCR).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Busenlehner L.S., Pennella M.A., Giedroc D.P. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. P. 131–143.
- Coppens L., Wicke L., Lavigne R. SAPPHERE. CNN: Implementation of dRNA-seq-driven, species-specific promoter prediction using convolutional neural networks // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022. V. 20. P. 4969–4974.
- Dandanell G., Valentin-Hansen P., Erik Løve Larsen J., Hammer K. Long-range cooperativity between gene regulatory sequences in a prokaryote // *Nature.* 1987. V. 325. P. 823–826.
- Grechishnikova E.G., Shemyakina A.O., Novikov A.D., Lavrov K.V., Yanenko A.S. *Rhodococcus*: sequences of genetic parts, analysis of their functionality, and development prospects as a molecular biology platform // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2023. V. 43. P. 835–850.
- Jones P., Binns D., Chang H.-Y., Fraser M., Li W., McAnulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G. InterProScan 5: genome-scale protein function classification // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. P. 1236–1240.
- Komeda H., Kobayashi M., Shimizu S. Characterization of the gene cluster of high-molecular-mass nitrile hydratase (H-NHase) induced by its reaction product in *Rhodococcus rhodochrous* J1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 4267–4272.
- Lavrov K., Zalunin I., Kotlova E., Yanenko A. A new acylamidase from *Rhodococcus erythropolis* TA37 can hydrolyze N-substituted amides // *Biochemistry (Moscow).* 2010. V. 75. P. 1006–1013.
- Lavrov K., Larikova G., Yanenko A. Novel biocatalytic process of N-substituted acrylamide synthesis // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013. V. 49. P. 702–705.
- Lavrov K., Yanenko A. Cloning of new acylamidase gene from *Rhodococcus erythropolis* and its expression in *Escherichia coli* // *Russ. J. Genet.* 2013. V. 49. P. 1078–1081.
- Lavrov K., Novikov A., Ryabchenko L., Yanenko A. Expression of acylamidase gene in *Rhodococcus erythropolis* strains // *Russ. J. Genet.* 2014. V. 50. P. 1003–1007.
- Lavrov K., Grechishnikova E., Shemyakina A., Novikov A., Kalinina T., Epremyan A., Glinskii S., Minasyan R., Voronin S., Yanenko A. Optimization of the expression of nitrilase from *Alcaligenes denitrificans* in *Rhodococcus rhodochrous* to improve the efficiency of biocatalytic synthesis of ammonium acrylate // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. P. 861–869.
- Lavrov K.V., Shemyakina A.O., Grechishnikova E.G., Novikov A.D., Derbikov D.D., Kalinina T.I., Yanenko A.S. New *cblA* gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous* // *Res. Microbiol.* 2018. V. 169. P. 227–236.
- Markham N.R., Zuker M. UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 453. P. 3–31.
- Mukherjee S., Sengupta S. Riboswitch Scanner: an efficient pHMM-based web-server to detect riboswitches in genomic sequences // *Bioinformatics.* 2016. V. 32. P. 776–778.
- Nawrocki E.P., Eddy S.R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. P. 2933–2935.
- Novikov A.D., Lavrov K.V., Kasianov A.S., Topchiy M.A., Gerasimova T.V., Yanenko A.S. Complete genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain M8, a platform strain for acrylic monomer production // *Microbiol. Resour. Announce.* 2021. V. 10. № 10. Art. e01314-20. <https://doi.org/10.1128/mra.01314-20>
- Nudler E., Mironov A.S. The riboswitch control of bacterial metabolism // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 11–17.
- Pogorelova T.E., Ryabchenko L.E., Sunzov N.I., Yanenko A.S. Cobalt-dependent transcription of the nitrile hydratase gene in *Rhodococcus rhodochrous* M8 // *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. V. 144. P. 191–195.
- Reese M.G. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome // *Comput. Chem.* 2001. V. 26. P. 51–56.
- Reuter J.S., Mathews D.H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis // *BMC Bioinf.* 2010. V. 11. P. 1–9.
- Riabchenko L., Podcherniaev D., Kotlova E., Ianenko A. Cloning the amidase gene from *Rhodococcus*

- rhodochrous* M18 and its expression in *Escherichia coli* // Genetika. 2006. V. 42. P. 1075–1082.
- Rice P., Longden I., Bleasby A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite // Trends Genet. 2000. V. 16. P. 276–277.
- Shemyakina A. O., Grechishnikova E. G., Novikov A. D., Asachenko A. F., Kalinina T. I., Lavrov K. V., Yanenko A. S. A set of active promoters with different activity profiles for superexpressing *Rhodococcus* Strain // ACS Synth. Biol. 2021. V. 10. P. 515–530.
- 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 // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 6614–6624.

SHORT COMMUNICATIONS

Structure of the Regulatory Region of Nitrile Hydratase Genes in *Rhodococcus rhodochrous* M8, a Biocatalyst for Production of Acrylic Heteropolymers

E. G. Grechishnikova^{1, *}, A. O. Shemyakina¹, A. D. Novikov¹,
T. I. Kalinina¹, K. V. Lavrov¹, and A. S. Yanenko¹

¹NRC “Kurchatov Institute”, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: sel-sanguine@yandex.ru

Received October 24, 2023; revised February 6, 2024; accepted February 8, 2024

Abstract. *Rhodococcus rhodochrous* strain M8 is a platform for development of the biotechnologies for biocatalytic production of acrylic monomers, the raw material for synthesis of acrylic heteropolymers. A genetic system for investigation of the cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in this strain was constructed, based the reporter gene of the metal-independent acylamidase from *Rhodococcus qingshengii* TA37. The cobalt-regulated promoter was shown to be located at a significant distance (~0.5 kb) from nitrile hydratase genes. Excision of the region between the promoter and the nitrile hydratase genes decreased significantly both the promoter activity and the degree of regulation by cobalt. Our results improve the possibilities for rational design of regulated expression cassettes using the promoter of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus*, and for further development of biocatalysts based on these bacteria.

Keywords: nitrile reductase, *Rhodococcus*, biocatalysis, transcription regulation

УДК 579.258

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *PHN* ТРАНСПОРТЕРОВ *ACHROMOBACTER INSOLITUS* LCU2

© 2024 г. Е. В. Крючкова^{а, *}, Г. Л. Бурыгин^{а, б, с}^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049, Россия^бСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия^сСаратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, Саратов, 410012, Россия

*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

Фосфонаты являются альтернативным источником фосфора для бактерий. Геном *Achromobacter insolitus* LCU2 содержит три предсказанных кластера *phn* транспортеров ABC-типа-переносчиков фосфонатов в клетку. Чтобы понять функциональную, эволюционную и экологическую роль *phn* кластеров, мы провели филогенетический анализ субстрат-связывающих PhnD белков штамма LCU2 с гомологами других видов рода *Achromobacter* и близкородственных родов семейства *Alcaligenaceae*. PhnD транспортеры образовывали три отдельных кластера, что свидетельствует о различии в их структурном строении. PhnD₁ и PhnD₂ у *Achromobacter* присутствовали в геномах всех видов, группировались в основном отдельно от других представителей *Alcaligenaceae*, что говорит о вертикальном наследовании генов *phnD*₁ и *phnD*₂ и их участии в процессах жизнеобеспечения. PhnD₃ найден в геномах у семи видов рода *Achromobacter*. Возможно, ген *phnD*₃ приобретен в процессе горизонтального переноса или дубликации и индуцируется при адаптации к изменяющимся условиям обитания. Поддержание трех структурно разных кластеров *phn* транспортеров, по-видимому, обеспечивает *A. insolitus* LCU2 экологическое преимущество, путем извлечения фосфора не только из фосфонатов, но и других фосфорорганических соединений.

Ключевые слова: фосфонаты, *phn* транспортеры, *Achromobacter insolitus*, филогения, *Alcaligenaceae*

DOI: 10.31857/S0026365624040062

Фосфонаты – органические соединения, сохраняющие высокостабильную (С–Р) связь, используются бактериями как альтернативный источник фосфора. Дефицит фосфатов в окружающей среде индуцирует у бактерий работу *Pho* регулона и экспрессию генов *phn* оперона, отвечающего за поглощение и расщепление фосфонатов. Гены *phn* оперона кодируют АТФ-зависимый импортер (PhnC) и периплазматический субстрат-связывающий белок (PhnD) для поглощения фосфонатов, регулятор транскрипции (PhnF), а также белковый комплекс (PhnGHIJKLMNO), непосредственно участвующий в расщеплении С–Р связи (Amstrup et al., 2023). Однако наличие *phn* оперона не всегда позволяет бактериям утилизировать различные по своей структуре фосфонаты. Так, например, культура *E. coli*, у которой впервые был открыт и описан *phn* оперон, росла на алкил

фосфонатах, но не была способна к росту на глифосате, даже в присутствии ароматических аминокислот (Kertesz et al., 1991). Одной из причин, почему некоторые бактерии, имеющие С–Р лиазу, не утилизируют те или иные фосфонаты, может быть различная субстратная специфичность и степень аффинности транспортных *phn* белков к фосфоновым кислотам и их производным (Hove-Jensen et al., 2014).

Целью данного исследования было проведение сравнительного филогенетического анализа между различными субстрат-связывающими PhnD транспортерами штамма *Achromobacter insolitus* LCU2 и гомологами других видов рода *Achromobacter*, а также некоторых близкородственных представителей семейства *Alcaligenaceae*.

Ризосферный штамм *A. insolitus* LCU2 (IBPPM 631; RCAM 04723) выделен с корней

люцерны посевной, как деструктор глифосата по С–Р лиазному пути. Геном *A. insolitus* LCu2 секвенирован на базе Казанского федерального университета, аннотирован и депонирован в базе данных GenBank под номером CP038034.

Для анализа использовали аминокислотные последовательности, предсказанные как PhnD, экстрагированные из общедоступных в GenBank бактериальных геномов рода *Achromobacter* и семейства *Alcaligenaceae*, включая исследуемый штамм LCu2. Множественное выравнивание последовательностей для филогении осуществляли в Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Филогенетическую реконструкцию проводили в программе MEGA X (Kumar et al., 2018), используя Neighbor-joining анализ и бутстрэп-тест (1000 повторов).

Геном *A. insolitus* LCu2 содержал три кластера предсказанных *phn* транспортеров: первый (*phnC₁D₁E₁*), расположенный на прямой цепи около *phn* оперона, кодирующего С–Р лиазный ферментный комплекс; второй (*phnD₂C₂E₂E₂*) и третий (*phnD₃C₃E₃*), размещенные, соответственно, выше и ниже *phn* оперона на обратной цепи ДНК. Таким образом, для работы были отобраны три субстрат-связывающие белка PhnD₁ (QEK91627), PhnD₂ (QEK91158) и PhnD₃ (QEK94759). Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей этих белков между собой показало низкую степень идентичности в пределах 25–29% и покрытие менее 70%.

Первоначально мы проанализировали геномы различных видов рода *Achromobacter*, чтобы выяснить количество *phn* транспортеров и гомологию к PhnD белкам штамма LCu2. Поиск осуществляли с помощью BLASTP анализа. Гомологи PhnD1 и PhnD2 транспортеров присутствовали у всех исследуемых видов *Achromobacter*, обладали высокой степенью идентичности (> 95%). PhnD3 был найден только в геномах семи видов – *A. denitrificans*, *A. arsenitoxdans*, *A. deleyi*, *A. aegrifaciens*, *A. insolitus*, *A. pestifer*, *A. agilis* (дополнительные материалы, таблица S1).

Для наглядности в филогенетический анализ были добавлены последовательности Phn транспортеров некоторых бактерий семейства *Alcaligenaceae*, близкородственных роду *Achromobacter*: *Alcaligenes faecalis* (типовой вид для семейства), *Bordetella petrii*, *B. Holmesii*, *B. pertussis*. А также PhnD последовательности *Cupriavidus basilensis*, *C. pampae*, *C. agavae*, демонстрирующие идентичность с белками штамма LCu2 в BLASTP анализе, исключая другие ахромобактерии. Филогенетическая реконструкция показала, что исследуемые PhnD транспортеры штамма LCu2 расходились в три самостоятельных кластера. Кластер фосфонат-связывающих белков PhnD₁ ахромобактерий, из *phn* оперона, был образован тремя обособленными кладами, отстоял отдельно от *B. petrii* и *C. basilensis*. Транспортер PhnD₁ штамма *A. insolitus* LCu2

группировался с белками *A. aegrifaciens*, *A. pestifer*, *A. anxifer* (рис. 1).

Подобная топология говорит о консервативности гена *phnD₁*, который наследовался, вероятно, путем вертикального переноса и является важным для жизнеобеспечения бактерий. Используя множественное выравнивание последовательностей PhnD₁ относительно референсного белка из *E. coli* (3P71), показано наличие консервативных мотивов в белке *A. insolitus* LCu2, а также аминокислотные остатки, потенциально отвечающие за связывание субстрата (дополнительные материалы, рис. S1).

Второй кластер был образован белками PhnD₃ ахромобактерий, а также *Cupriavidus* и *Bordetella*. Несмотря на высокую идентичность (92–98%) между PhnD₃ последовательностями ахромобактерий (дополнительные материалы, таблица S1), белки *A. insolitus* LCu2, *A. agilis*, *A. denitrificans* образовывали самостоятельные клады. Возможно, поддержание в геноме PhnD₃ транспортеров обеспечивает бактериям преимущество в адаптации к изменяющимся условиям местообитаний. Анализ геномного окружения выявил рядом с ABC-кассетой PhnD₃C₃E₃ ген, кодирующий фосфолипазу C (QEK94757), расщепляющую фосфолипид мембраны – фосфатидилхолин до фосфохолина и диацилглицерина. У некоторых почвенных и ризосферных бактерий экспрессия фосфолипазы C увеличивается в десятки раз в условиях фосфорного голодания, а высвободившийся фосфохолин используется на нужды клетки (Krol, Becker, 2004; Zavaleta-Pastor et al., 2010).

В кластере, образованном белками PhnD₂, транспортер штамма LCu2 располагался в общей кладе с *A. aegrifaciens*, *A. pestifer*, *A. anxifer*. Видовой состав соответствовал кладе, образованной белками PhnD₁, но имел иную топологию. Транспортер PhnD₂ *A. insolitus* LCu2 был на одной ветви с *A. anxifer*, а PhnD₁ штамма LCu2 с *A. aegrifaciens*. В остальном PhnD₂ последовательности ахромобактерий преимущественно группировались отдельно от изолятов *Alcaligenaceae*. Исключение составили белки двух видов – *A. xylosoxidans* и *A. spanius*, которые показали филогенетическую близость к *Alcaligenes faecalis*. Общая топология кластера PhnD₂ также свидетельствовала о вертикальном наследовании гена *phnD₂*, и его роли в жизнедеятельности клетки. Вокруг кассеты *phnD₂C₂E₂E₂* расположены гены биосинтеза витаминов группы В (тиамина, рибофлавина, пантотеновой кислоты), а также гены, продукты которых фосфорилируют витамины до активных коферментов. Можно предположить, что PhnD₂ имеет сродство к фосфорилированным витаминам, или транспортирует источники для фосфорилирования. Безусловно, эта гипотеза нуждается в тщательном исследовании.

Таким образом, биоинформатический и филогенетический анализ показали, что три предсказанных

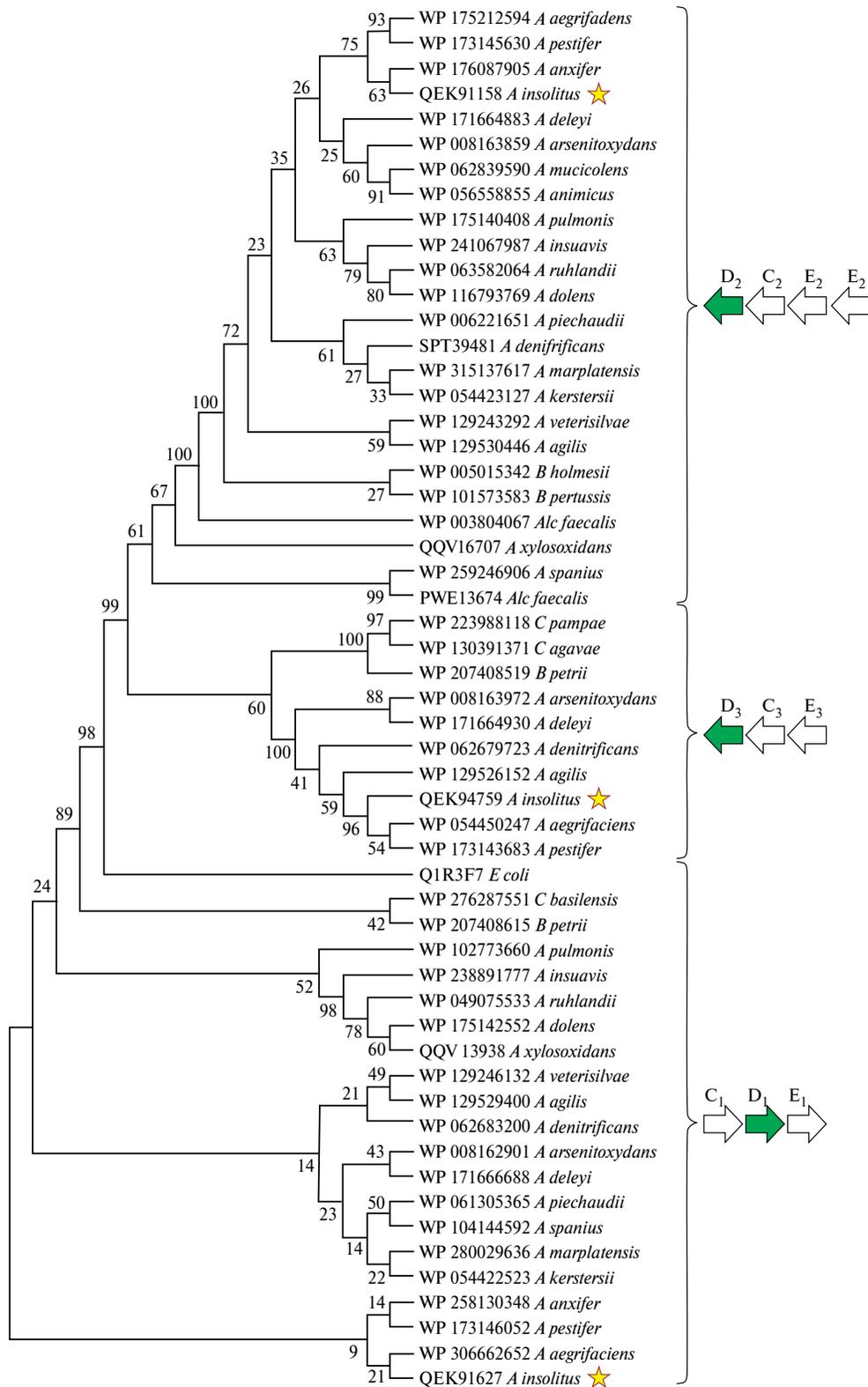


Рис. 1. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей PhnD транспортеров бактерий рода *Achromobacter* и некоторых представителей семейства *Alcaligenaceae*. PhnD последовательности штамма *A. insolitus* LCu2 обозначены звездами; фигурные скобки соответствуют границам кластеров, образованных белками PhnD₁, PhnD₂, PhnD₃; структурные организации ABC-кассет *phn* транспортеров в геномах *Achromobacter*, включая *A. insolitus* LCu2, приведены справа; *phnD* маркированы зеленым.

PhnD субстрат-связывающих транспортера в геномах представителей рода *Achromobacter*, включая последовательности *A. insolitus* LCu2, различаются между собой по степени консервативности, структурному строению, геномному контексту. Выявленные различия могут быть опосредованы сродством PhnD транспортеров к разным источникам фосфора, включая как органофосфонаты, так и соединения с фосфоэфирной связью. Полученные результаты отражают адаптационный потенциал *A. insolitus* LCu2, а также демонстрируют его возможные стратегии в условиях дефицита неорганического фосфора.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы 121031700141-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Amstrup S.K., Ong S.C., Sofos N., Karlsen J.L., Skjerning R.B., Boesen T., Enghold J.J., Hove-Jensen B.,

- Brodersen D.E.* Structural remodelling of the carbon-phosphorus lyase machinery by a dual ABC ATPase // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. Art. 1001. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36604-y>
- Hove-Jensen B., Zechel D.L., Jochimsen B.* Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014. V. 78. P. 176–197.
- Kertesz M., Elgorriaga A., Amrhein N.* Evidence for two distinct phosphonate-degrading enzymes (C–P lyases) in *Arthrobacter* sp. GLP-1 // *Biodegradation.* 1991. V. 2. P. 53–59.
- Krol E., Becker A.* Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011 // *Mol. Genet. Genom.* 2004. V. 272. P. 1–17.
- 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.
- Shah B.S., Ford B.A., Varkey D., Mikolajek H., Orr C., Mykhaylyk V., Owens R.J., Paulsen I.T.* Marine picocyanobacterial PhnD1 shows specificity for various phosphorus sources but likely represents a constitutive inorganic phosphate transporter // *ISME J.* 2023. V. 17. P. 1040–1051.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. Art. 539.
- Zavaleta-Pastor M., Sohlenkamp C., Gao J.L., Guan Z., Zaheer R., Finan T.M., Geiger O.* *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 302–307.

SHORT COMMUNICATIONS

Phylogenetic Analysis of *phn* Transporters of *Achromobacter insolitus* LCu2

Ye. V. Kryuchkova^{1,*} and G. L. Burygin^{1, 2, 3}

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

²*Saratov State University, Saratov, 410012 Russia*

³*Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering Named after N.I. Vavilov, Saratov, 410012 Russia*
*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Received October 17, 2023, revised December 15, 2023; accepted December 31, 2023

Abstract. Phosphonates are alternative phosphorus sources for bacteria. The genome of *Achromobacter insolitus* strain LCu2 contains three predicted *phn* clusters of ABC-type phosphonate transporters into the cell. To understand the functional, evolutionary, and ecological role of the *phn* clusters, phylogenetic analysis of substrate-binding PhnD proteins from strain LCu2 with their homologs in other *Achromobacter* species and in closely related genera of the family *Alcaligenaceae* was carried out. The PhnD transporters

formed three separate clusters, which indicated the differences in their structural composition. PhnD₁ and PhnD₂ were present in the genomes of all *Achromobacter* species and grouped separately from those of other members of the family *Alcaligenaceae*, which indicated vertical inheritance of the *phnD*₁ and *phnD*₂ genes and their involvement in the life-supporting processes. PhnD₃ was found in the genomes of seven *Achromobacter* species. The *phnD*₃ gene was probably acquired via horizontal transfer or duplication and is induced during adaptation to changing environmental conditions. Maintenance of three structurally different clusters of the *phn* transporters is probably ecologically advantageous to *A. insolitus* LCu2, providing for phosphorus retrieval from synthetic and natural organophosphonates as well as other sources.

Keywords: phosphonates, *phn* transporters, *Achromobacter insolitus*, phylogeny, *Alcaligenaceae*

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ PHN ТРАНСПОРТЕРОВ АХРОМОВАСТЕР INSOLITUS LCU2

© 2024 г. Е.В. Крючкова^{а, *}, Г.Л. Бурыгин^{а, б, с}

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

^бСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия

^сСаратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова, Саратов, 410012, Россия

*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Таблица S1. Наличие и идентичность аминокислотных последовательностей PhnD в геномах бактерий рода *Achromobacter*

No.	Species	Identity, %		
		PhnD ₁	PhnD ₂	PhnD ₃
1	<i>A. xylosoxidans</i>	99.69	91.10	—
2	<i>A. piechaudii</i>	94.19	96.69	—
3	<i>A. denitrificans</i>	95.71	96.39	95.44
4	<i>A. arsenitoxydans</i>	95.06	98.19	93.73
5	<i>A. insuavis</i>	92.33	97.89	—
6	<i>A. deleyi</i>	94.80	97.59	92.23
7	<i>A. aegrifaciens</i>	97.55	98.49	98.70
8	<i>A. mucicolens</i>	22.58*	97.29	—
9	<i>A. marplatensis</i>	95.71	96.39	—
10	<i>A. insolitus</i>	100	100	100
11	<i>A. ruhlandii</i>	91.41	96.12	—
12	<i>A. spanius</i>	95.72	96.39	—
13	<i>A. aestuarii</i>	78.26	48.24	—
14	<i>A. anxifer</i>	96.63	99.70	—
15	<i>A. animicus</i>	—	96.39	—
16	<i>A. pestifer</i>	96.93	98.49	98.39
17	<i>A. kerstersii</i>	95.72	96.08	—
18	<i>A. veterisilvae</i>	95.09	96.08	—
19	<i>A. agilis</i>	95.71	96.69	97.26
20	<i>A. aloeverae</i>	71.91	36.08	—
21	<i>A. dolens</i>	91.10	95.52	—
22	<i>A. pulmonis</i>	92.33	96.39	—

Белками запроса в BLASTP анализе были PhnD транспортеры штамма *A. insolitus* LCu2.

УДК 579.252:57.083.18

ГЕНОМ НОВОГО ШТАММА *HALORUBRUM DISTRIBUTUM* ICIS4, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA*

© 2024 г. Е. А. Селиванова^а,*, А. С. Балкин^а, Ю. А. Хлопко^а,
В. Я. Катаев^а, А. О. Плотников^а

^аИнститут клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,
Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Оренбург, 460000, Россия

*e-mail: selivanova-81@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 19.11.2023 г.

Принята к публикации 19.11.2023 г.

Определена и проанализирована полная последовательность генома нового штамма галоархеи *Halorubrum distributum* ICIS4, выделенного из длительно поддерживаемой в лабораторных условиях каротиногенной культуры микроводоросли *Dunaliella salina*. Геном размером 3.32 МБ включает 3236 белок-кодирующих генов. Из 2817 групп гомологичных генов 11 – уникальны для этого штамма. В геноме выявлены гены утилизации глицерина, крахмала, синтеза витаминов, пигментов и сидерофоров, которые могут участвовать в формировании и поддержания ассоциации с микроводорослями. В геноме обнаружен регион, схожий с вирусом HRPV9, и другой кольцевой контиг, имеющий сходство с фагом галоархеи *Haloquadratum walsbyi*.

Ключевые слова: галофильные микроорганизмы, галоархеи, *Halorubrum distributum*, *Dunaliella salina*, прокариоты-ассоцианты микроводоросли

DOI: 10.31857/S0026365624040075

В гипергалинных водоемах галофильные микроводоросли рода *Dunaliella* являются наиболее распространенными представителями фитопланктона, играют ведущую роль в структуре микробиоценоза, выступая в качестве первичного продуцента (Bardavid et al., 2008). Клетки *Dunaliella* синтезируют глицерин в больших количествах в качестве осмопротектора и ключевого компонента питания гетеротрофных сообществ (Open, 2017). Несмотря на активное использование *Dunaliella* в биотехнологии, исследования ассоциаций прокариот с длительно поддерживаемыми культурами данной водоросли малочисленны (Cao et al., 2013; Keerthi et al., 2018). Ранее нами показано преобладание архей рода *Halorubrum* и бактерий рода *Halomonas* в лабораторных культурах микроводорослей *D. parva* (Selivanova et al., 2019), выявлено стимулирующее влияние *Halorubrum tebenquichense* на рост и развитие водоросли *D. parva* (Немцева и соавт., 2013). Важным практическим аспектом исследований ассоциаций водорослей и прокариот является поиск рост-стимулирующих прокариотных культур, который

в основном ограничивался ассоциантами морских видов *Dunaliella* (Le Chevanton et al., 2013) и не затрагивал галофильные, в том числе, биотехнологически важный вид *D. salina*.

Целью данного исследования является анализ генома нового штамма галоархей, выделенного из длительно поддерживаемой в лабораторных условиях культуры *D. salina*.

Штамм архей ICIS 4 получен из лабораторной культуры каротиногенного штамма галофильной зеленой микроводоросли *D. salina* BS2, выделенной в 2012 г. (Соловченко и соавт., 2015) и депонирован в Сетевую коллекцию симбионтных микроорганизмов ИКВС УрО РАН (<https://ikvs.info/biobank>). Культивирование *D. salina* и прокариот-ассоциантов осуществляли в соответствии с методиками, описанными ранее (Немцева и соавт., 2013). Тотальную ДНК из чистой культуры архей выделяли набором Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (“Zymo Research”, США). ДНК библиотеку готовили с применением набора реагентов NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (“New England Biolabs”, США). Высокопроизводительное

секвенирование на приборе MiSeq (“Illumina”, США) проводили с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v.2. Риды фильтровали по качеству ($Q = 30$) и длине (30 н.п.), удаляли адаптеры с применением программы Trimmomatic v. 0.39 (Bolger et al., 2014). Сборку генома проводили с использованием Unicycler (Wick et al., 2017). Качество сборки оценивали в программе Quast v. 5.0.2 (Gurevich et al., 2013), полноту сборки – в BUSCO v. 5.4.3 (Simão et al., 2015) и CheckM v1.1.3 (Parks et al., 2015). Геном аннотировали на сервере NCBI с помощью инструмента для аннотации генома прокариот PGAP (Li et al., 2021). Функциональную аннотацию белок-кодирующих генов проводили с помощью сервера eggNOG-mapper v2 (Cantalapiedra et al., 2021) и алгоритма BlastKOALA (Kanehisa et al., 2016). Мультилокусный филогенетический анализ проводили с использованием последовательностей 81 консервативного гена, выделенных из сборок полных геномов с помощью UBCG v2 (Kim et al., 2021). Показатели сходства геномов: средние уровни идентичности нуклеотидных последовательностей ANI и OrthoANI, средний уровень идентичности аминокислотных последовательностей AAI, рассчитывали с помощью программ OrthoANI (Lee et al., 2015) и EzAAI (Kim et al., 2021) соответственно. Ортологичные группы генов определяли с помощью веб-сервера OrthoVenn3 (Sun et al., 2023). Поиск потенциальных регионов профагов проводили, используя сервер PHASTER (Arndt et al., 2016). Последовательности ДНК штамма ICIS4 депонированы в базе данных GenBank (NCBI): полногеномная сборка (GCA_033100775.1), ген 16S рРНК (OR711529), отдельная кольцевая, предположительно, вирусная последовательность (OR762182).

В результате секвенирования получено 7099520 парноконцевых ридов (покрытие $243,1\times$), объединившихся в 80 контигов с общей длиной 3.32 МБ, с показателями N50 398903 и L50 4, и высоким GC-контентом (67.8%). Показатель полноты сборки по BUSCO составил 98.2%. Среди 904 референсных белков порядка

Halobacteriales 881 присутствовали в сборке в единственной копии, 6 белков были дублированы. Показатели полноты сборки (99.39) и контаминации (0.48) по CheckM (против белков семейства *Halobacteriaceae*) свидетельствуют о высоком качестве сборки генома.

В базе данных GenBank NCBI выявлена схожая (100%) последовательность *Halorubrum terrestre* JCM 10247 (NR113487) при покрытии 99%. Шесть наиболее близких по гену 16S рРНК ($\geq 99\%$) штаммов *Halorubrum* были отобраны для определения сходства геномов: *H. distributum* JCM 9100 и JCM 10118, *H. terrestre* JCM 10247, 22517 05 Cabo, 22502 06 Cabo, *H. litoreum* JCM 13561 (табл. 1).

Геном штамма ICIS4 оказался наиболее сходным с *H. litoreum* JCM 13561 по всем трем показателям: ANI (98.05%), OrthoANI (98.08%) и AAI (97.93%). Сходство с геномами других штаммов также было высоким: 97.71 и более – по данному ANI теста и 97.50 и более – по AAI, что выше общепринятого уровня видовых различий (Chun et al., 2018). Филогеномный анализ с использованием базы данных GenBank показал, что штамм ICIS4 входит в кластер вида *H. distributum* Zvyagintseva and Tarasov 1989; Oren and Ventosa 1996 (дополнительные материалы, рис. S1), к которому, согласно расширенному описанию, относятся штаммы *H. distributum* и *H. terrestre*, выделенные из засоленных почв, *H. arcis* из соленого озера и *H. litoreum* из пруда для выпаривания соли (Infante-Domínguez et al., 2020).

В геноме *H. distributum* ICIS4 с помощью PGAP было обнаружено 3340 генов, среди которых 3236 белок-кодирующих гена, 9 генов, кодирующих рРНК (3 рибосомальных оперона), 51 ген, кодирующий тРНК и 2 гена малых некодирующих РНК. Среди белок-кодирующих генов, 2454 присвоена соответствующая категория COG, 703 гена имеют классификационный номер фермента по международной иерархической классификации (EC number assignment), 24 гена имеют онтологию в базе данных GO. С помощью алгоритма BlastKOALA 1388 белок-кодирующим генам присвоена соответствующая функциональная

Таблица 1. Показатели сходства ANI, OrthoANI, AAI генома *Halorubrum distributum* ICIS4 с ближайшими гомологами

Ближайшие гомологи	Идентификационный номер генома (RefSeq)	ANI	OrthoANI	AAI
<i>H. distributum</i> JCM 9100	GCF_000337055	97.76	97.86	97.74
<i>H. distributum</i> JCM 10118	GCF_000337335	97.76	97.85	97.73
<i>H. litoreum</i> JCM 13561	GCF_000337395	98.05	98.08	97.93
<i>H. terrestre</i> JCM 10247	GCF_000337435	97.71	97.67	97.50
<i>H. terrestre</i> 22517	GCF_009856205	97.78	97.81	97.70
<i>H. terrestre</i> 22502	GCF_009856455	97.84	97.98	97.70

аннотация. Выявленные гены метаболизма углеводов свидетельствуют о возможности осуществления гликолиза, окислительного декарбоксилирования пирувата в ацетил-КоА, биосинтеза фосфорибозил-пирофосфата (PRPP), цикла трикарбоновых кислот, полуфосфорилирующего варианта пути Энтнера–Дудорова, метаболизма пропаноил-КоА, пентозобифосфатного пути дегградации нуклеотидов. Энергетический метаболизм может осуществляться с помощью сукцинатдегидрогеназы, цитохром С-оксидазы, АТФазы V/A типа. Присутствуют гены, ответственные за биосинтез аминокислот: треонина, валина, лейцина, изолейцина, орнитина, аргина, пролина, гистидина и триптофана. Обнаружены 3 гена, кодирующие родопсин, и 1 ген, кодирующий родопсин-подобный белок. Биосинтез терпеноидов представлен двумя метаболическими путями – биосинтез гемитерпена (С5) и моно- и дитерпенов (С10–С20 изопреноиды). Обнаружено 28 генов, участвующих в хемотаксисе и подвижности, в том числе гены *flaBEFGHIJK*, кодирующие синтез флагеллина архей, а также гены *cheAWCDRBY*, *mcp*, *hemAT*, ответственные за хемотаксис. В геноме найдены 8 генов секреции, а также двойной аргининовый

путь транслокации. Обнаружен ген *tlyC*, кодирующий экспортер магния и кобальта, относящийся к мембрано-повреждающим токсинам. Наряду с CRISPR-регионом Cas4, обнаружен ген Cas3, кодирующий хеликазу.

При сравнении генома *H. distributum* ICIS4 с четырьмя геномами близкородственных штаммов число уникальных белок-кодирующих генов составило 309. Однако только 11 из 2817 групп гомологичных генов оказались уникальными для штамма ICIS4; они включали гены, участвующие в транспорте калия и других катионов, отвечающие за мобильность генетических элементов и связывание гуанозинтрифосфата, а также гены с неизвестными функциями. 2392 группы ортологичных генов были общими для всех пяти штаммов данного вида, 64 – с тремя, 135 – с двумя и 214 – с одним (рис. 1).

Интересной находкой оказался контиг кольцевой ДНК (OR762182), что часто является признаком вируса или плазмиды (Grossi et al., 2016). Последовательность длиной 25290 н.п., с содержанием GC 67.5%, включала 62 предсказанных белок-кодирующих гена. Функции 59 из них неизвестны, два отвечают за метаболизм нуклеотидов,

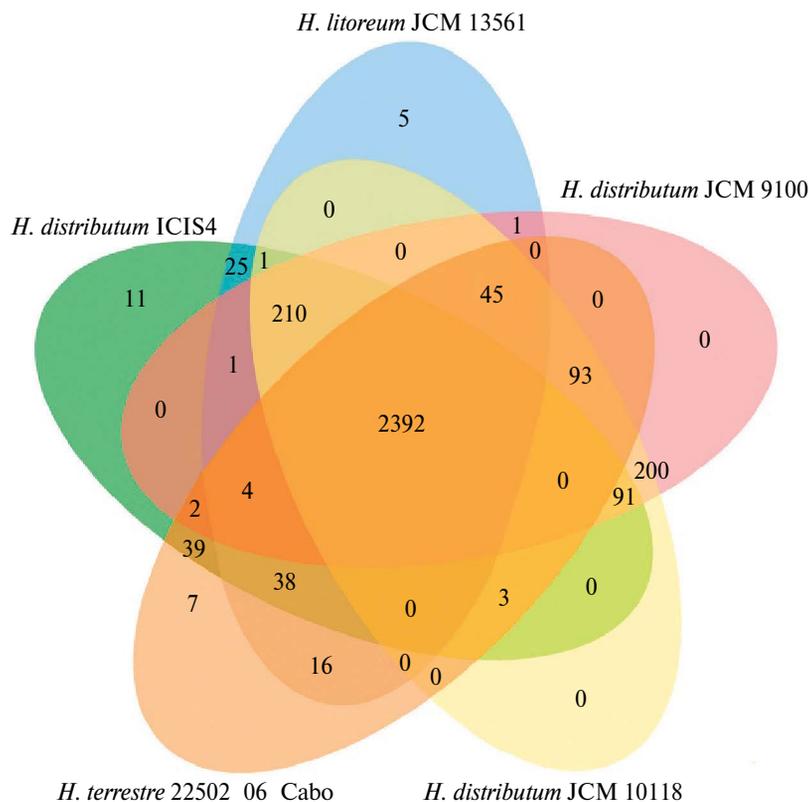


Рис. 1. Диаграмма Венна, демонстрирующая уникальные и ортологичные группы генов для геномов *H. distributum* ICIS4, *H. distributum* JCM9100 (GCA_000337055), *H. distributum* (GCF_000337335), *H. litoreum* JCM13561 (GCA_000337395), *H. terrestre* 22502 (GCA_009856455).

один – за регуляцию транскрипции. Ближайшим гомологом в базе данных Genbank (80.57% при покрытии 41%) оказался фаг МТ764234.1 галоархеи *Haloquadratum walsbyi* из гипергалинного пруда для выпаривания соли в Санта-Пола (Испания), геном которого имеет схожие размер и число генов, по большей части с неизвестными функциями (Luk et al., 2014). Хотя генов, отвечающих за внедрение, формирование структурных компонентов вируса и лизис, не обнаружено, для оценки возможности интеграции этого вероятного вируса в геном галоархеи, репродукции и влияния на регуляцию метаболизма хозяина необходимы дополнительные исследования. В геномах ближайших филогенетических родственников схожие последовательности обнаружены не были. Кроме того, в геноме *H. distributum* ICIS4 был выявлен регион длиной 12.8 т.п.н., имеющий довольно высокое сходство (86.05% при покрытии 62%) с ранее описанным вирусом *Halorubrum pleomorphic virus 9* (HRPV9) галоархеи *Halorubrum* sp. B2-2 (Atanasova et al., 2018).

Для формирования ассоциации *H. distributum* ICIS4 с микроводорослями *D. salina* могут иметь значение гены, кодирующие ферменты катаболизма глицерина (Williams et al., 2017). Из двух возможных путей деградации глицерина в геноме *H. distributum* ICIS4 представлен один, реализующийся через глицеролкиназу GlpK (2.7.1.30) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназу GlpABC (1.1.5.3). Специфической системы транспорта глицерина внутрь клетки не выявлено, однако глицерин может поступать клетку в результате диффузии (Oren, 2017). Анализ генома *H. distributum* ICIS4 выявил ферменты гидролиза и превращения других углеводов, продуцируемых водорослями, например, крахмала (ЕС: 3.2.1.20, 3.2.1.3), трегалозы (ЕС: 3.2.1.28). Обнаружены гены, формирующие полноценные пути биосинтеза витаминов: тиамин (B_1) и пиридоксаль-5-фосфата (B_6), а также гены синтеза кобаламина (B_{12}), стимулирующих рост микроводорослей (Croft et al., 2005). Обнаружены гены сидерофоров, благодаря которым микроводоросли могут получать железо в доступной форме (Amin et al., 2009). В геноме присутствуют все гены, катализирующие образование каротиноидных пигментов бактериоруберина и β -каротина из ликопина. Учитывая, что бактериоруберин обладает более выраженной антиоксидантной активностью по сравнению с β -каротином (Delgado-Garcia et al., 2023), присутствие в биомассе каротиногенной микроводоросли пигментов *H. distributum* может усиливать ее суммарную антиоксидантную активность, как это было отмечено ранее для смеси *D. parva* и *H. tebenquichense* (Немцева и соавт., 2013).

Таким образом, результаты анализа генома штамма ICIS4 подтвердили его принадлежность

к виду *H. distributum* и продемонстрировали метаболический потенциал для длительного сосуществования в ассоциации с *D. salina*. Выделенный штамм перспективен для экспериментального выявления рост-стимулирующего действия на микроводоросль *D. salina* и повышения антиоксидантного действия получаемой из данной микробной ассоциации биомассы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Культивирование, выделение ДНК и секвенирование проводили в ЦКП “Персистенция микроорганизмов” ИКВС УрО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-10062, <https://rscf.ru/project/23-24-10062/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Немцева Н. В., Селиванова Е. А., Игнатенко М. Е., Шаранова Н. В. Характеристика нового штамма *Dunaliella salina* (Chlorophyta) и оценка параметров его культивирования // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 561–568.
- Nemtseva N. V., Selivanova E. A., Ignatenko M. E., Sharapova N. V. Characterization of a novel *Dunaliella salina* (Chlorophyta) strain and the assessment of its cultivation parameters // Russ. J. Plant Physiol. 2013. V. 60. P. 529–535.
- Соловченко А. Е., Селиванова Е. А., Чеканов К. А., Сидоров Р. А., Немцева Н. В., Лобакова Е. С. Индукция вторичного каротиногенеза у новых галофильных микроводорослей из рода *Dunaliella* (Chlorophyceae) // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 1724–1730.
- Solovchenko A. E., Selivanova E. A., Chekanov K. A., Sidorov R. A., Nemtseva N. V., Lobakova E. S. Induction of secondary carotenogenesis in new halophile microalgae from the genus *Dunaliella* (Chlorophyceae) // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 1508–1513.
- Amin S. A., Green D. H., Hart M. C., Küpper F. C., Sunda W. G., Carrano C. J. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 17071–17076.
- Arndt D., Grant J., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D. S. PHASTER: a better, faster version of the

- PHAST phage search tool // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 16–21.
- Atanasova N.S., Demina T.A., Shanthi S.N.K.R., Oksanen H.M., Bamford D.H. Extremely halophilic pleomorphic archaeal virus HRPV9 extends the diversity of pleolipoviruses with integrases // *Res. Microbiol.* 2018. V. 169. P. 500–504.
- Bardavid R.E., Khristo P., Oren A. Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds // *Extremophiles.* 2008. V. 12. P. 5–14.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Cantalapiedra C.P., Hernández-Plaza A., Letunic I., Bork P., Huerta-Cepas J. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale // *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38. P. 5825–5829.
- Cao J., Ma H.Y., Li H.Y., Wang K.R., Ruan K., Bai L.H. *Halomonas socia* sp. nov., isolated from high salt culture of *Dunaliella salina* // *Extremophiles.* 2013. V. 17. P. 663–668.
- Croft M., Lawrence A., Raux-Deery E., Warren M.J., Smith A.G. Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria // *Nature.* 2005. V. 438. P. 90–93.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.-W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 461–466.
- Delgado-García M., Gómez-Secundino O., Rodríguez J.A., Mateos-Díaz J.C., Muller-Santos M., Aguilar C.N., Camacho-Ruiz R.M. Identification, antioxidant capacity, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) *in silico* inhibition of haloarchaeal carotenoids from *Natronococcus* sp. and *Halorubrum tebenquichense* // *Microorganisms.* 2023. V. 11. Art. 2344.
- Grossi R., Iliopoulos C.S., Mercas R., Pisanti N., Pissis S.P., Retha A., Vayani F. Circular sequence comparison: algorithms and applications // *Algorithms Mol. Biol.* 2016. V. 11. P. 1–14.
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. P. 1072–1075.
- Infante-Domínguez C., de la Haba R.R., Corral P., Sanchez-Porro C., Arahal D.R., Ventosa A. Genome-based analyses reveal a synonymy among *Halorubrum distributum* Zvyagintseva and Tarasov 1989; Oren and Ventosa 1996, *Halorubrum terrestre* Ventosa et al. 2004, *Halorubrum arcis* Xu et al. 2007 and *Halorubrum litoreum* Cui et al. 2007. Emended description of *Halorubrum distributum* Zvyagintseva and Tarasov 1989; Oren and Ventosa 1996 // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 1698–1705.
- 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.
- Keerthi S., Koduru U.D., Nittala S.S., Parine N.R. The heterotrophic eubacterial and archaeal co-inhabitants of the halophilic *Dunaliella salina* in solar salterns fed by Bay of Bengal along south eastern coast of India // *Saudi J. Biol. Sci.* 2018. V. 25. P. 1411–1419.
- Kim J., Na S.I., Kim D., Chun J. UBCG2: Up-to-date bacterial core genes and pipeline for phylogenomic analysis // *J. Microbiol.* 2021. V. 59. P. 609–615.
- Kim D., Park S., Chun J. Introducing EzAAI: a pipeline for high throughput calculations of prokaryotic average amino acid identity // *J. Microbiol.* 2021. V. 59. P. 476–480.
- Le Chevanton M., Garnier M., Bougaran G., Schreiber N., Lukomska E., Bérard J.B., Fouilland E., Bernard O., Cadoret J.P. Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures // *Algal Res.* 2013. V. 2. P. 212–222.
- Lee I., Kim Y.O., Park S.C., Chun J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 66. P. 1100–1103.
- Li W., O'Neill K.R., Haft D.H., DiCuccio M., Chetvernin V., Badretdin A., Coulouris G., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Durkin A.S., Gonzales N.R., Gwadz M., Lanczycki C.J., Song J.S., Thanki N., Wang J., Yamashita R.A., Yang M., Zheng C., Marchler-Bauer A., Thibaud-Nissen F. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. P. D1020–D1028.
- Luk A.W.S., Williams T.J., Erdmann S., Papke R.T., Cavicchioli R. Viruses of *Haloarchaea* // *Life.* 2014. V. 4. P. 681–715.
- Oren A. Glycerol metabolism in hypersaline environments // *Environ. Microbiol.* 2017. V. 19. P. 851–863.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., 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.
- Selivanova E., Khlopko Y., Plotnikov A. The prokaryotic diversity in cultures of halophilic phototrophic and heterotrophic protists // *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia.* 2019. V. 64. 1. P. 16838.
- Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs // *Bioinformatics.* 2015. V. 31. P. 3210–3212.
- Sun J., Lu F., Luo Y., Bie L., Xu L., Wang Y. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes // *Nucleic Acids Res.* 2023. V. 51. P. W397–W403.
- Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Computat. Biol.* 2017. V. 13. Art. e1005595.
- Williams T.J., Allen M., Tschitschko B., Cavicchioli R. Glycerol metabolism of haloarchaea // *Environ. Microbiol.* 2017. V. 19. P. 864–877.

SHORT COMMUNICATIONS

The Genome of a New *Halorubrum distributum* Strain ICIS4 Isolated from the Culture of a Microalga *Dunaliella salina***E. A. Selivanova¹*, A. S. Balkin¹, Yu. A. Khlopko¹,
V. Ya. Kataev¹, and A. O. Plotnikov¹**¹*Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of RAS,
Orenburg, 460000 Russia***e-mail: selivanova-81@mail.ru*

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

Abstract. The complete genome sequence of a new strain of the haloarchaeon *Halorubrum distributum* ICIS4 was revealed and analyzed. The strain was isolated from a culture of a carotenogenic microalga *Dunaliella salina* maintained in laboratory conditions for a long period of time. The genome (3.32 Mb) contained 3236 protein-coding genes. Of the 2817 groups of homologous genes, 11 were unique to this strain. In the genome, the genes were revealed, which were responsible for utilization of glycerol and starch and for synthesis of vitamins, pigments, and siderophores. These genes may be involved in formation and maintenance of the association with microalgae. A region similar to the HRPV9 virus and another circular contig similar to a phage of the haloarchaeon *Haloquadratum walsbyi* were revealed in the genome assembly.

Keywords: halophilic microorganisms, haloarchaea, *Halorubrum distributum*, *Dunaliella salina*, microalgae-associated prokaryotes

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ГЕНОМ НОВОГО ШТАММА *HALORUBRUM DISTRIBUTUM* ICIS4, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA*

© 2024 г. Е. А. Селиванова*, А. С. Балкин, Ю. А. Хлопко,
В. Я. Катаев, А. О. Плотников

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук,
Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук,
Оренбург, 460000 Россия

*e-mail: selivanova-81@mail.ru

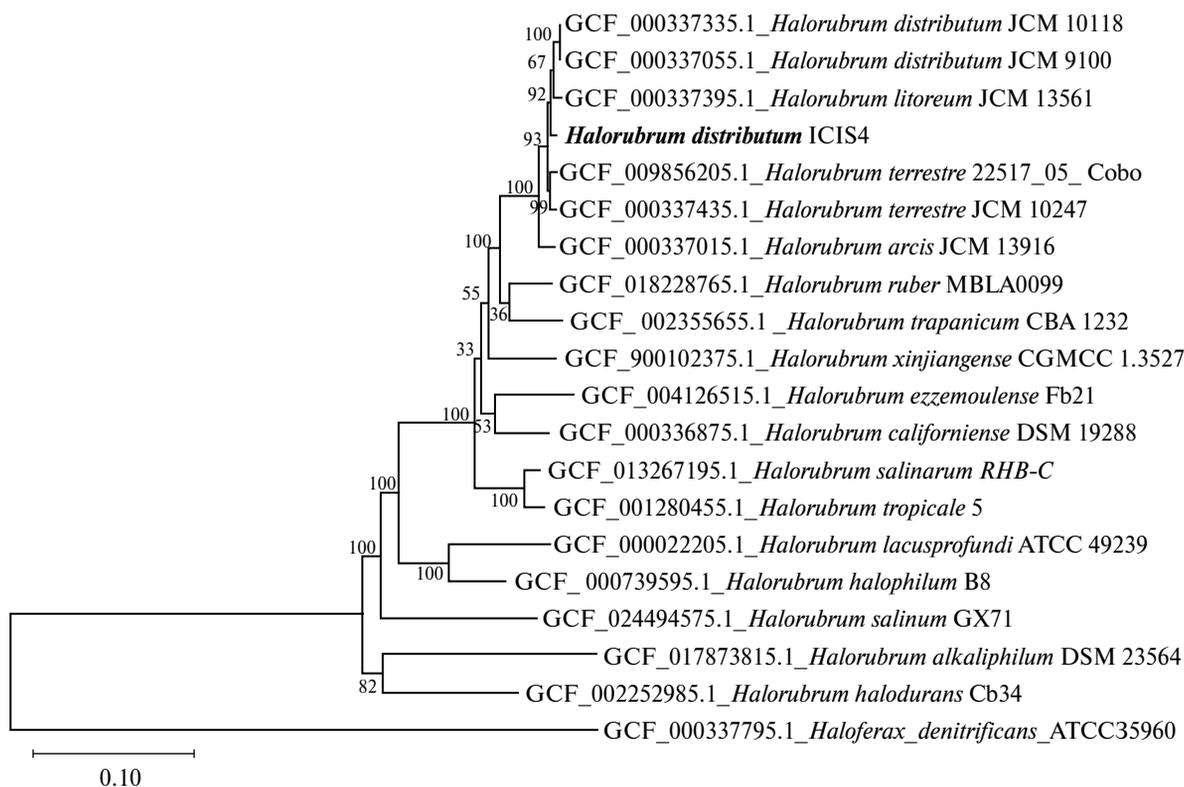


Рис. S1. Положение штамма *H. distributum* ICIS4 на филогенетическом древе, построенном методом максимального правдоподобия по результатам анализа геномов представителей рода *Halorubrum* с помощью алгоритма UBCG2 (Kim et al., 2021). Уровни поддержки узлов (gene support index, GSI) рассчитаны на основе построения 100 альтернативных генных деревьев. В качестве внешней группы использован геном *Haloferax denitrificans* ATCC35960 (GCF_000337795).

УДК 578.81+578.23

ПОИСК БАКТЕРИОФАГОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*

© 2024 г. А. Д. Новиков^а, *, И. П. Токмакова^а, А. А. Самарин^а,
К. В. Лавров^а, А. С. Яненко^а

^аНИЦ “Курчатовский институт”, Курчатовский геномный центр, 123182, Россия
*e-mail: alexm19@mail.ru

Поступила в редакцию 25.10.2023 г.

После исправления 23.12.2023 г.

Принята к опубликованию 25.12.2023 г.

Впервые были выделены бактериофаги, специфичные для *Rhodococcus aetherivorans*, и впервые была показана перспективность беспозвоночных (в частности, *Hyalophora cecropia*, *Eisenia fetida*) как объектов для скрининга фаговой флоры представителей рода *Rhodococcus*. Часть выделенных фагов была способна расти на *R. ruber* и *R. qingshengii*. Была разработана эффективная методика размножения бактериофага в жидкой культуре *R. aetherivorans*. Найденные бактериофаги могут быть использованы для разработки эффективных генетических инструментов для *Rhodococcus*, в том числе и промышленно значимых штаммов.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, бактериофаг, микробиота беспозвоночных, рекомбиназы, гесЕТ

DOI: 10.31857/S0026365624040084

Бактерии рода *Rhodococcus* обладают большим биотехнологическим потенциалом в силу их способностей к биотрансформации и биосинтезу широкого круга органических молекул, таких, как лигноцеллюлоза, акриловые мономеры, триацилглицеролы, полигидроксиалканоаты, гликолипидные биосурфактанты, стероиды (Larkin et al., 2005; Martinkova et al., 2009; Kim et al., 2018). Разработка высокоактивных промышленно-значимых штаммов этих бактерий сдерживается ограниченной доступностью методов редактирования их генома, а именно, методов введения, замены и удаления генов, фрагментов генома и отдельных нуклеотидов (см. Grechishnikova et al., 2022; Liang et al., 2021).

Одним из путей расширения арсенала таких методов является поиск новых генов, кодирующих эффективные нуклеазы, рекомбиназы, интегразы, то есть ферменты, способные направленно изменять последовательность ДНК. Богатейшим источником разнообразия таких генов являются геномы бактериофагов, поэтому обнаруживаемые в природе фаги могут быть ценным источником генетического инструментария такого рода. Для бактерий *E. coli* сегодня активно применяются методы редактирования генома, основанные на рекомбинационных системах бактериофагов (Bubnov et al., 2022). Как правило, активность

у фаговых рекомбиназ существенно выше, чем у бактериальных, что и является решающим фактором для их широкого применения. Для бактерий *Rhodococcus* такие подходы пока единичны (Liang et al., 2020), в первую очередь из-за недостатка эффективно работающих в родококках рекомбиназ. Эффективность функционирования фаговых генов в *Rhodococcus* (как и в клетках бактерий других родов) существенно зависит от оптимизированности их экспрессии, т.е. сходных с хозяином кодонных предпочтений и других особенностей. В силу этого, наиболее перспективным путем поиска новых ферментов для редактирования в *Rhodococcus* является поиск бактериофагов, способных размножаться на культурах этих бактерий. В российских и зарубежных коллекциях микроорганизмов количество таких изолятов невелико по сравнению с бактериофагами *E. coli*.

Мы провели анализ находящихся в открытом доступе геномов фагов, специфичных в отношении *Rhodococcus* (более 70), и выяснили, что лишь три генома содержат рекомбиназы RecET семейства, для которых показана функциональность в бактериях. Эти результаты указывают на то, что для расширения разнообразия рекомбиназ и выбора наиболее эффективных из них необходим поиск новых бактериофагов, специфичных в отношении *Rhodococcus*.

Целями настоящей работы были поиск в природе бактериофагов, способных размножаться на промышленно-значимых штаммах *Rhodococcus*, определение видоспецифичности изолятов и оптимизация методики выделения ДНК таких фагов, пригодной для молекулярно-биологических исследований.

В качестве бактерий-хозяев для исследования были выбраны промышленно значимые штаммы-биокатализаторы из коллекции ВКПМ *R. aetherivorans* Ac-926 (SU 1731814, 1990) и *R. aetherivorans* Ac-2610 (US 20140187818A1, 2014).

Бактерии рода *Rhodococcus* являются типичными представителями почвенной микрофлоры. Однако ряд штаммов был обнаружен в составе микробиоты кровососущих насекомых (Yassin, 2005), различных полужесткокрылых (Salcedo-Porrás et al., 2020), микробиоты тараканов (Guzman et al., 2021) и в кишечнике некоторых вредителей сельскохозяйственных культур. В связи с этим поиск штаммов проводился не только в разнообразных почвенных, компостных и водных образцах, полученных из различных природных зон, но также и в образцах экскрементов различных насекомых и иных беспозвоночных (*Hyalophora cecropia*, *Medauroidea extradentata*, *Peruphasma schultzei*, *Sungaya inexpectata*, *Eisenia fetida*).

Фаги были изолированы методом обогащения (по Summer et al., 2011). Для этого 10–15 г материала образцов смешивали с 50 мл стерильной жидкой среды LB (триптон казеиновый – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 7 г, H₂O_{дист.} – до 1 л; pH 7.0), содержащей 1% хлороформа, инкубировали 4 ч при 30°C, 300 об./мин, затем отделяли осадок центрифугированием (10 мин, 10 тыс. об./мин). Надосадочную жидкость фильтровали через 0.22 мкм шприцевой фильтр (“Merck”), затем не менее 5 мл фильтрата добавляли к 45 мл культуры *R. aetherivorans* в среде LB в логарифмической стадии роста (ОП₆₀₀ 0.6), с последующей инкубацией в течение 4 ч при 30°C без перемешивания. Далее культуру продолжали культивировать в течение ночи при 30°C, 300 об./мин. Далее добавляли хлороформ до 1% и продолжали инкубирование при тех же условиях в течение 30 мин. После инкубации отделяли бактериальную биомассу центрифугированием с последующим фильтрованием через 0.22 мкм фильтр, фильтрат использовали для дальнейшей работы. Для изоляции, получения чистых культур и наработки посевных культур бактериофагов и культур штаммов-хозяев использовали агаризованную среду LB (для получения агаризованной среды дополнительно добавлялся агар-агар, 15 г/л). Верхний агар имел следующий состав (г/л): триптон казеиновый – 10, NaCl – 5, агар-агар – 10, H₂O_{дист.} – до 1 л; pH 7.0. После автоклавирования в верхний агар добавляли 5 мМ MgSO₄ · 7H₂O, 5 мМ CaCl₂ и глюкозу до 0.04%.

Для получения негативных колоний бактериофагов из обогащенных культур 1 мл фильтрата смешивали с 1 мл расплавленного и охлажденного до 48°C верхнего агара с суспензией клеток *Rhodococcus* (конечная концентрация агар-агара в верхнем агаре 0.5%). При необходимости использовали разведение фильтрата. Чистые культуры бактериофагов получали путем неоднократной изоляции отдельной негативной колонии, ее суспендирования в фаговом буфере (10 мМ Tris·HCl с pH 7.6, 5 мМ MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% желатин), разведения и посева (не менее 3–4 “раундов” очистки).

Наибольшее разнообразие штаммов бактериофагов *R. aetherivorans* удалось обнаружить в образцах зрелых компостов из различных географических зон, а также из экскрементов гусениц и дождевых червей. Насколько нам известно, это первое сообщение о выделении бактериофагов, специфичных для *R. aetherivorans*. Кроме того, мы впервые показали, что экскременты беспозвоночных являются перспективным источником бактериофагов родококков. Из водных образцов, взятых как в морских, так и пресных биотопах, выделить бактериофаги *Rhodococcus* не удалось.

Часть чистых культур фагов были использованы для капельного теста на видоспецифичность, проводившегося, как описано ранее, (Бактериофаги, 2012) на штаммах, полученных из ВКПМ. Анализ бактериофагов, выделенных из микробиоты *Hyalophora cecropia*, показал частичную перекрестную видоспецифичность с *R. ruber* Ac-1801, *R. qingshengii* Ac-1800, *R. qingshengii* Ac-1793, но не со штаммами *R. erytropolis* и *R. rhodochrous*. Большинство из протестированных изолятов (15 изолятов) были специфичны по отношению к *R. aetherivorans* (табл. 1).

Полученные изоляты были депонированы в НБРЦ ВКПМ.

На последнем этапе нашей работы, для получения больших объемов фаголизатов с высоким титром для целей выделения ДНК для секвенирования, депонирования штаммов и закладки их в лабораторную коллекцию нами была разработана методика наработки бактериофагов с использованием жидких культур *R. aetherivorans*. Культивирование проводили в 50 мл разбавленной среды LB (г/л): триптон – 5, дрожжевой экстракт – 2.5, NaCl – 4. Колбы Эрленмейера с 50 мл среды засеивали ночной культурой *R. aetherivorans* до ОП₆₀₀ не менее 0.8, после чего заражали посевной культурой бактериофага (конечные значения титра – не менее 10⁵ БОЕ/колбу). Посевные культуры для получения больших объемов фаголизатов получали путем смыва верхнего агара фаговым буфером с последующим фильтрованием через 0.22-мкм шприцевые фильтры. Зараженную фагом культуру культивировали в термостате при 30°C без перемешивания в течение не менее 4 ч с последующим культивированием не менее 12 ч при 30°C, 300 об./мин.

Таблица 1. Оценка видоспецифичности выделенных фагов в отношении некоторых видов рода *Rhodococcus*

№ штамма	<i>R. aetherivorans</i> M33	<i>R. aetherivorans</i> Ac-2063	<i>R. ruber</i> Ac-1801	<i>R. qingshengii</i> Ac-1800	<i>R. qingshengii</i> Ac-1793	<i>R. erythropolis</i> Ac-1737	<i>R. rhodochrous</i> Ac-1572
11	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
12	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
13	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
14	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
15	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Нет	Нет	Нет	Нет
16	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
32	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
33	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
34	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
35	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
36	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
37	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Нет	Нет	Нет	Нет
38	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
39	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
C1	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
C2	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Нет	Нет	Нет	Нет
C3	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
C4	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
C5	Лизис	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Неполный лизис	Нет	Нет
C6	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Неполный лизис	Неполный лизис	Нет	Нет

Примечание. Штаммы 11–39 были выделены из различных образцов компоста; штаммы C1–C6 были выделены из экскрементов *Hyalophora cecropia*. Показаны не все выделенные штаммы.

Дополнительный цикл культивирования – 4 ч 30°C без перемешивания, с последующим культивированием не менее 4 ч при 30°C и 300 об./мин повышал выход бактериофага примерно на 10%. Далее к фаголизату добавляли хлороформ до конечной концентрации 0.1% и культивирование с перемешиванием продолжали еще 30 мин. Лизат центрифугировали при 4°C, 12000 об./мин и фильтровали через 0.22-мкм шприцевые фильтры (“Merck”). Титр бактериофагов в лизатах, приготовленных таким образом, колебался от 10⁹ до 10¹¹ БОЕ/мл (в зависимости от штамма).

Геномную ДНК бактериофагов выделяли фенольным методом, как описано в работе (Petrovski et al., 2011), со следующей модификацией: перед стадией обработки фенолом образец смешивали с равным объемом гуанидинового буфера (Тритон

X100 3%, гуанидин гидрохлорид 5%, Трис HCl pH 8.0 10 mM, ЭДТА 0.2 mM, H₂O_{dist} – до 1 л).

Геномная ДНК из найденных нами 25 новых штаммов бактериофагов *R. aetherivorans* была выделена, как описано выше. Качество препаратов геномной ДНК проверяли гель-электрофорезом, рестрикционным анализом и ПЦР. Оказалось, что препараты ДНК выглядели как гомогенная полоса с молекулярным весом около 40 т.п.н., что говорит об отсутствии значительных примесей более тяжелой хромосомной ДНК бактерий и продуктов ее деградации. При гидролизе рестриктазами ДНК бактериофагов давала характерный воспроизводимый профиль фрагментов различного веса (данные не приведены), что указывает на достаточную для молекулярно-биологических операций чистоту препарата.

Таким образом, в работе впервые были выделены бактериофаги, специфичные для *R. aetherivorans*, и впервые была показана перспективность беспозвоночных как объектов для скрининга фаговой флоры представителей рода *Rhodococcus*. Была разработана методика наработки суспензий бактериофагов с высоким титром с использованием жидких культур *R. aetherivorans*. Найденные бактериофаги могут быть использованы для разработки эффективных молекулярно-биологических инструментов для *Rhodococcus aetherivorans*, в том числе и промышленно значимых штаммов представителей этого вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику ООО «ДНК Экспертиза» Радченко В.В. и коллективу Сибирского ботанического сада ТГУ (г. Томск) за предоставленные образцы экскрементов беспозвоночных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ Курчатовский институт, при частичной поддержке Соглашения МОН 075-15-2019-1659 о создании геномных центров мирового уровня (выделение и анализ ДНК бактериофагов).

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

- Бактериофаги. Биология и практическое применение / Под ред. Э. Каттер, А.М. Сулаквелидзе. М.: Научный мир, 2012. 640 с.
- Bubnov D.M., Yuzbashev T.V., Khozov A.A., Melkina O.E., Vybornaya T.V., Stan G.B., Sineoky S.P. Robust counterselection and advanced λ Red recombineering enable markerless chromosomal integration of large heterologous constructs // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. P. 8947–8960.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac649>
- Grechishnikova E.G., Shemyakina A.O., Novikov A.D., Lavrov K.V., Yanenko A.S. *Rhodococcus*: sequences of genetic parts, analysis of their functionality, and development prospects as a molecular biology platform // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2023. V. 43. P. 835–850.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2091976>
- Guzman J., Vilcinskis A. Draft genome sequence of *Rhodococcus rhodochrous* strain G38GP, isolated from the Madagascar hissing cockroach // *Microbiol. Resour. Announc.* 2021. V. 10. Art. e0077721.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00777-21>
- Kim D., Choi K.Y., Yoo M., Zylstra G.J., Kim E. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 28. P. 1037–1051.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017>
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. V. 16. P. 282–290.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.04.007>
- Liang Y., Jiao S., Wang M., Yu H., Shen Z. A CRISPR/Cas9-based genome editing system for *Rhodococcus ruber* TH // *Metab. Engin.* 2020. V. 57. P. 13–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.10.003>
- Liang Y.X., Yu H.M. Genetic toolkits for engineering *Rhodococcus* species with versatile applications // *Biotechnol. Adv.* 2021. V. 49. Art. 107748.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107748>
- Martinkova L., Uhnakova B., Patek M., Nesvera J., Kren V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* // *Environ. Int.* 2009. V. 35. P. 162–177.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>
- Salcedo-Porras N., Umana-Diaz C., de Oliveira Barbosa Bitencourt R., Lowenberger C. The role of bacterial symbionts in triatomines: an evolutionary perspective // *Microorganisms.* 2020. V. 8. Art. 1438.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091438>
- Summer E.J., Liu M., Gill J.J., Grant M., Chan-Cortes T.N., Ferguson L., Janes C., Lange K., Bertoli M., Moore C., Orchard R.C., Cohen N.D., Young R. Genomic and functional analyses of *Rhodococcus equi* phages ReqiPepу6, ReqiPoco6, ReqiPine5, and ReqiDocB7 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 669–683.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01952-10>
- Yassin A.F. *Rhodococcus triatomae* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 1575–1579.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63571-0>
- Патент СССР. 1990. № SU1731814.
 Патент США. 2014. № US20140187818A1.

SHORT COMMUNICATIONS

**Search for Bacteriophages Specific against Members
of the Genus *Rhodococcus*****A. D. Novikov^{1, *}, I. P. Tokmakova¹, A. A. Samarin¹, K. V. Lavrov¹, and A. S. Yanenko¹**¹*NRC "Kurchatov Institute", Kurchatov Genomic Center, 123182 Russia***e-mail: alexm19@mail.ru*

Received October 25, 2023; revised December 23, 2023; accepted December 25, 2023

Abstract. This is the first report on the isolation of *Rhodococcus aetherivorans*-specific bacteriophages and of applicability of such invertebrates as *Hyalophora cecropia* and *Eisenia fetida* as objects for screening the phage microflora of *Rhodococcus* species. Some of the isolated phages were capable of growth of *R. ruber* and *R. qingshengii*. An efficient procedure for bacteriophage reproduction in the liquid culture of *R. aetherivorans* was developed. The revealed bacteriophages may be used for development of efficient genetic tools for *Rhodococcus* strains, including the industrially significant ones.

Keywords: *Rhodococcus*, bacteriophage, invertebrate microbiota, recombinases, recET

УДК 577.337+579.258

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ВНЕШНЕЙ ЦЕПИ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ БЕЗМЕМБРАННОГО ТИПА НА ДЕСТРУКЦИЮ ИМИДАКЛОПРИДА И ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ ГЕНОВ *MtrB* И ПЕРОКСИДАЗ *DuP*-ТИПА

© 2024 г. А. А. Самков^{а, *}, С. М. Самкова^а, М. Н. Круглова^а

^аФГБОУ ВО “Кубанский государственный университет”, Краснодар, 350040, Россия

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После исправления 10.11.2023 г.

Принята к опубликованию 14.11.2023 г.

Деструкция имидаклоприда микрофлорой донных отложений была кратно выше контроля во всех вариантах, где имелся углеродный войлок, возрастая до $84.0 \pm 1.7\%$ при полярном подключении внешнего источника напряжения 1.2 В. При внесении *Shewanella oneidensis* MR-1 наблюдалась почти полная деградация поллютанта, в случае контроля без электродов равная $29.7 \pm 6.0\%$. Относительная представленность генов трансмембранного белка дыхательной цепи *MtrB*, связанного с экзоэлектрогенезом, зависела от внешней цепи и имела максимальное значение при полярном подключении источника напряжения, коррелируя с деградацией пестицида автохтонной микрофлорой, аналогично генам *DuP*. Внесение *S. oneidensis* MR-1 вызвало почти десятикратный рост относительной представленности *DuP*. При этом для всех опытных вариантов отмечены кратно более высокие, по сравнению с контролем без углеродного войлока, значения показателя *DuP*, как и в случае прироста деструкции имидаклоприда в данных экспериментальных условиях.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, биоэлектрокатализ, биодегградация, краситель-обесцвечивающие *DuP* пероксидазы, перенос электронов, экзоэлектрогенез, имидаклоприд, *MtrB*, пестицид, *Shewanella oneidensis* MR-1

DOI: 10.31857/S0026365624040096

Применение биоэлектрохимических систем в экологической биотехнологии представляет собой перспективное направление, реализующее новые механизмы взаимодействия с микробными сообществами (Mohanakrishna et al., 2020; Cabrera et al., 2021; Wang et al., 2021; Lan et al., 2023). Активизация катаболической активности анаэробных микробиоценозов, при размещении там проводящих материалов, связана с формированием и увеличением эффективности путей межвидовой передачи электронов. Например, при одноэлектродной модели, когда единый углеродный проводник был размещен в анаэробной зоне, отмечалось возрастание продукции водорода и метана, благодаря интенсификации прямого транспорта электронов в синтрофных ассоциациях ацетогенных бактерий и метаногенов (Ножевникова и соавт., 2020; Laikova et al., 2023). При наличии двух электродов, один из которых размещен в аэробной зоне и осуществляет катодные полуреакции, а другой находится в анаэробной зоне, возможно формирование сложного

сообщества, в итоге передающего на анод электрон, который покидает анаэробную зону по внешней электрической цепи (Kiely et al., 2011), что является искусственным аналогом работы “бактериальных кабелей” из трихомов *Desulfobulbaceae* и подобных (Yuan et al., 2021). В этой ситуации для общей катаболической активности микробиоценоза возрастает важность конечного звена анаэробной цепи межвидовой передачи электронов, способного эффективно передавать электрон на внешний акцептор, например, представителей рода *Shewanella* (Voeikova et al., 2013) и других микроорганизмов, участвующих в формировании “биоэлектрохимических трубопроводов” (Marzocchi et al., 2020). Большой интерес представляет собой использование внешней электрической стимуляции цепи биоэлектрохимической системы. При воздействии внешнего напряжения 1.2 В было отмечено изменение состава микробиоценоза: происходила стимуляция бродильщиков и гидротрофных метаногенов с увеличением выделения метана в 8.6 раза

(Zhi et al., 2022). При воздействии внешнего источника напряжения в биоэлектрохимической системе мембранного типа на чистую культуру *Shewanella oneidensis* MR-1, обесцвечивающую различные красители, было отмечено влияние полярности подключения внешнего источника и разности потенциалов на удельную скорость реакции (Самков и соавт., 2023). Данный микроорганизм хорошо изучен в части строения и работы дыхательной цепи, обеспечивающей экзоэлектрогенез и содержащей, в том числе мембранный комплекс MtrB-MtrC-OmcA, на который электрон передается с СумА цитохромом MtrA (Shi et al., 2012). Представители *Shewanellaceae* способны к непосредственному участию в биодegradационных процессах, как это было продемонстрировано для штамма *S. oneidensis* MR-1, использующего краситель-обесцвечивающие пероксидазы ДуР-типа в биодеструкционных процессах (Xiao et al., 2012; Самков и соавт., 2023) и при этом участвующего в переносе электронов на анод. Таким образом, наличие в донных отложениях водоемов микроорганизмов, способных к экзоэлектрогенезу, может оказывать влияние на сопряжение электрохимических процессов на электроде и биодegradации органических субстратов.

В связи с интенсивным развитием сельского хозяйства одним из актуальных вызовов является накопление разнообразных пестицидов, в том числе имидаклоприда из ряда неоникотиноидов, который из-за аккумуляции в природных средах и токсического действия на нецелевые организмы представляет значительную проблему (Zhang et al., 2023), при этом лидируя по мировым продажам среди других инсектицидов. Известно, что данный пестицид весьма устойчив и крайне медленно подвергается биодegradации в естественных микробиоценозах (Sabourmoghaddam et al., 2015; Gautam et al., 2022). Коррелирующие с биодegradацией имидаклоприда ферменты отличаются значительным разнообразием. В частности, для *Rhodospseudomonas capsulata* при дegradации имидаклоприда был отмечен рост экспрессии генов цитохром 450 монооксигеназы (Wu et al., 2020). Для *Agrobacterium* sp. InxBP2 с биодegradацией пестицида была предположена связь ферментов семейств амидогидралаз и монооксигеназ, в том числе нитратмонооксигеназ и других (Gautam et al., 2023). Известны недавние работы, посвященные исследованиям биодegradации ксенобактерии в биоэлектрохимических системах. В работе (Li et al. 2023) было показано, что в безмембранной биоэлектрохимической системе, с размещением подключенных к источнику тока и напряжения электродов в одной камере, при биодegradации имидаклоприда смешанной культурой возрастает доля протеобактерий, а также копияность целого ряда ферментов катаболических путей (Li et al., 2023). Наконец, для ряда организмов было обнаружено

участие в биотрансформации имидаклоприда пероксидаз (Zhu et al., 2023).

Целью работы служило исследование биодegradации имидаклоприда в донных отложениях при электрической стимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы, с учетом относительной представленности генов MtrB — одного из ключевых элементов дыхательной цепи шewanелл, связанного с экзоэлектрогенезом, и генов краситель-обесцвечивающих пероксидаз ДуР-типа, широко распространенных среди протеобактерий и потенциально связанных с различными катаболическими процессами. Сравнение результатов для автохтонной микрофлоры донных отложений и в случае дополнительного внесения *Shewanella oneidensis* MR-1 призвано выяснить роль экзоэлектрогенных микроорганизмов в биоэлектрохимической стимуляции дegradации неоникотиноида в сложном сообществе.

В донные отложения (ил) пресного водоема (оз. Карасунское, г. Краснодар) с общим содержанием гетеротрофных микроорганизмов 8×10^7 КОЕ/мл, в тотальной ДНК из которых, с использованием вырожденных праймеров (F 5'-GAYCTGTGCTTYGARCTSGC-3', R 5'-ASCCGATRAARTASGTGCC-3') (Tian et al., 2016), предварительно был обнаружен максимально высокий из исследованных уровень относительной (к генам 16s рНК, праймеры 27F, 805R) представленности генов ДуР, вносили имидаклоприд до конечной концентрации 40 мг/л. Ил размещали в емкостях слоем высотой 5 см, сверху поддерживали слой воды 2 см. На дне сосуда предварительно размещали анод из углеродного войлока НТМ-200М толщиной 4 мм, а в слое воды — аналогичный катод. К электродам подключали внешнюю цепь: пассивное сопротивление (резистор 1 кОм), либо заряженный до напряжения 1.2 В, ионистор с прямой полярностью подключения (отрицательный полюс подключен к аноду биоэлектрохимической системы, “ионистор “+””), либо аналогичный ионистор с обратной полярностью подключения (положительный полюс к аноду, “ионистор “-””). В контролях отсутствовали оба электрода. При отсутствии резистора или ионистора цепь являлась разомкнутой. Параллельно был подготовлена аналогичная серия экспериментов, отличающаяся внесением в ил клеток штамма *Shewanella oneidensis* MR-1, полученного из ВКМ, до титра 5×10^6 кл./мл. После инкубации в течение 45 сут в донных отложениях методом ВЭЖХ определяли концентрацию остаточного имидаклоприда, процентные доли деструкции которого от исходного количества приведены на рис. 1.

В течение эксперимента ионисторы, по мере разрядки менее 1 В, заряжали до 1.2 В. Отмечена значительно более быстрая разрядка ионистора, подключенного с обратной полярностью. Высокие

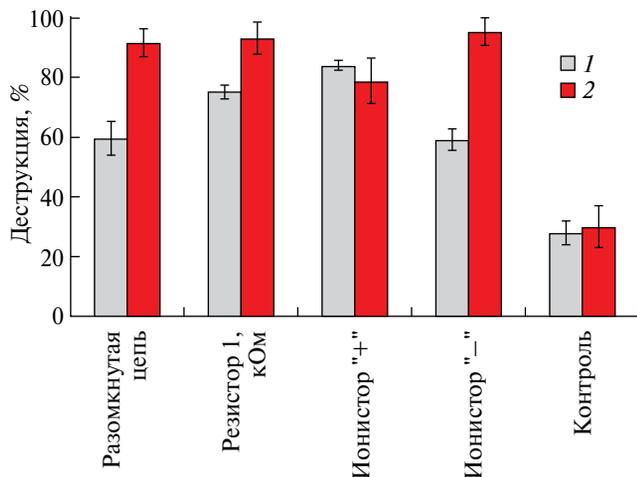


Рис. 1. Влияние способа электростимуляции внешней цепи биоэлектрохимической системы и внесения *Shewanella oneidensis* MR-1 на биодegradацию имидаклоприда в донных отложениях. 1 – автохтонная микрофлора; 2 – автохтонная микрофлора и *S. oneidensis* MR-1.

значения напряжения для вариантов “разомкнутая цепь” и “резистор 1 кОм”, не связанных с искусственными источниками напряжения, показали отсутствие токсического действия данной концентрации пестицида на электрогенную микробиоту, обычно выражающегося в значительном снижении электрогенеза (Lu et al., 2020). Влияние внешней электростимуляции проявлялось в вариантах опыта с автохтонной микрофлорой, присутствовавшей в донных отложениях. Максимальное значение деструкции было отмечено для варианта, где был подключен ионистор с прямой полярностью подключения (ионистор “+”) – $84.0 \pm 1.7\%$. Минимальные значения отмечены для разомкнутой цепи и ионистора с обратной полярностью подключения: 59.4 ± 5.7 и $59.0 \pm 3.5\%$ соответственно. В случае внесения клеток штамма *Shewanella oneidensis* MR-1 отмечено значительное возрастание показателя, варьировавшего в пределах 78.8 ± 7.7 – $95.2 \pm 4.6\%$, при этом ключевым для деструкции являлось наличие электропроводящего углеродного войлока, а отличия между вариантами опыта, различающимися внешней цепью, были незначительными. В контроле показатели деструкции были минимальными (27.7 ± 4.0 – $29.7 \pm 6.0\%$) и не зависели от внесения шеванеллы.

Из материала анода и прилегающего к нему ила выделяли ДНК, в которой методом ПЦР в реальном времени определяли относительную представленность гена *mtrB* трансмембранного белка дыхательной цепи MtrB (праймеры F 5'-AAACTCAAGGGTGATCGTTG и R 5'-TGGTTTCACGGTCTTGATAA), связанного с экзоэлектрогенезом, а также генов

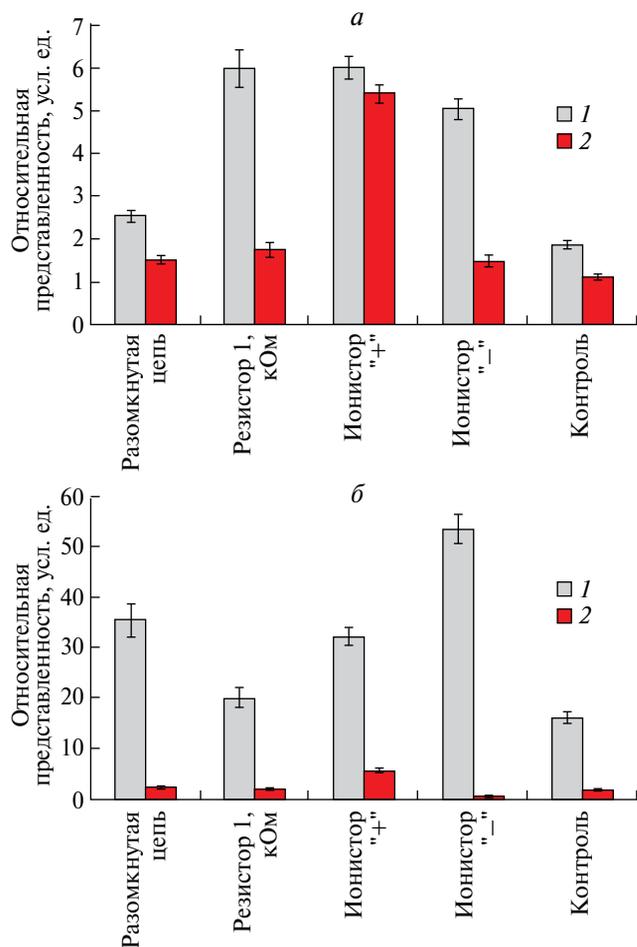


Рис. 2. Относительная представленность генов краситель-обесцвечивающих пероксидаз ДуР-типа и трансмембранного белка дыхательной цепи MtrB в случае автохтонной микрофлоры донных отложений (а) и автохтонной микрофлоры донных отложений, куда дополнительно внесли *Shewanella oneidensis* MR-1 (б). 1 – ДуР; 2 – MtrB.

краситель-обесцвечивающих пероксидаз ДуР-типа. Для получения стандартных кривых и определения эффективности ПЦР реакции проводили с серией десятикратных разбавлений ДНК, выделенной из клеточной биомассы *S. oneidensis* MR-1 с праймерами к генам *mtrB*, ДуР и 16s рРНК. Эффективность ПЦР при использованных параметрах реакции составила 1.91, 1.87 и 1.99 для генов *mtrB*, ДуР и 16s рРНК соответственно. Относительную представленность выражали как отношение эффективностей референсного гена (16s рРНК) к целевому в степенях соответствующих количественных циклов (Yuan et al., 2006). Результаты оценки относительной представленности исследуемых генов приведены на рис. 2.

В случае автохтонной микрофлоры донных отложений сравнение деструкции со значениями относительной представленности генов

краситель-обесцвечивающих пероксидаз ДуР-типа и трансмембранного белка дыхательной цепи MtrB показало значительную корреляцию показателей. Максимальные значения для генов MtrB и ДуР составили 5.38 ± 0.22 и 6.00 ± 0.26 усл. ед. соответственно и были отмечены для варианта цепи “ионистор “+””. В случае ДуР показатель для вариантов “резистор 1 кОм” и “ионистор “-”” отличался от максимального незначительно, в целом сохраняя корреляцию с соответствующими значениями деструкции имидаклоприда. Напротив, в случае белка дыхательной системы MtrB, для варианта с максимальной деструкцией было отмечено значительное превышение показателя относительной представленности по отношению к остальным вариантам, варьировавшим в диапазоне 1.47 ± 0.1 (ионистор “-”) – 1.74 ± 0.17 (резистор 1 кОм).

При внесении *S. oneidensis* MR-1 отмечено сохранение зависимости показателя MtrB от внешней цепи – максимальное значение показателя сохранялось для варианта “ионистор “+”” и составило 5.46 ± 0.39 . При этом значения не коррелировали со степенью деструкции имидаклоприда. В случае же ДуР происходило практически десятикратное возрастание показателей, величины варьировали от 19.84 ± 1.76 (резистор 1 кОм) до 53.41 ± 2.88 (ионистор “-”), значения зависели от цепи сходным с показателями деструкции образом, с доминированием последнего варианта.

Предположена связь катаболических путей микроорганизмов, использующих пероксидазы ДуР-типа, с биодegradацией имидаклоприда в условиях микробиоценоза донных отложений, поскольку наблюдавшаяся корреляция представленности ДуР с деструкцией сохранялась как в случае автохтонной микрофлоры, где присутствие генов было подтверждено экспериментально, так и при внесении культуры *S. oneidensis* MR-1, имеющей их в геноме каждой клетки. Это согласуется с данными о вовлечении внеклеточных пероксидаз в деструкцию имидаклоприда (Zhu et al., 2023). Роль дыхательной цепи экзоэлектrogenных микроорганизмов в сопряжении катаболизма поллютантов и электрохимических реакций на электродах биоэлектрохимической системы может быть связана с недавно открытой способностью шеванелл к двустороннему переносу электронов через свою дыхательную цепь, что обеспечивало возможность восстановительной трансформации субстратов электронами, поступающими от внешнего электрода через мембранный комплекс MtrB–MtrC–OmcA (Li Y. et al., 2023). Относительно отсутствия прироста представленности *mtrB* при внесении шеванеллы на фоне роста деструкции имидаклоприда можно отметить, что для восстановительной трансформации ряда поллютантов *S. oneidensis* MR-1 способна использовать, помимо дыхательного пути

Mtr, альтернативные: в частности, NfnB (Wang et al., 2020). Увеличение биодegradации пестицида по сравнению с контролем без углеродного войлока, отмеченное как для аборигенного сообщества, так и в еще более выраженной мере при внесении *S. oneidensis* MR-1, согласуется с данными о возможности усиления синтрофных взаимодействий за счет прямого транспорта электронов при наличии в анаэробной среде электропроводящих материалов, обеспечивающих межвидовой перенос заряда (Ножевникова и соавт., 2020).

Таким образом, усиление дegradации имидаклоприда в донных отложениях аборигенной микрофлорой зависело от электрической стимуляции внешней цепи, а при обогащении клетками *S. oneidensis* MR-1 определялось наличием электропроводящего анода. Изменения относительной представленности генов краситель-обесцвечивающих пероксидаз ДуР-типа, а также трансмембранного белка дыхательной цепи шеванелл MtrB, были разными в случае экспериментов с автохтонной микрофлорой донных отложений и при добавлении клеток *S. oneidensis* MR-1. Относительная представленность генов трансмембранного белка дыхательной системы шеванелл MtrB во всех случаях зависела от внешней цепи, показав наибольший показатель в случае варианта “ионистор “+””, а для вариантов опытов с аборигенной микрофлорой также коррелировала с дegradацией пестицида. Значительное возрастание представленности генов краситель-обесцвечивающих пероксидаз ДуР-типа происходило при внесении *S. oneidensis* MR-1, сопровождаясь, при наличии в донных отложениях электропроводящего материала анода, практически полной дegradацией имидаклоприда. Можно предположить механизм сопряжения электрохимических реакций на аноде и биодеструкционных процессов в толще донных отложений за счет способности дыхательных систем шеванелл к двустороннему переносу электронов на анод и обратно, в зависимости от приложенной к системе разности потенциала, либо за счет использования электропроводящего материала анода, независимо от внешней цепи, для передачи заряда в стимулируемом микробном сообществе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

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

- Ножневникова А.Н., Русскова Ю.И., Литти Ю.В., Паршина 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 Yu.I., Litti Yu.V., Parshina S.N., Zhuravleva E.A., Nikitina A.A. Syntrophy and interspecies electron transfer in methanogenic microbial communities // Microbiology (Moscow). V. 89. P. 129–148.
- 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 биоэлектрохимической системе при иммобилизации клеток *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. V. 59. P. 198–206.
- 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.
- Gautam P., Dubey S.K. Biodegradation of imidacloprid: molecular and kinetic analysis // Bioresour. Technol. 2022. V. 350. Art. 126915.
- Gautam P., Pandey A.K., Dubey S.K. Multi-omics approach reveals elevated potential of bacteria for biodegradation of imidacloprid // Environ. Res. 2023. V. 221. Art. 115271.
- Kiely P.D., Regan J.M., Logan B.E. The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. P. 378–385.
- Laikova A.A., Kovalev A.A., Kovalev D.A., Zhuravleva E.A., Shekhurdina S.V., Loiko N.G., Litti Yu.V. Feasibility of successive hydrogen and methane production in a single-reactor configuration of batch anaerobic digestion through bioaugmentation and stimulation of hydrogenase activity and direct interspecies electron transfer // Int. J. Hydrog. Energy. 2023. V. 48. P. 12646–12660.
- 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.
- Lu H., Yua Y., Xi H., Wang C., Zhou Y. Bacterial response to formaldehyde in an MFC toxicity sensor // Enzyme Microb. Technol. 2020. V. 140. Art. 109565.
- Li X., Fan S., Zhang Y., Li D., Su C., Qi Z., Liang H., Gao S., Chen M. Performance and microbial metabolic mechanism of imidacloprid removal in a microbial electrolysis cell-integrated adsorption biological coupling system // Bioresour. Technol. 2023. V. 386. Art. 129513.
- Li Y., Qiao S., Guo M., Hou C., Wang J., Yu C., Zhou J., Quan X. Microbial electrosynthetic nitrate reduction to ammonia by reversing the typical electron transfer pathway in *Shewanella oneidensis* // Cell Rep. Phys. Sci. 2023. V. 4. Art. 101433.
- 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.
- Mohanakrishna G., Al-Raoush R.I., Abu-Reesh I.M. Sewage enhanced bioelectrochemical degradation of petroleum hydrocarbons in soil environment through bioelectrostimulation // Biotechnol. Rep. 2020. V. 27. Art. e00478.
- Sabourmoghaddam N., Zakaria M.P., Dzolkhifli O. Evidence for the microbial degradation of imidacloprid in soils of Cameron Highlands // J. Saudi Soc. Agric. Sci. 2015. V. 14. P. 182–188.
- Shi L., Rosso K.M., Clarke T.A., Richardson D.J., Zachara J.M., Fredrickson J.K. Molecular underpinnings of Fe (III) oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 // Front. Microbiol. 2012. V. 3. Art. 50. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00050>
- Tian J.-H., Pourcher A.-M., Klingelschmitt F., Le Roux S., Peu P. Class P dye-decolorizing peroxidase gene: degenerated primers design and phylogenetic analysis // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 130. P. 148–153.
- Voeikova 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., Debatov 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., Xing L., Zhang H., Gui C., Jin S., Lin H., Li Q., Cheng Ch. Key factors to enhance soil remediation by bioelectrochemical systems (BESs): a review // Chem. Eng. J. 2021. V. 419. Art. 129600.
- Wang H., Zhao H.-P., Zhu L. Structures of nitroaromatic compounds induce *Shewanella oneidensis* MR-1 to adopt different electron transport pathways to reduce the contaminants // J. Hazard. Mater. 2020. V. 384. Art. 121495.
- Wu P., Zhang X., Niu T., Wang Y., Liu R., Zhang Y. The imidacloprid remediation, soil fertility enhancement and microbial community change in soil by *Rhodospseudomonas capsulate* using effluent as carbon source // Environ. Pollut. 2020. V. 267. Art. 114254.

- Xiao X., Xu C.-C., Wu Y.-M., Cai P.-J., Li W.-W., Du D.-L., Yu H.-Q. Biodecolorization of Naphthol Green B dye by *Shewanella oneidensis* MR-1 under anaerobic conditions // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 110. P. 86–90.
- Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N. Jr. Statistical analysis of real-time PCR data // *BMC Bioinform.* 2006. V. 7. Art. 85.
- Yuan Y., Zhou L., Hou R., Wang Y., Zhou S. Centimeter-long microbial electron transport for bioremediation applications // *Trends Biotechnol.* 2021. V. 39. P. 181–193.
- Zhang X., Huang Y., Chen W.-J., Wu S., Lei Q., Zhou Z., Zhang We., Mishra S., Bhatt P., Chen S. Environmental occurrence, toxicity concerns, and biodegradation of neonicotinoid insecticides // *Environ. Res.* 2023. V. 218. Art. 114953.
- Zhi Z., Pan Y., Lu X., Wang J., Zhen G. Bioelectrochemical regulation accelerates biomethane production from waste activated sludge: focusing on operational performance and microbial community // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 814. Art. 152736.
- Zhu S., Chen A., Chai Y., Cao R., Zeng J., Bai M., Peng L., Shao J., Wang X. Extracellular enzyme mediated biotransformation of imidacloprid by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: mechanisms, pathways, and toxicity // *Chem. Eng. J.* 2023. V. 472. Art. 144798.

SHORT COMMUNICATIONS

Effect of Electrical Stimulation of the External Circuit of Membraneless Bioelectrochemical Systems on Imidacloprid Degradation and Representation of the *mtrB* and DyP-Type Peroxidases Genes

A. A. Samkov^{1, *}, S. M. Samkova¹, and M. N. Kruglova¹

¹Kuban State University, 350040, Krasnodar Russia
*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Received October 16, 2023; revised November 10, 2023; accepted November 14, 2023

Abstract. In all variants where carbon felt was present, imidacloprid degradation by the microflora of bottom sediments was many times higher than in the control, reaching $84.0 \pm 1.7\%$ under the polar connection of an external voltage source (1.2 V). When *Shewanella oneidensis* MR-1 was introduced, almost complete degradation of the pollutant was observed, while in the control without electrodes, it was 29.7 ± 6.0 . The relative representation of the genes of the MtrB transmembrane protein of the respiratory chain, which is associated with exoelectrogenesis, depended on the external chain and had a maximum value when the voltage source was connected polarly, correlating with the pesticide degradation by the autochthonous microflora, similar to the DyP-type peroxidase genes. The introduction of *S. oneidensis* MR-1 resulted in an almost tenfold increase in the relative representation of DyP-type peroxidase genes. In all experimental variants, the values of the DyP relative representation were significantly higher than in the control without carbon felt, as well as the degree of imidacloprid degradation under these experimental conditions.

Keywords: bioelectrochemical system, bioelectrocatalysis, biodegradation, dye-decolorizing DyP peroxidases, electron transfer, exoelectrogenesis, imidacloprid, MtrB, pesticide, *Shewanella oneidensis* MR-1

УДК 579.222+576.524

СВЯЗЬ МЕТАБОЛИЗМА ГЕКСУРОНАТОВ СО СПОСОБНОСТЬЮ *ESCHERICHIA COLI* К АДГЕЗИИ И ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК

© 2024 г. Т. А. Бессонова^{a,*}, У. Д. Кузнецова^b, А. Т. Магкаев^c, М. С. Гельфанд^{d, e},
О. Н. Озолинь^a, М. Н. Тутукина^{a, d, e}

^aИнститут биофизики клетки РАН (ФИЦ ПНЦБИ РАН), Пущино, 142290, Россия

^bРНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997, Россия

^cНИУ “Высшая школа экономики”, Москва, 117418, Россия

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

^eИнститут проблем передачи информации РАН, Москва, 127051, Россия

*e-mail: tatianabessonova66@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 08.12.2023 г.

Формирование бактериальных биопленок является важным фактором развития хронических инфекционных заболеваний, требующим поиска эффективных путей сдерживания этого процесса. Установлено, что гексуронаты, являющиеся компонентами пектинов, не влияют на формирование биопленок пробиотическим штаммом *Escherichia coli* Nissle 1917 и его адгезивные свойства, но снижают эффективность формирования биопленок штаммом *E. coli* K-12 MG1655, усиливая его адгезию к клеткам кишечной карциномы человека. Показано, что регуляторы метаболизма гексуронатов UxuR и YjjM вовлечены, наряду с cAMP-CRP, в контроль подвижности, адгезии и формирования биопленок *E. coli* K-12 MG1655. Важную роль также играют закодированные в гене *uxiR* нетранслируемые РНК, которые ингибируют транскрипцию с гена основного σ -фактора подвижности.

Ключевые слова: биопленки, адгезия, *Escherichia coli* K-12 MG1655, Nissle 1917, метаболизм гексуронатов, UxuR, YjjM (LgoR)

DOI: 10.31857/S0026365624040107

Формирование биопленок делает бактериальные клетки более защищенными от внешних факторов, что в случае патогенных бактерий приводит к развитию хронических заболеваний, трудно поддающихся антибиотикотерапии. Так, например, активно образующие биопленки уропатогенные штаммы *Escherichia coli* являются причиной развития 80% инфекций мочеполового тракта (Kareg et al., 2004). При этом, хотя *E. coli* является самой изученной бактерией, мы все еще не понимаем, что запускает процесс формирования биопленок. Для их развития *E. coli* должна обладать способностью не только к адгезии, но и к подвижности, обеспечивающей доступ к поверхностям (Wood et al., 2006). Транскрипция всех генов, кодирующих белки, вовлеченные в процессы подвижности, находится под контролем сигма-фактора подвижности FliA (RpoF, σ^{28}) (Bertin et al., 1994). В регуляции образования биопленок часто задействован сигма-фактор стационарной фазы

(RpoS, σ^{38}), а также белок CsgD, контролирующий экспрессию генов белков, участвующих в сборке завитков (curli-пили), транспорте и синтезе структурных компонентов биопленки (Hammar et al., 1996). Усиленная подвижность, напротив, мешает колонизации, а адгезия бактерий к поверхности является важным начальным этапом образования биопленки, дальнейшее развитие которой зависит совсем от других факторов. За синтез фимбрий отвечают белки FliC и FliD, и при удалении их генов, как и генов белков-адгезинов (*fimA*, *fimI*, *csgBA*), происходит сильное угнетение роста биопленок *E. coli* (Pratt, Kolter, 1998). В переключении образа жизни бактерий от планктонного к биопленке могут быть задействованы метаболические регуляторы, например, CsrA (Jackson et al., 2002), CRP (Jackson et al., 2002b), BssS (YceP) и BssR (YliH) (Domka et al., 2006), и нетранслируемые РНК CsrB и CsrC, модулирующие функционирование CsrA (Gudapaty et al., 2001).

Важным фактором адгезии бактериальных клеток к различным поверхностям является присутствие тех или иных метаболитов. Например, D-манноза снижает образование биопленок *E. coli* K-12 MG1655, вероятно, за счет ее связывания с пилиями первого типа и блокировки адгезии к эпителиальным клеткам (Rodrigues et al., 2009). Клинические исследования показали, что прием D-маннозы и повышение ее уровня в моче снижают частоту инфекций мочевыводящих путей (Mehta et al., 2018). На исход заболеваний, вызываемых *E. coli* и *Citrobacter rodentium*, влияет доступность сахаров пектина – гексуронатов – в рационе (Jimenez et al., 2019).

У *E. coli* гексуронаты, D-галактуронат и его оптический изомер D-глюкуронат, метаболизируются до 2-кето-3-деоксиглюконата через шунт Эшвелла, а затем до пирувата по пути Энтнера–Дудорова (Peekhaus, Conway 1998). Способность к их утилизации играет важную роль в колонизации *E. coli* организмов млекопитающих (Peekhaus, Conway 1998; Fabich et al., 2008). Мутации в генах, кодирующих ключевые ферменты превращения галактуроната, приводят к снижению эффективности колонизации кишечника мыши (Fabich et al., 2008), что было подтверждено в более позднем исследовании (Jimenez et al., 2019).

Транскрипция генов всех ферментов и транспортеров пути Эшвелла контролируется белком UxuR, который может образовывать гетеродимеры с EhuR; в регуляцию также вовлечены YjjM и cAMP-CRP (Suvorova et al., 2011; Tutukina et al., 2016). Интересно, что с гена *ixuR*, помимо основного белкового продукта, синтезируются РНК, способные ингибировать *flhA* (Tutukina et al., 2023).

Целью исследования была оценка степени участия регуляторов пути Эшвелла в адгезии и формировании биопленок бактериями штамма *E. coli* K-12 MG1655 и влияния гексуронатов на эффективность этих процессов. Кроме того, мы исследовали роль *LeuO*, который является регулятором подвижности и способности к колонизации бактерий рода *Salmonella* (Guadarrama et al., 2014).

Штаммы и условия культивирования. В работе был использован стандартный лабораторный штамм *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 (U00096.3), его производные с удаленными генами *yjjM*, *crp*, *ixuR*, *exuR*, *leuO*, штамм с выключенной трансляцией белка UxuR (K-12 *ΔuxuR-tr*) и пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917, чистая культура которого была выделена из препарата “Мутафлор”. Эффективность формирования биопленок оценивали как описано в (Fuentes et al., 2015). Посевным материалом служила 18-часовая культура, выращенная при 37°C и перемешивании 121 об./мин на среде LB (1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт “Oxoid”, Великобритания; 1% NaCl “Хеликон”, Россия). Поскольку одной из целей исследования была

оценка влияния источников углерода на формирование биопленок, культуры растили на минимальной среде M9 (48 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8.5 mM NaCl, 18.7 mM NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂ (все “Amresco”, “Хеликон”, Россия) с добавлением 5% LB и 0.2% источника углерода (D-глюкозы, D-маннозы (“NeoFroxx”, Германия), D-глюкуроната или D-галактуроната (“Sigma”, США). Среды стерилизовали в течение 20 мин при 121°C с помощью автоклава Tuttnauer MK2450 (Израиль). Источники углерода фильтровали через 0.22 мкм PES фильтры (“Millipore”, США). Формирование биопленок оценивали после роста культуры в 96-луночных планшетах (“Sarstedt”, Германия) в течение 48 ч в микроаэробных условиях, для создания которых были использованы пакеты АнаэроGen™ (1 пакет на контейнер объемом 4.8 л; “Oxoid”, Великобритания). Оптическую плотность измеряли при λ = 600 нм на Synergy H1 (“BioTek”, США).

Оценка подвижности, эффективности адгезии и образования биопленок. Подвижность оценивали на чашках Петри с 0.3% LB-агаром, как описано ранее (Fuentes et al., 2015). Адгезию к клеткам линии карциномы кишечника человека CaCo-2 оценивали по протоколу, описанному в работе (Verma et al., 2016). Интенсивность формирования биопленок оценивали после окрашивания кристаллическим фиолетовым (Fuentes et al., 2015) при λ = 570 нм на Synergy H1 (“BioTek”, США).

Анализ экспрессии генов. РНК выделяли с помощью TriZol (“Invitrogen”, США) из всего содержимого лунки (планктонная культура вместе с биопленкой). Для обратной транскрипции было взято 50 нг РНК (с учетом выделения из одной лунки планшета, это максимально возможное количество). Реакцию проводили с геноспецифическими праймерами (табл. 1) в соответствии с протоколом производителя.

Реакцию количественной ПЦР проводили на амплификаторе DT-lite (“ДНК-Технология”,

Таблица 1. Праймеры для ОТ-ПЦР в реальном времени

Название праймера	Последовательность нуклеотидов
hns_PCR	5'-CGCAGGCAAGAGAATGTAC-3'
hns_RT	5'-GCAGTTCGTTCTGGGTCAATA-3'
flhA_PCR	5'-CTATGCTGGATGAACTCGCA-3'
flhA_RT	5'-GCGTTGCGGCCAAGTTCCTG-3'
csgD_F	5'-CTTTGCAGGCGACAGCTCTC-3'
csgD_R	5'-TCCTGCTCAAAGTATCCTGC-3'
csrC_F	5'-CCATAGAGCGAGGACGCT-3'
csrC_R	5'-ACGGGTCTTACAATCCTTG-3'

Россия) с использованием qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия), как описано в работе (Bessonova et al., 2023). В качестве отрицательного контроля использовали пробы с РНК, проведенные через реакцию обратной транскрипции без добавления фермента. В качестве house-keeping референса использовали *hns* (Tutukina et al., 2016). Количественный анализ уровня экспрессии проводили при помощи метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ относительно дикого типа (wt) варианта К-12.

Статистическую обработку проводили в Microsoft Excel с использованием непарного критерия Стьюдента (различия считали значимыми при $p \leq 0.05$). Каждый эксперимент проводили не менее чем в трех биологических и четырех технических повторах.

Влияние источников углерода и исследуемых факторов транскрипции на способность *E. coli* к адгезии к клеткам кишечной карциномы человека CaCo-2. На первом этапе мы оценили влияние делеции генов, кодирующих потенциальные регуляторы процессов адгезии и формирования биопленок, на эффективность прикрепления клеток *E. coli* штамма

К-12 MG1655 к клеткам кишечного эпителия человека. Делеция *leuO* немного увеличивала эффективность адгезии (рис. 1а), что согласуется с данными группы А. Ишихамы (Shimada et al., 2011). В мутантах по генам регуляторов *ixuR* и *exuR* статистически значимого изменения эффективности адгезии не происходило, и мы наблюдали очень большие разбросы в результатах.

Статистически достоверное снижение прикрепления происходило при удалении гена глобального регулятора CRP и, особенно, при удалении гена одного из регуляторов метаболизма гексуронатов *YjjM* (рис. 1а). Оказалось, что делеция *yjjM* существенно увеличивает подвижность *E. coli* К-12 MG1655 (рис. 1б), а комплементация плазмидой pLAX_YjjM приводит к возврату подвижности на уровень дикого типа.

YjjM контролирует метаболизм L-галактоната, в частности, его превращение в D-тагатуронат, который также может образовываться из D-галактуроната в пути Эшвелла. Данные, полученные в работе (Jimenez et al., 2019), свидетельствовали

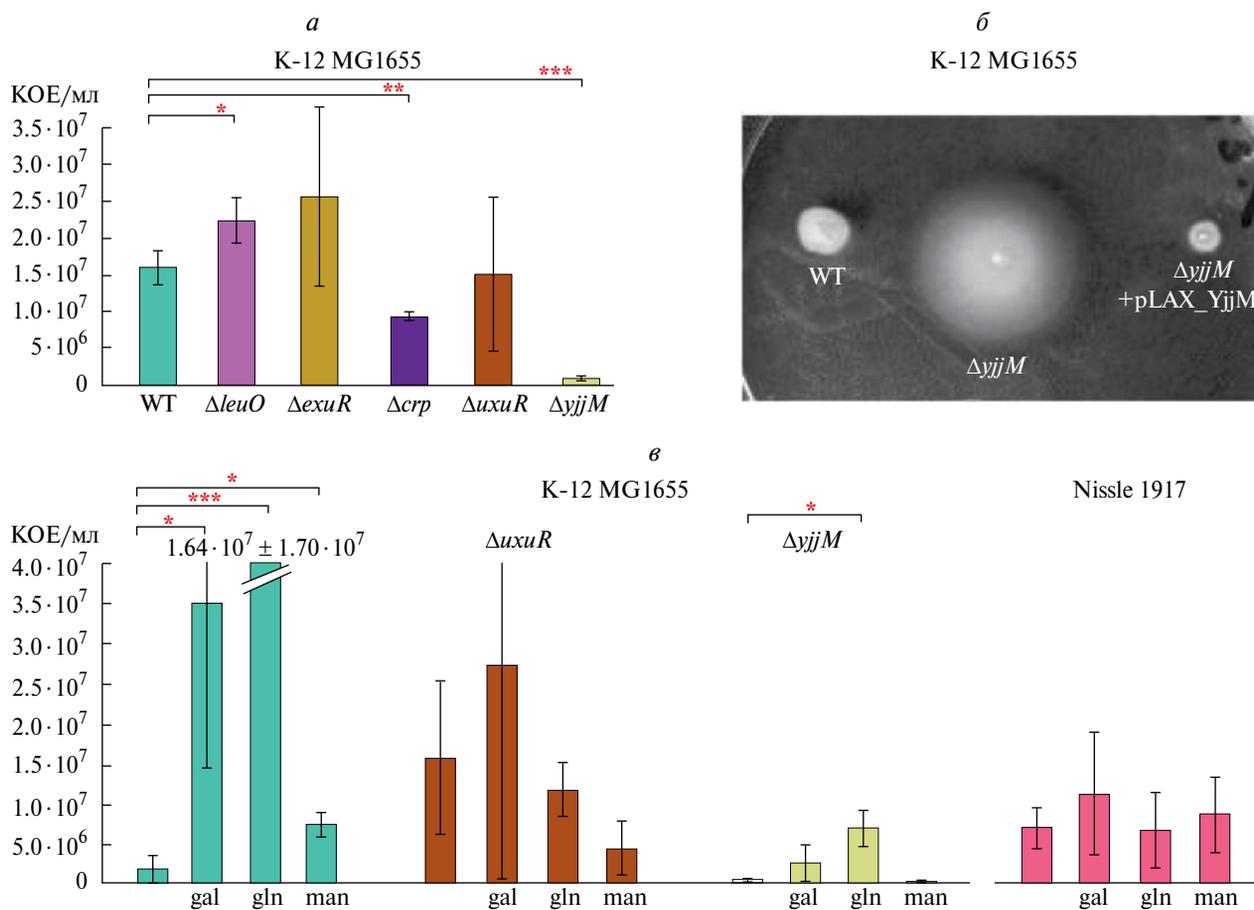


Рис. 1. а – Оценка влияния удаления *leuO*, *ixuR*, *crp*, *exuR*, *yjjM* на адгезию *E. coli* К-12 к клеткам кишечного эпителия CaCo-2; б – подвижность клеток *E. coli* К-12 в 0.3% LB агаре; в – адгезия *E. coli* К-12 MG1655 и *E. coli* Nissle 1917 к клеткам CaCo-2 в присутствии 0.2% D-галактуроната, D-глюкуроната или D-маннозы.

о способности гексуронатов усиливать адгезивные свойства клеток дикого типа, но особенно интересно было оценить их влияние на способность к прикреплению мутантных штаммов. Как видно из рис. 1в, добавление гексуронатов, действительно, на несколько порядков повышало количество клеток штамма K-12 MG1655, прикрепленных к эпителию кишечника человека, а манноза, как и предполагалось, на адгезию практически не влияла. В отсутствие *ixuR* и *yjjM* активаторного эффекта гексуронатов на адгезию *E. coli* K-12 MG1655 либо не наблюдалось, либо он был существенно ниже (рис. 1в).

Таким образом, *YjjM* ингибирует подвижность и активирует способность клеток *E. coli* K-12 MG1655 к адгезии, а также, наряду с *UxuR*, необходим для активации адгезии в присутствии гексуронатов. При этом прикрепление к клеткам эпителия кишечника пробиотического штамма Nissle 1917 не зависело от присутствия в среде гексуронатов (рис. 1в).

Влияние источников углерода и исследуемых факторов транскрипции на способность *E. coli* к образованию биопленок. Как и в случае с адгезией, удаление *leuO* и *exuR* не приводило к существенным

изменениям эффективности формирования биопленок бактериями *E. coli* K-12 MG1655, а при удалении *ixuR* наблюдался сильный разброс полученных значений (рис. 2а). Удаление *crp* и *yjjM* существенно снижало образование биопленок, что подтверждает их способность активировать данный процесс. При добавлении к среде субстрата гликолиза, D-глюкозы, рост биопленок также значительно снижался (рис. 2б), что было ожидаемо вследствие снижения потребности в источнике питания (Jackson et al., 2002b).

Несмотря на то что гексуронаты являются менее энергодающими субстратами, эффект D-галактуроната оказался сравнимым с D-глюкозой. При добавлении D-глюкуроната образование биопленок уменьшалось до уровня, сопоставимого с их ростом в присутствии D-маннозы (рис. 2б), которая уже используется в качестве добавки при лечении хронических бактериальных заболеваний. На штамм *E. coli* Nissle 1917 гексуронаты не влияли.

Влияние CRP, *YjjM*, *UxuR* и малых РНК на экспрессию генов ключевых регуляторов подвижности и образования биопленок. На рис. 2г

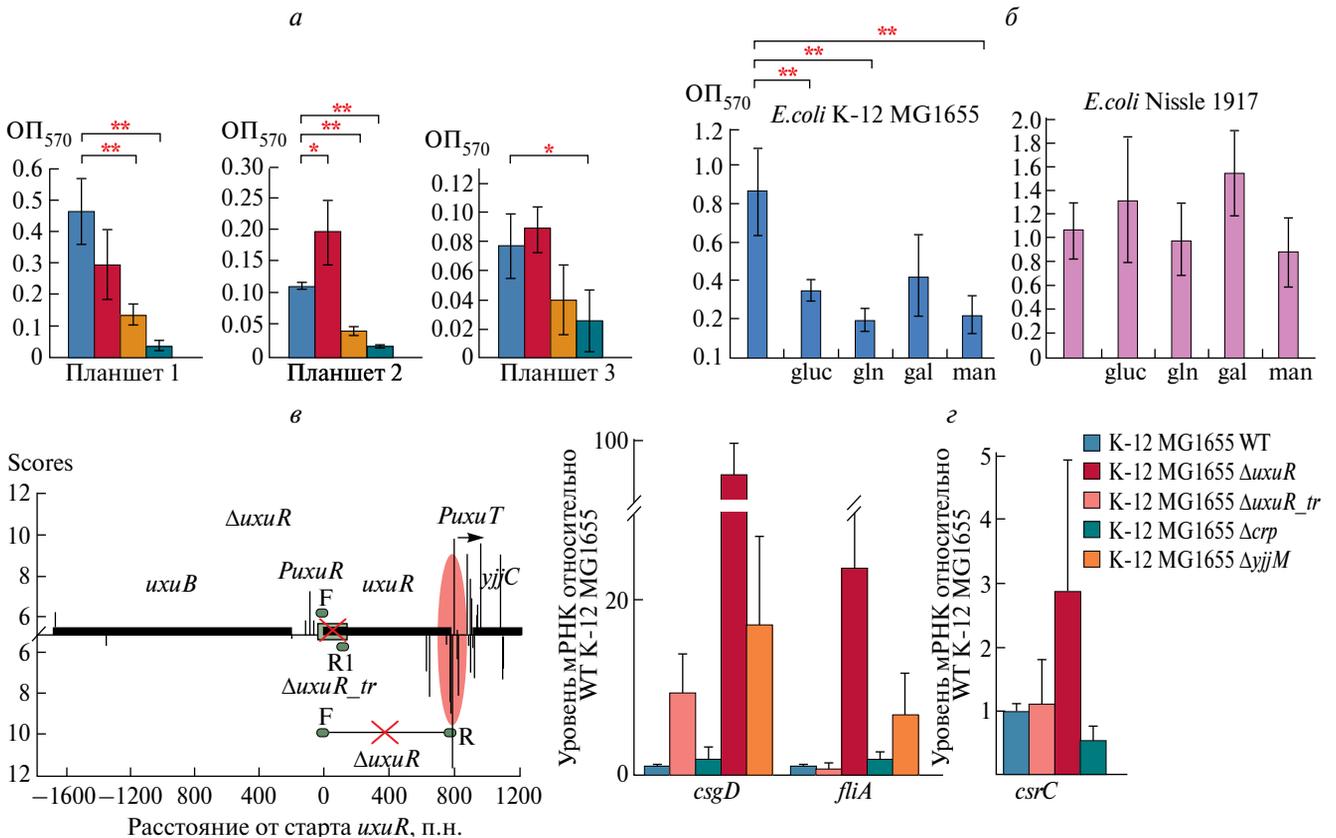


Рис. 2. а – Формирование биопленок (данные по трем планшетам в одном эксперименте). Штаммы описаны в легенде; б – влияние источника углерода на эффективность образования биопленок *E. coli* K-12 MG1655 и *E. coli* Nissle 1917; в – схема участков гена *ixuR*, удаленных в штаммах *E. coli* K-12 MG1655 *ΔixuR* и *ΔixuR_{tr}*. По оси ординат отложены скоры PlatProm, отражающие вероятность инициации транскрипции в конкретной точке. Место синтеза регуляторных РНК выделено розовым; г – динамика экспрессии генов *csgD*, *fliA* и *csrC* в *E. coli* K-12 MG1655 при удалении *ixuR*, *crp* и *yjjM*.

приведена динамика изменения экспрессии генов, кодирующих основные регуляторы процессов биопленкообразования (CsgD) и подвижности (FliA), а также малую РНК CsrC, в делеционных мутантах по генам *ixuR*, *yjjM* и *crp*. Эффекты от удаления *leuO* и *exuR* незначительны (данные не приведены), что согласуется с результатами экспериментов по адгезии и формированию биопленок. Поскольку ген *ixuR* кодирует не только фактор транскрипции, но и регуляторные РНК, ингибирующие подвижность бактерий за счет связывания с промоторной областью *fliA* (Tutukina et al., 2023), мы использовали два варианта мутантов – с полностью удаленным геном (*ΔixuR*) и с выключенной трансляцией белка (*ΔixuR-tr*) (схема приведена на рис. 2в). При удалении *ixuR* наблюдалась сильная активация *fliA*, сопровождавшаяся сильной дисперсией, что согласуется с данными экспериментов по образованию биопленок. В трансляционном же мутанте эта активация пропадает и повышается уровень *csgD*-мРНК, что подтверждает ингибиторную роль закодированных в *ixuR* малых РНК в отношении подвижности кишечной палочки дикого типа. В мутанте по *yjjM* такой сильной дисперсии уже не наблюдается: почти во всех случаях происходит активация *fliA*, как и ожидалось по результатам других экспериментов. Кроме того, YjjM, по-видимому, напрямую активирует малую РНК CsrC: при удалении *yjjM* экспрессия ее гена ингибирована более, чем в 50 раз (рис. 2г). При удалении *crp* активируется *csgD*, но ингибируется *csrC*, что согласуется с показанным ранее опосредованным влиянием CRP на образование биопленок.

Таким образом, гексуронаты влияют на процессы адгезии дикого типа *E. coli* K-12 MG1655 и ее способность к формированию биопленок. Поскольку D-глюкуронат, усиливая адгезию дикого типа *E. coli*, одновременно снижал формирование им биопленок (рис. 1) и не влиял на пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917 (рис. 1в и 2б), его можно рассматривать в качестве потенциальной пребиотической добавки. YjjM и глобальный регулятор сАМР-СРР являются активаторами процессов формирования биопленок и адгезии, а ключевой регулятор пути Эшвелла UxuR и закодированные в гене *ixuR* нетранслируемые РНК необходимы для нормального функционирования этих процессов. Полученные нами данные полностью подтверждают то, что метаболизм гексуронатов по пути Эшвелла и Энтнера–Дудорова играет важную роль в успешной колонизации *E. coli* кишечника хозяев.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны А. Шатровой и И. Ларичевой за помощь в проведении экспериментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ АНФ-а 20-54-14005 и Госзадания № 075-00957-23-01.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bertin P., Terao E., Lee E.H., Lejeune P., Colson C., Danchin A., Collatz E. The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 5537–5540.
- Bessonova T.A., Rybina A.A., Marakulina D.A., Kaznadzey A.D., Gelfand M.S., Ozoline O.N., Tutukina M.N. Phylogeny and cross-regulation of the YjjM and LeuO transcription factors translated as multiple protein forms from one gene in *Escherichia coli* // Math. Biol. Bioinforma. 2023. V. 18. P. 1–14.
- Domka J., Lee J., Wood T.K. YjiH (BssR) and YceP (BssS) Regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 2449–2459.
- Fabich A.J., Jones S.A., Chowdhury F.Z., Cernosek A., Anderson A., Smalley D., McHargue J.W., Hightower G.A., Smith J.T., Autieri S.M., Leatham M.P., Lins J.J., Allen R.L., Laux D.C., Cohen P.S., Conway T. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine // Infect. Immun. 2008. V. 76. P. 1143–1152.
- Fuentes D.N., Calderón P.F., Acuña L.G., Rodas P.I., Paredes-Sabja D., Fuentes J.A., Gil F., Calderón I.L. Motility modulation by the small non-coding RNA SroC in *Salmonella typhimurium* // FEMS Microbiol. Lett. 2015. V. 362. Art. fmv135.
- Guadarrama C., Villasenor T., Calva E. The subtleties and contrasts of the LeuO regulator in *Salmonella typhi*: implications in the immune response // Front. Immunol. 2014. V. 5. Art. 581.
- Gudapaty S., Suzuk, K., Wang X., Babitzke P., Romeo T. Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 6017–6027.
- Hammar M., Bian Z., Normark S. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles

- in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 6562–6566.
- Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J.W., Hart M.E., Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 290–301.
- Jackson D.W., Simecka J.W., Romeo T. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 3406–3410.
- Jimenez A.G., Ellermann M., Abbott W., Sperandio V. Diet-derived galacturonic acid regulates virulence and intestinal colonization in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* // Nat. Microbiol. 2019. V. 5. P. 368–378.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli* // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 123–140.
- Mehta I., Zimmern P., Reitzer L. Enzymatic assay of D-mannose from urine // Bioanalysis. 2018. V. 10. P. 1947–1954.
- Peekhaus N., Conway T. What's for dinner?: Entner–Doudoroff metabolism in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 3495–502.
- Pratt L.A., Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili // Mol. Microbiol. 1998. V. 30. P. 285–293.
- Rodrigues D.F., Elimelech M. Role of type 1 fimbriae and mannose in the development of *Escherichia coli* K12 biofilm: from initial cell adhesion to biofilm formation // Biofouling. 2009. V. 25. P. 401–411.
- Suvorova I.A., Tutukina M.N., Ravcheev D.A., Rodionov D.A., Ozoline O.N., Gelfand M.S. Comparative genomic analysis of the hexuronate metabolism genes and their regulation in gammaproteobacteria // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 3956–3963.
- Shimada T., Bridier A., Briandet R., Ishihama A. Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS // Mol. Microbiol. 2011. V. 82. P. 378–397.
- Tutukina M.N., Potapova A.V., Cole J.A., Ozoline O.N. Control of hexuronate metabolism in *Escherichia coli* by the two interdependent regulators, ExuR and UxuR: derepression by heterodimer formation // Microbiology (Reading). 2016. V. 162. P. 1220–1231.
- Tutukina M.N., Dakhnovets A.I., Kaznadzey A.D., Gelfand M.S., Ozoline O.N. Sense and antisense RNA products of the *uxuR* gene can affect motility and chemotaxis acting independent of the UxuR protein // Front. Mol. Biosci. 2023. V. 10. Art. 1121376.
- Verma R., Rojas T.C.G., Maluta R.P., Leite J.L., Da Silva L.P.M., Nakazato G., Dias Da Silveira W. Fimbria-encoding gene *yadC* has a pleiotropic effect on several biological characteristics and plays a role in avian pathogenic *Escherichia coli* pathogenicity // Infect. Immun. 2016. V. 84. P. 187–193.
- Wood T.K., González Barrios A.F., Herzberg M., Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 361–367.

 EXPERIMENTAL ARTICLES

Connection between Hexuronate Metabolism and the Ability of *Escherichia coli* to Adhesion and Biofilm Formation

T. A. Bessonova^{1, *}, U. D. Kuznetsova², A. T. Magkaev³, M. S. Gelfand^{4, 5},
O. N. Ozoline¹, and M. N. Tutukina^{1, 4, 5}

¹Institute of Cell Biophysics RAS (FSC PSCBS RAS), Pushchino, 142290, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russia

³HSE University, Moscow, 117418, Russia

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

⁵Institute for Information Transmission Problems RAS, Moscow, 127051, Russia

*e-mail: tatianabessonova66@gmail.com

Received October 15, 2023; revised December 7, 2023; accepted December 8, 2023

Abstract. The formation of bacterial biofilms is an important factor of the chronic infection development, which requires the search for effective ways to prevent it. Here, it was found that hexuronates did not affect the biofilm formation by the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 and its adhesive properties but reduced the efficiency of biofilm formation by the *E. coli* K-12 MG1655 strain, enhancing its adhesion to human intestinal carcinoma cells. It was shown that the regulators of hexuronate metabolism, UxuR and YjjM, are involved, along with cAMP-CRP, in the control of motility, adhesion and biofilm formation of *E. coli* K-12 MG1655. In addition, untranslated RNAs encoded in the *uxuR* gene play an important role inhibiting the main sigma factor of motility.

Keywords: biofilms, adhesion, *Escherichia coli* K-12 MG1655, Nissle 1917, hexuronate metabolism, UxuR, YjjM (LgoR)

УДК 574.5+57.083.18

БАКТЕРИАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИСТОРИЧЕСКИХ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ ВОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ КАЛИНИНГРАДСКОГО РЕГИОНА

© 2024 г. Е. Е. Супрунов^а, И. А. Шнурова^а, Б. Э. Ефименко^а, В. В. Лисун^{а, *}

^аБалтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, 236016, Россия

*e-mail: Li.sun.v.29@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 20.12.2023 г.

Принята к публикации 22.12.2023 г.

Калининградская область имеет богатое историческое наследие, в том числе несколько источников воды с высоким содержанием железа. Известные с конца XIX века, они богаты двухвалентным железом, которое окисляется бактериальными сообществами. В их состав входит множество различных таксономических групп бактерий. В данной работе впервые было проведено профилирование микробных сообществ железосодержащих источников Калининградской области; в ходе исследования были взяты 6 проб из четырех географических точек. По результатам профилирования были выявлены таксономические группы, относящиеся к филумам *Acidobacteriota*, *Desulfobacteriota*, *Cyanobacteriota*, *Proteobacteria*, *Nitrospirota*, а среди преобладающих групп выделяется гаммапротеобактерия рода *Gallionella*.

Ключевые слова: железосодержащие источники, железоокисляющие бактерии, бактериальный мат, хемолитоавтотроф, *Gallionella*

DOI: 10.31857/S0026365624040111

Во многих регионах пресноводные источники богаты растворенным железом. В Калининградской области имеется несколько источников, которые относятся к региональным особо охраняемым природным территориям (ООПТ) или входят в состав историко-культурных ландшафтов. Они обладают устаревшей инфраструктурой, и первые достоверные упоминания датируются концом XIX века. Выход на поверхность вод с повышенной концентрацией железа приводит к образованию хемолитоавтотрофных микробных сообществ, которые характеризуются значительным разнообразием. В него, например, входят сульфатредуцирующие бактерии группы *Desulfuromonas* (Singh et al., 2018), которые могут вступать в синтрофные отношения с окислителями железа, а также многие представители филумов *Proteobacteria*, *Acidobacteriota* и *Bacteroidetes* (Emerson et al., 2015). Помимо этого, рядом с колониями железоокисляющих бактерий часто обнаруживаются цианобактерии (Emerson, Weiss, 2004), создающие градиент кислорода в толще воды и влияющие на окислительно-восстановительный потенциал окружающей среды. Но важнейшую роль играют железобактерии, которые способны окислять

и осаждают железо из растворимых двухвалентных форм. Железобактерии представляют собой таксономически разнообразную группу, среди которых есть представители двух филумов, *Pseudomonadota* и *Bacillota*, большинство из которых относятся по порядку *Gallionellales*. В источниках пресной воды наиболее часто встречающиеся семейства железобактерий включают *Gallionellaceae* (Reis et al., 2014), *Sphaerotilaceae* (Emerson et al., 2015). Они являются анаэробами или факультативными анаэробами. Метаболизм железобактерий сосредоточен вокруг ферментативного окисления двухвалентного железа Fe(II) до трехвалентного Fe(III).

Изучение разнообразия подобных пресных экосистем помогает детальнее понять биогеохимический цикл железа в осадочных экосистемах и разнообразии таксономических групп прокариот, осуществляющих восстановление двухвалентного железа, а исследование схожих местообитаний позволяет расширить наше знание о разнообразии автотрофных прокариот в составе матов. Также понимание микробного состава сообществ данных источников, возможно, поможет предположить одну из множества причин повышенной концентрации

железа в питьевых источниках воды Калининградской области.

Целью работы было исследование микробных сообществ железосодержащих источников Калининградской области.

Место отбора проб и определение химических параметров воды. Для исследования были выбраны четыре исторических места: источники в Центральном парке и Зоопарке города Калининград, а также источники в городе Светлогорске и в Национальном парке “Виштынецкий”, находящийся в поселке Боровиково. Дно городских источников глинистое, характеризуется обилием гравия и бетонных остатков. Приток органики преимущественно осуществляется за счет листвы окружающих деревьев, а уровень воды в течение года в основном держится на уровне 40–60 см и более 1 м весной и осенью. Источник зоопарка используют в технических нуждах и, в связи с этим, при пересыхании там возможен обратный заброс воды из большого вольера водоплавающих птиц. Источник в Виштынецком парке имеет такое же глинистое дно, но без каменных составляющих, а также, в отличие от городских источников, он очень ярко освещен. По берегам травянистая растительность, на которой находятся микробные маты, но при этом приток органики гораздо меньше из-за отсутствия поблизости листопадных деревьев. Уровень воды там меньше, но также колеблется в диапазоне от 20–40 до 60 см осенью и весной. Сбор 6 образцов донных отложений, микробных матов и образцов воды производили осенью 2022 года. Трудности пробоотбора в двух точках с одним образцом связаны с доступностью только образцов осадка вследствие проблем в работе источника (зоопарк) или, как в случае образца из г. Светлогорска, с обилием микробных матов на дне и сложностью отделения образцов микробного мата и осадка.

Измерение температуры, концентрации кислорода в воде и значения рН производили на месте при помощи кислородомера БПК-тестер Анион-7040 (“Инфраспак-Аналит”. Россия) и портативного рН-метра HI99151 (“HANNA Instruments”, США) соответственно. Концентрацию общего и двухвалентного железа (Fe(II)) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на образовании стабильного комплекса между ортофенантролином и ионами железа (ЦВ 1.04.46-00 “А”, 2008). Заранее подготовленную пробу окрашивали смесью раствора гидросиламина, ацетатного буфера и раствора ортофенантролина, и полученный окрашенный раствор фотометрировали с помощью спектрофотометра UV-1800 (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 500 нм.

Анализ состава микробных сообществ. Выделение тотальной ДНК проводили с помощью коммерческого набора QuickDNA Fecal/Soil Microbe Microprep, 50 reactions (“Zymo Research”, США). Выделение ДНК проводили согласно протоколу производителя. Для амплификации использовали универсальные праймеры, 515F и 806R (Caporaso et al., 2011). Библиотеки ампликонов были подготовлены в два последовательных раунда ПЦР, на амплификаторе Bio-Rad CFX96 (“Bio-Rad”, США) с использованием смеси qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”, Россия). ПЦР фрагменты секвенировали с использованием набора MiSeq Nano Комплект v2 (500 циклов) (“Illumina”, США) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США). После секвенирования прочтения были обработаны в программном пакете QIIME 2 (Bolyen et al., 2019). Затем объединенные чтения были кластеризованы в оперативные таксономические единицы (OTU). Объединенные последовательности были использованы для сравнения по базе данных SILVA 1.9.8. Индексы Шеннона и Симпсона были получены с помощью программного сервиса SILVA 1.9.8.

Таблица 1. Концентрация общего железа и железа (II), температура, рН и концентрация кислорода в исследуемых местах отбора проб

Место и координаты	рН	Fe(II), мг/л	Fe(общ.), мг/л	Кислород, мг/л	Температура, °С
Национальный парк Виштынецкий 54.40542° с.ш. 22.60996° в.д.	8.15	6.78	7.83	1.4	6
Центральный парк 54.71755° с.ш. 20.47837° в.д.	7.25	4.81	5.76	2.3	8
Светлогорск 54.93784° с.ш. 20.15897° в.д.	7.21	5.63	6.19	2.41	7
Зоопарк 54.72361° с.ш. 20.48777° в.д.	7.15	4.92	5.82	2.5	8

Последовательности отдельных OTUs, относящихся к анализируемым образцам, были использованы для анализа бета-разнообразия сообществ в образцах, с метрикой невзвешенного UniFrac.

Вода из исследуемых источников содержит большое количество железа (II), при этом концентрация кислорода на границе жидкой и твердой фазы (осадка или микробного мата) была достаточно низкой (табл. 1), вследствие чего можно сделать вывод о бактериальном происхождении железистых осадков в данных источниках.

В результате профилирования микробных сообществ осадков и бактериальных матов (рис. 1а, 1б) было показано, что доминирующими филумами во всех пробах являются *Pseudomonadota* (12–75%), *Cyanobacteria* (5–85%), *Actinobacteriota* (1–55%), *Nitrospirota* (1–25%), *Acidobacteriota* (1–10%) и *Planctomycetota* (1–8%) *Bacillota* (1–10%). Остальные группы представлены в меньшей степени и являются минорными.

Важно отметить, что характер среды напрямую может влиять на видовой состав и его соотношение в сообществе. Это подтверждает тот факт, что в образцах бактериального мата из Центрального парка представители филума *Cyanobacteria* составляют 19% от общего числа, а в пробе бактериального мата и осадка из источника Виштынецкого парка являются доминирующими и составляют до 85% сообщества. Данный факт может быть объяснен тем, что обе точки хорошо освещены в течение дня, но в Виштынецком парке освещенность гораздо выше из-за отсутствия древесных растений; помимо этого, нахождение на южной стороне и меньший приток органики также могут играть свою роль. Из этого можно сделать вывод, что остальные представители сообщества в этом источнике зависят от цианобактерий как продуцентов органического вещества. Преобладание представителей филума *Actinobacteriota* (55%), играющих важную роль в аэробном разложении органических

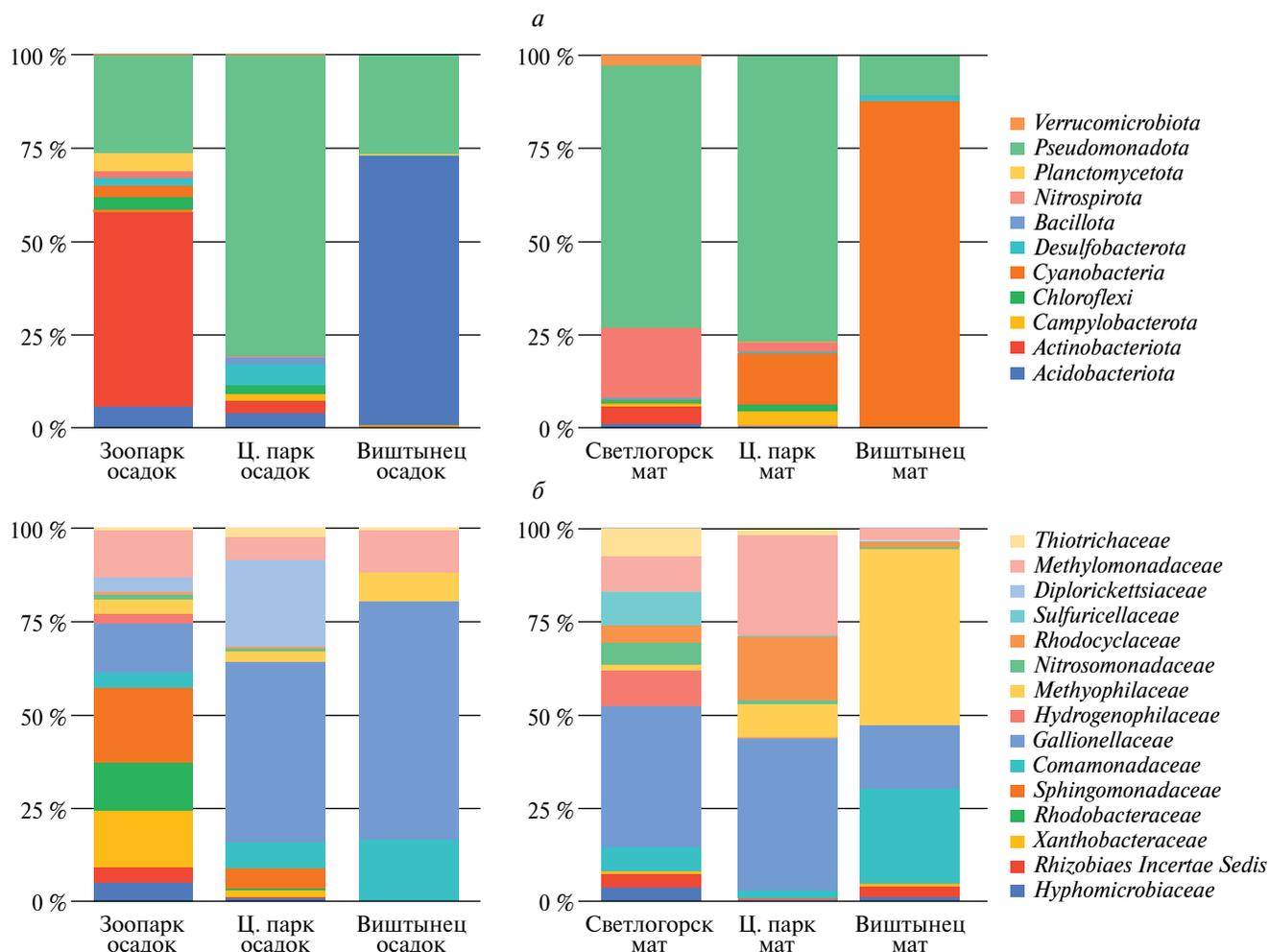


Рис. 1. Общий профиль микробных сообществ осадков (а) и микробных матов (б) исследуемых образцов. Соотношение представителей семейств внутри филума *Pseudomonadota* в осадках (в) и микробных матах (г).

веществ (Anandan et al., 2016), в образцах осадка из зоопарка может быть вызвано обилием попадающей органики, поскольку там источник является частью вольтера для птиц. Большой процент представленности филума *Nitrospirota* (25%) в образцах бактериального мата из источника г. Светлогорска может говорить о большем количестве соединений азота в воде источника по сравнению с другими точками отбора проб.

Поскольку филум *Pseudomonadota* (12–75%) составлял, в основном, вторую доминирующую группу, и основные семейства железобактерий относятся к этому филуму микроорганизмов, он был рассмотрен более детально (рис. 1в, 1г). В образцах из Центрального парка доминирующими в филуме *Pseudomonadota* являлись способные к окислению двухвалентного железа представители семейства *Gallionellaceae* (48%), а также семейства *Diplorickettsiaceae* (22.84%), *Sphingomonadaceae* (5.45%) и *Comamonadaceae* (6.75%). Далее, исходя из видового состава проб из зоопарка, прослеживались различия: отталкиваясь от имеющихся данных условий и химических показателей среды (а именно кислотности и концентраций железа и кислорода; табл. 1), уместно сделать вывод о схожести условий обитания для железобактерий. Однако в отличие от видового состава проб из Центрального парка, где процентное содержание доминирующих железобактерий *Gallionellaceae* было 48%, в пробах из Зоопарка бактерий того же семейства наблюдалось значительно меньше – 12.99%. Такое значительное снижение доли железобактерий в образце может объясняться забросом микроорганизмов в источник из озера, богатого органотрофами, чье обилие объясняется большим количеством органических веществ, поэтому приоритет смещается в сторону других семейств – *Sphingomonadaceae* (20.34%), *Xanthobacteraceae* (15.16%), а также *Rhodobacteraceae* (12.49%) и *Hydrogenophilaceae* (2.51%). В пробах Национального парка “Виштынецкий” отмечались существенные различия в составе сообщества, в котором главенствующую нишу заняли представители *Cyanobacteria* (72.08%), которые создают благоприятные условия для существования внутри филума *Pseudomonadota* (26.69%) представителей семейства *Gallionellaceae* (63.88%), образуя биопленки и вытесняя других хемотрофов.

Для проб микробных матов, по аналогии с осадками, в пределах филума *Pseudomonadota* тенденция изменения видового состава сохранялась с небольшими отличиями. В образцах из Центрального парка наблюдалось преобладание представителей таксонов филума *Pseudomonadota*: высокий процент железобактерий *Gallionellaceae* (40.66%) и значительная представленность семейств метанооксиляющих бактерий

Methylomonadaceae (27.07%), *Methylophilaceae* (8.82%) и *Rhodocyclaceae* (17.17%), свидетельствующая об анаэробной трансформации органического вещества (Smalley et al., 2015). В образцах из г. Светлогорска также наблюдалось преобладание железобактерий семейства *Gallionellaceae* (37.64%) и представленность меньших в процентном соотношении групп микроорганизмов – от метилотрофных до нитрифицирующих бактерий, относящихся к семействам *Hypomicrobiaceae* (3.49%), *Xanthobacteraceae* (1.13%), *Comamonadaceae* (6.66%), *Hydrogenophilaceae* (9.57%), *Methylophilaceae* (1.47%), *Nitrosomonadaceae* (5.87%) и группе *Rhizobiales Incertae Sedis* (3.74%). В пробах микробного мата из Национального парка “Виштынецкий”, аналогично с пробами осадка, отмечено полное доминирование филума *Cyanobacteria* (85%) и семейства *Gallionellaceae* (15.37%) внутри филума *Pseudomonadota* (10.41%), однако также весомую долю занимали метилотрофы семейства *Methylophilaceae* (42.46%), что свидетельствует об анаэробных процессах разложения органического вещества в нижних слоях микробного мата.

Значения индексов альфа-разнообразия Шеннона и Симпсона (рис. 2а) исследуемых сообществ имеют сходные показатели для городских точек отбора проб: в пробах, взятых с твердого осадка Центрального парка и Зоопарка, значения индекса Шеннона были 6.35 и 6.64 соответственно, в то время как в пробах из Виштынецкого парка (микробного мата и твердого осадка) значения достигали всего лишь 2.28 и 2.01.

Наибольшее значение индекса Симпсона наблюдалось в пробах Виштынецкого парка – 0.41 и 0.5, в остальных же пробах значение не превышало 0.02. Интересно, что для осадков было характерно большее разнообразие таксономических групп, чем для микробных матов; данное явление можно объяснить доступностью неорганического субстрата дна источников и тем фактом, что соли железа при данных условиях малорастворимы и выпадают в осадок.

Наибольшее разнообразие по филумам наблюдалось в образцах из Зоопарка, что связано с наличием органического вещества и привнесением органотрофных прокариот из вольтера для птиц. Кроме того, как и в случае Центрального парка, они находятся в городе, где вероятность антропогенного загрязнения сточными водами или твердыми бытовыми отходами значительно выше. Важно отметить, что во всех пробах концентрации Fe(II) были значительно выше, чем Fe(III), что свидетельствует о медленном окислении железа, особенно, учитывая низкую температуру всех источников. Низкие значения индексов Шеннона и Симпсона для проб из Виштынецкого парка связаны с меньшим количеством попадающей органики и,

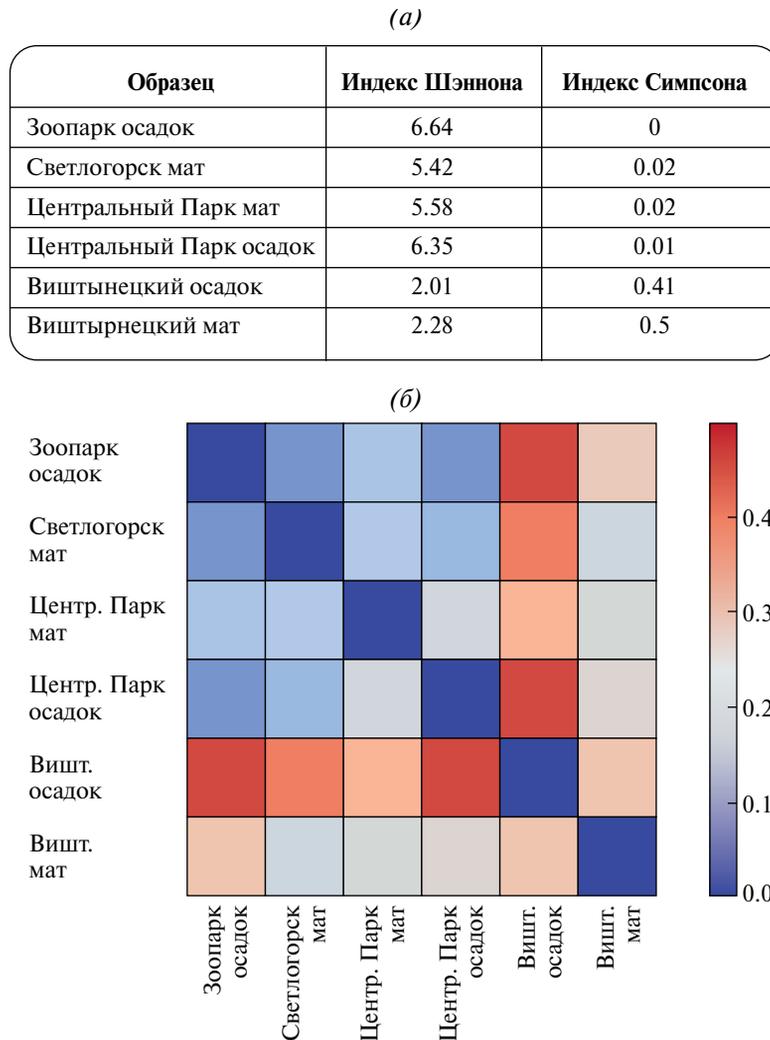


Рис. 2. Значения индексов альфа-разнообразия Шеннона и Симпсона для образцов осадков и микробных матов (а). Тепловая карта, показывающая различия сообществ образцов с разных географических точек Калининградского региона (б). Цвет квадрата показывает схожесть между каждым двумя образцами. Диапазон от синего до красного соответствует схожести от близкого до дальнего.

вследствие этого, меньшим разнообразием гетеротрофных микроорганизмов в сообществе.

Важно отметить, что водные источники, ассоциированные с городами, имеют сходные параметры бета-разнообразия (рис. 2б), что может указывать на схожесть сообществ микроорганизмов в одинаковых условиях самих источников. Интересным является факт различия состава сообществ микробного мата и осадка источника Виштынецкого парка, что, в свою очередь, можно объяснить доступностью неорганического вещества для сообществ осадка. Важно отметить достаточно выраженные отличия городских источников от водного источника в сельской местности, которые определяются влиянием городской среды на микробные сообщества.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.г.н. Королевой Ю.В., преподавателю ВЖШС БФУ имени И. Канта, за предоставление аппаратуры для измерения концентрации железа в образцах воды, и к.б.н. Меркелю А.Ю., с.н.с. ФИЦ Биотехнологии РАН, за помощь в обработке данных секвенирования.

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

- ЦВ 1.04.46-00 А “МВИ массовой концентрации железа в пробах питьевых и природных вод фотометрическим методом.” Редакция 2, 2008 г.
Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P. An introduction to Actinobacteria // Actinobacteria – basics and biotechnological applications / Eds. D. Dhanasekaran, Y. Jiang. IntechOpen, 2016. P. 4–5.
Emerson D., Scott J.J., Benes J., Bowden W. Microbial iron oxidation in the Arctic tundra and its implications for biogeochemical cycling // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 8066–8075.
Emerson D., Weiss J.V. Bacterial iron oxidation in circumneutral freshwater habitats: findings from the field and the laboratory // Geomicrobiol. J. 2004. V. 21. P. 405–414.
Reis M.P., Avila M.P., Costa P.S., Barbosa F.A., Laanbroek H.J., Chartone-Souza E., Nascimento A.M. The influence of human settlement on the distribution and diversity of iron-oxidizing bacteria belonging to the *Gallionellaceae* in tropical streams // Front. Microbiol. 2014. V. 5. Art. 630.
Singh V.K., Singh A.L., Singh R., Kumar A. Iron oxidizing bacteria: insights on diversity, mechanism of iron oxidation and role in management of metal pollution // Environ. Sustain. 2018. V. 1. P. 221–231.
Smalley N.E., Taipale S., De Marco P., Doronina N.V., Kyrpides N., Shapiro N., Kalyuzhnaya M.G. Functional and genomic diversity of methylotrophic *Rhodocyclaceae*: description of *Methyloversatilis discipulorum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 2227–2233.

SHORT COMMUNICATION

Bacterial Diversity of Historic Iron-Containing Water Sources of the Kaliningrad Region

E. E. Suprunov¹, I. A. Shnurova¹, B. E. Efimenko¹, and V. V. Lisun^{1, *}

¹*I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236016, Russia*

**e-mail: Li.sun.v.29@gmail.com*

Received October 13, 2023; revised December 20, 2023; accepted December 22, 2023

Abstract. The Kaliningrad region has a rich historical heritage, including several water sources with high iron content. Known since the end of the 19th century, they are rich in ferrous iron, which is oxidized by bacterial communities. They include many different taxonomic groups of bacteria. In this work, for the first time, profiling of microbial communities of iron-containing sources in the Kaliningrad region was carried out; During the study, 6 samples were taken from four geographical locations. Based on the results of profiling, taxonomic groups were identified belonging to the phyla Acidobacteriota, Desulfobacteriota, Cyanobacteriota, Proteobacteria, Nitrospirota, and among the predominant groups the gammaproteobacterium of the genus *Gallionella* stands out.

Keywords: iron-containing sources, iron-oxidizing bacteria, bacterial mat, chemolithoautotroph, *Gallionella*

УДК 578.81+578.23

НОВЫЙ БАКТЕРИОФАГ *PSEUDOMONAS* PHAGE Ka1 ИЗ ПРИТОКА ОЗЕРА БАЙКАЛ

© 2024 г. М. С. Федорова^{а, *}, А. Э. Гатина^а, В. Н. Ильина^а, Л. Л. Ядыкова^а,
В. В. Дрюккер^б, А. С. Горшкова^б, А. Р. Каюмов^а, Е. Ю. Тризна^а

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

^бЛимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 664033, Иркутск, Россия

*e-mail: MaSFedorova97@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Из воды притока озера Байкал, в районе сброса очищенных сточных вод г. Слюдянка, выделен бактериофаг *Pseudomonas* phage Ka1. Геном бактериофага размером 46092 п.о. и 50% составом Г + Ц пар (AN OP455935.1) имеет идентичность в 91% с геномом *Pseudomonas* phage PSA37, относящимся к *Bruynoghevirus* из класса *Caudoviricetes*, что характеризует его как нового представителя Luz24-подобных фагов (*Bruynoghevirus*). Бактериофаг лизирует 62% клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* и способен повышать эффективность гентамицина, ципрофлоксацина, имипинема и меропенема в 4–8 раз в отношении этой бактерии. В геноме не идентифицировано интеграз, транспозаз и рекомбиназ, что делает *Pseudomonas* phage Ka1 возможным для использования в комплексной терапии инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: бактериофаг, фаготерапия, антибиотикорезистентность, *Pseudomonas aeruginosa*

DOI: 10.31857/S0026365624040126

На сегодняшний день бактериальные инфекции являются одной из острых проблем в сфере здравоохранения (Mielko et al., 2019). Эволюционное давление, создаваемое активным использованием антибактериальных препаратов, приводит к кумулятивному приобретению устойчивости к антибиотикам у патогенов, способствуя появлению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). *Pseudomonas aeruginosa* вызывает тяжелые инфекции благодаря различным факторам вирулентности, а также способности формировать биопленки (Linlin et al., 2023). Перспективным решением данной проблемы является использование бактериофагов как отдельно, так и в сочетании с антимикробными препаратами, что позволит снизить общее количество используемых антибиотиков в клинической практике (Guo et al., 2020). Особенностью бактериофагов является их специфичность к бактериям-мишеням, что значительно снижает негативное влияние антимикробных препаратов на основе бактериофагов на нормальную микрофлору человека. Кроме того, бактериофаги показали многообещающие результаты при лечении устойчивых к антибиотикам инфекций *P. aeruginosa* (Rosa et al., 2021). Доказано,

что применение литических бактериофагов является эффективным подходом против антибиотикорезистентных бактерий, так как специфичность бактериофагов не зависит от устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам (Kortright et al., 2019). Помимо клинической практики, бактериофагов предложено использовать для устранения бактериальных загрязнений с поверхностей пищевых продуктов (Enderesen et al., 2020).

В данной работе приводится характеристика нового бактериофага *Pseudomonas* phage Ka1, выделенного из воды притока озера Байкал, около места сброса очищенных сточных вод г. Слюдянка, а также повышение эффективности ципрофлоксацина, имипинема и меропинема при их совместном применении с бактериофагом в отношении *P. aeruginosa*.

Используемые штаммы. В работе использовали типовые штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* 190158. Клинические изоляты *P. aeruginosa*, полученные от пациентов с низкой эффективностью противомикробной терапии, были предоставлены Казанским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии.

Бактериофаг *Pseudomonas* phage Ka1 был выделен в районе поступления очищенных сточных вод в приток озера Байкал.

Питательные среды и условия культивирования бактерий. Использовали питательную среду LB (Sambrook et al., 1989) (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 1.5; pH 8.0 (агаризованная среда LB содержала дополнительно 1.5% агара) и полужидкую агаризованную среду (Ames, 1971) (г/л): агар – 6; NaCl – 6. Антимикробные препараты – гентамицин, амикацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, цефтриаксон, стрептомицин, эритромицин, азитромицин, ванкомицин, имипенем, меропенем и колистин – были приобретены в компании Sigma (США).

Получение фаголизата. В стерильную пробирку из зоны лизиса собирали слой верхнего полужидкого агара и ресуспендировали в 15 мл раствора 0.9% NaCl. Полученный раствор центрифугировали при 10 тыс. об./мин и супернатант фильтровали через шприцевой мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Полученный фаголизат хранили при 4°C.

Подсчет БОЕ бактериофагов. Подсчет БОЕ бактериофага проводили по методу Грациа (Gratia, 1936) с модификациями (Mazzocco et al., 2009). Для этого в лунки стерильного 96-луночного планшета вносили по 90 мкл 0.9% NaCl. В первую лунку добавляли 10 мкл фаголизата и в последующих лунках готовили серийные 10-кратные разведения фаголизата в стерильном физиологическом растворе. После чего из каждой лунки по 15 мкл суспензии вносили к 1 мл полужидкого агара, содержащего *P. aeruginosa* (10^7 КОЕ/мл), и заливали на поверхность плотной питательной среды в 35-мм чашки Петри. БОЕ подсчитывали из чашек, содержащих минимум 5 блюшек, умножая на коэффициент разведения.

Оценка чувствительности бактерий к бактериофагу. Способность фага лизировать клинические изоляты тестировали с помощью спот-теста, как описано в работе (Fong et al., 2009), с объемом капли 5 мкл. Для этого на чашки с питательной средой LA наносили 3 мл полужидкого LA, содержащего 30 мкл ночной культуры *P. aeruginosa* (10^7 КОЕ/мл). После застывания среды наносили капли фагового лизата объемом 5 мкл с концентрацией 10^8 БОЕ/мл, просушивали 15 мин и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Затем проводили оценку чувствительности по шкале: полная активность (++) – полностью прозрачное (не мутное) пятно, внутри которого не наблюдается роста бактерий; частичная активность (+) – мутное пятно, которое легко видно невооруженным глазом, или прозрачное пятно, содержащее изолированные колонии бактерий; отсутствие активности (–) – отсутствие легко различимого пятна невооруженным глазом. Все анализы блюшек проводили в трех биологических повторах.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Определение чувствительности изолятов *P. aeruginosa* к антибиотикам проводили на среде Мюллер-Хинтон (“Sigma”, США), согласно рекомендациям EUCAST (Leclercq et al., 2013), методом микроразведений при сочетании препаратов с бактериофагом или диско-диффузионным методом с использованием стандартных дисков с антибактериальными препаратами (Научно-исследовательский центр фармакотерапии (НИЦФ), г. Санкт-Петербург) при оценке спектра чувствительности изолята к антибиотикам.

Секвенирование и анализ генома. Shortgun-секвенирование с двуконцевыми прочтениями проводили на платформе Illumina MySeq. Качество прочтений после секвенирования ДНК бактериофага оценивали с помощью программы FastQC (Andrews, 2010), кольцевой геном был собран с помощью SnapGen DNA. Геном был аннотирован с помощью сервера Prokka (Seemann, 2014), распределение генов по функциональным категориям было проведено с помощью сервера RAST (Aziz et al., 2008). Идентифицированные рамки считывания белков бактериофага были верифицированы вручную с использованием алгоритма BLAST, сравнивая с базой данных NCBI GenPept.

Характеристика бактериофага *Pseudomonas* phage Ka1. Из притока озера Байкал в зоне сброса сточных вод вблизи г. Слюдянка был выделен изолят Ka1, способный лизировать клетки *P. aeruginosa* ATCC 27853. ДНК изолята была выделена с помощью коммерческого набора Viral RNA/DNA Mini Kit (“Invitrogen”) и проведено shortgun-секвенирование с двуконцевыми прочтениями на платформе Illumina MySeq. После удаления прочтений, относящихся к геному *P. aeruginosa* ATCC 27853, выход секвенирования составил 14.952 Мб. На основе оставшихся прочтений был собран кольцевой геном размером 46092 п.о. с уровнем ошибки 0.0028 и покрытием $316\times$, с 50%-ым содержанием Г + Ц пар. Сравнение генома с помощью алгоритма BLAST с базой данных GenBank выявило максимальную идентичность в 95.14% при покрытии 79% с геномом *Pseudomonas* phage PSA37 (AN MZ089740.1) рода *Bruynoghevirus* из класса *Caudoviricetes*. Выравнивание геномов бактериофагов Ka1 и PSA37 алгоритмом ClustalO показало 91% идентичности геномов, что позволяет утверждать, что выделен новый представитель Luz24-подобных фагов (*Bruynoghevirus*).

Полный кольцевой геном размером 46092 п.о. задепонирован в Генбанке, AN OP455935.1. В результате аннотации генома идентифицирована 71 кодирующая последовательность (табл. S1). Из них 34 кодируют гипотетические полипептиды с неизвестной функцией. Выявлено 6 генов метаболизма аминокислот, 4 гена кодируют белки с нуклеазной активностью, 11 генов участвуют

Таблица 1. Чувствительность к бактериофагу Ka1 и профиль устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов *P. aeruginosa*. Данные приведены из трех биологических повторов

Штамм/изолят <i>P. aeruginosa</i>	Резистентность к антимикробным препаратам	Чувствительность к бактериофагу ("++" – выраженный лизис, "+" – слабый лизис, "–" лизис не наблюдается)
1475	Л-R, Ц-R, Цаз-R, Г-R	–
293	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	+
305	Аз-R, Азл-R, Л-R, Г-R, П-R, Т-R, Цаз-R	–
449	Азл-R, Аз-R, П-R, Цаз-R	++
458	Г-R, Азл-R, Аз-R, П-R, Цаз-, Т-R	+
278	Аз-R, Азл-R, Г-R, П-R, Цаз-R	+
288	Азл-R, Аз-R, П-R, Цаз-R, Г-R	–
410	Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	++
443	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R, Т-R	–
250	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	–
4086	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	+
4241	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	+
3101	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	+

Условные обозначения: Азлоциллин – Азл, Азтреонам – Аз, Гентамицин – Г, Левофлоксацин – Л, Меропенем – М, Пиперацилин – П, Тобрамицин – Т, Цефтазидим – Цаз.

в обмене нуклеиновых кислот, 20 генов кодируют структурные белки капсида и хвоста, 3 гена отвечают за синтез тРНК. При этом в геноме отсутствуют гены интегразы, транспозазы и рекомбиназы – потенциальных белков, связанных с переходом к лизогенному жизненному циклу. Также не идентифицируются гены литических ферментов, возможно, они входят в состав 34 белков с неизвестной функцией (рис. S1, табл. S1).

Оценка штаммоспецифичности бактериофага *Pseudomonas phage Ka1*. Следующим этапом была проведена оценка чувствительности различных типовых штаммов и клинических изолятов *P. aeruginosa* к бактериофагу Ka1 с помощью спот-теста с объемом капли 5 мкл (табл. 1). Все типовые штаммы оказались чувствительными к бактериофагу, при этом среди клинических изолятов только 62% штаммов (8 из 13) поддавались лизису (полная или частичная активность). Это говорит об узкой специфичности бактериофага к штаммам синегнойной палочки. При этом штаммы с множественной устойчивостью (изоляты 1475, 305, 410, 443, 293, 4086, 4241, 3101) также подвергаются лизису, хоть и с частичной активностью (табл. 1).

Следующим этапом с помощью метода серийных разведений исследовали синергетический эффект бактериофага Ka1 с 13 антимикробными препаратами: гентамицин, амикацин, цiproфлоксацин, норфлоксацин, цефтриаксон, цефтазидим, стрептомицин, эритромицин, азитромицин, ванкомицин, имипенем, меропенем и колистин. При сочетании с бактериофагом МПК гентамицина, цiproфлоксацина, имипенема и меропенема

снижались в 4–8 раз по сравнению с МПК чистого антибиотика, что свидетельствует о синергизме бактериофага с данными противомикробными препаратами (табл. 2).

В совокупности эти данные позволяют предположить, что бактериофаг Ka1 может быть

Таблица 2. Изменение минимальной подавляющей концентрации антибактериальных препаратов при сочетанном действии с бактериофагом Ka1. Приведены медианные значения из трех биологических повторов

Антибиотик	МПК, мкг/мл		
	– Ka1	+ Ka1	Уменьшение МПК
Гентамицин	2	0.5	4
Амикацин	2	1	2
Цiproфлоксацин	32	4	8
Норфлоксацин	>64	32	2
Цефтриаксон	>64	64	1
Цефтазидим	1	0.5	2
Азитромицин	>64	>64	1
Стрептомицин	>64	>64	1
Эритромицин	>64	>64	1
Ванкомицин	>64	>64	1
Имипенем	>64	16	4
Меропенем	>64	8	8
Колистин	8	4	2

предложен в качестве инструмента для повышения противомикробной активности имеющихся антибиотиков против *P. aeruginosa*, обладающих различным паттерном резистентности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения задания в сфере научной деятельности, Проект № FZSM2022-0017 (Е.Ю. Тризна), и госбюджетного проекта № 0279-2021-0015 (В.В. Дрюккер).

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

Ф.М.С., Г.А.Э., И.В.Н., Я.Л.Л. – экспериментальные процедуры, К.А.Р., Т.Е.Ю., Д.В.В., Г.А.С. – руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ames B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria // *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*. V. 1. Boston, MA: Springer US, 1971. P. 267–282.

Andrews S., Krueger F., Segonds-Pichon A., Biggins L., Krueger C., Wingett S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.

Aziz R., Bartels D., Best A., DeJongh M., Disz T., Edwards R., Formsma K., Gerdes S., Glass E., Kubal M., Meyer F., Olsen G., Olson R., Osterman A., Overbeek R., McNeil L., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch I G., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. Art. 75. P. 1–15.

Endersen L., Coffey A. The use of bacteriophages for food safety // *Curr. Opin. Food Sci.* 2020. V. 36. P. 1–8.

Ferry T., Kolenda C., Laurent F., Leboucher G., Merabishvili M., Djebara S., Gustave C.-A., Perpoint T., Barrey C., Pirnay J.-P., Resch G. Personalized bacteriophage

therapy to treat pandrug-resistant spinal *Pseudomonas aeruginosa* infection // *Nature Commun.* 2022. V. 13. Art. 4239.

Fister S., Mester P., Witte A.K., Sommer J., Schoder D., Rossmanith P. Part of the problem or the solution? Indiscriminate use of bacteriophages in the food industry can reduce their potential and impair growth-based detection methods // *Trends Food Sci. Technol.* 2019. V. 90. P. 170–174.

Fong P., Boss D., Yap T., Tutt A., Wu P., Mergui-Roelvink M., Mortimer P., Swaisland H., Lau A., O'Connor M., Ashworth A., Carmichael J., Kaye S., Schellens J., de Bono J. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers // *New England J. Med.* 2009. V. 361. P. 123–134.

Gratia A. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophages // *Annales de l'Institut Pasteur*. Masson Publishing, France, 1936. T. 57.

Guo Z., Lin H., Ji X., Yan G., Lei L., Han W., Gu J., Huang J. Therapeutic applications of lytic phages in human medicine // *Microb. Pathogen.* 2020. V. 142. Art. 104048.

Kayumov A., Khakimullina E., Sharafutdinov I., Trizna E., Latypova L., Lien H., Margulis A., Bogachev M., Kurbangaliev A. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones // *J. Antibiot.* 2015. V. 68. P. 297–301.

Kortright K., Chan B., Koff J., Turner P. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria // *Cell Host & Microbe*. 2019. V. 25. P. 219–232.

Leclercq R., Canton R., Brown D., Giske C., Heisig P., MacGowan A., Mouton R., Nordmann P., Rodloff A., Rossolini G., Soussy C.-J., Steinbakk M., Winstanley T., Kahlmeter G. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing // *Clin. Microbiol. Infect.* 2013. V. 19. P. 141–160.

Li L., Zhong Q., Zhao Y., Bao J., Liu B., Zhong Z., Wang J., Yang L., Zhang T., Cheng M., Wu N., Zhu T., Le S. First-in-human application of double-stranded RNA bacteriophage in the treatment of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection // *Microb. Biotechnol.* 2023. V. 16. P. 862–867.

Mazzocco A., Waddell T., Lingohr E., Johnson R. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system // *Bacteriophages: methods and protocols*. V. 1: Isolation, characterization, and interactions. 2009. P. 81–85.

Mielko K., Jabłoński S., Milczewska J., Sands D., Łukasiewicz M., Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 35. P. 1–11.

La Rosa R., Rossi E., Feist A., Johansen H., Molin S. Compensatory evolution of *Pseudomonas aeruginosa*'s slow growth phenotype suggests mechanisms of adaptation in cystic fibrosis // *Nature Commun.* 2021. V. 12. Art. 3186.

Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2nd edn.

Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2068–2069.

New Bacteriophage *Pseudomonas* Phage Ka1 from a Trivia of Lake Baikal

M. S. Fedorova^{1, *}, A. E. Gatina¹, V. N. Ilyina¹, L. L. Yadykova¹,
V. V. Dryukker², A. S. Gorshkova², A. R. Kayumov¹, and E. Yu. Trizna¹

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

²Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 664033, Irkutsk, Russia

*e-mail: MaSFedorova97@mail.ru

Received October 14, 2023; revised November 02, 2023; accepted December 12, 2023

Abstract—The bacteriophage *Pseudomonas* phage Ka1 was isolated from the water of a tributary of Lake Baikal, in the area of discharge of treated wastewater in the city of Slyudyanka. The bacteriophage genome is 46,092 bp in size. and 50% composition of G + C pairs (AN OP455935.1) has 91% identity with the genome of *Pseudomonas* phage PSA37, belonging to the *Bruynoghevirus* from the class *Caudoviricetes*, which characterizes it as a new representative of Luz24-like phages (*Bruynoghevirus*). The bacteriophage lyses 62% of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and is able to increase the effectiveness of gentamicin, ciprofloxacin, imipinem and meropenem by 4–8 times against this bacterium. Integrases, transposases and recombinases are not identified in the genome, which makes *Pseudomonas* phage Ka1 possible for use in complex therapy of infections caused by *P. aeruginosa*.

Keywords: bacteriophage, phage therapy, antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

**НОВЫЙ БАКТЕРИОФАГ *PSEUDOMONAS* PHAGE KA1
ИЗ ПРИТОКА ОЗЕРА БАЙКАЛ**

© 2024 г. М. С. Федорова^{a, *}, А. Э. Гатина^a, В. Н. Ильина^a, Л. Л. Ядыкова^a,
В. В. Дрюккер^b, А. С. Горшкова^b, А. Р. Каюмов^a, Е. Ю. Тризна^a

^aКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

^bЛимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

*e-mail: MaSFedorova97@mail.ru

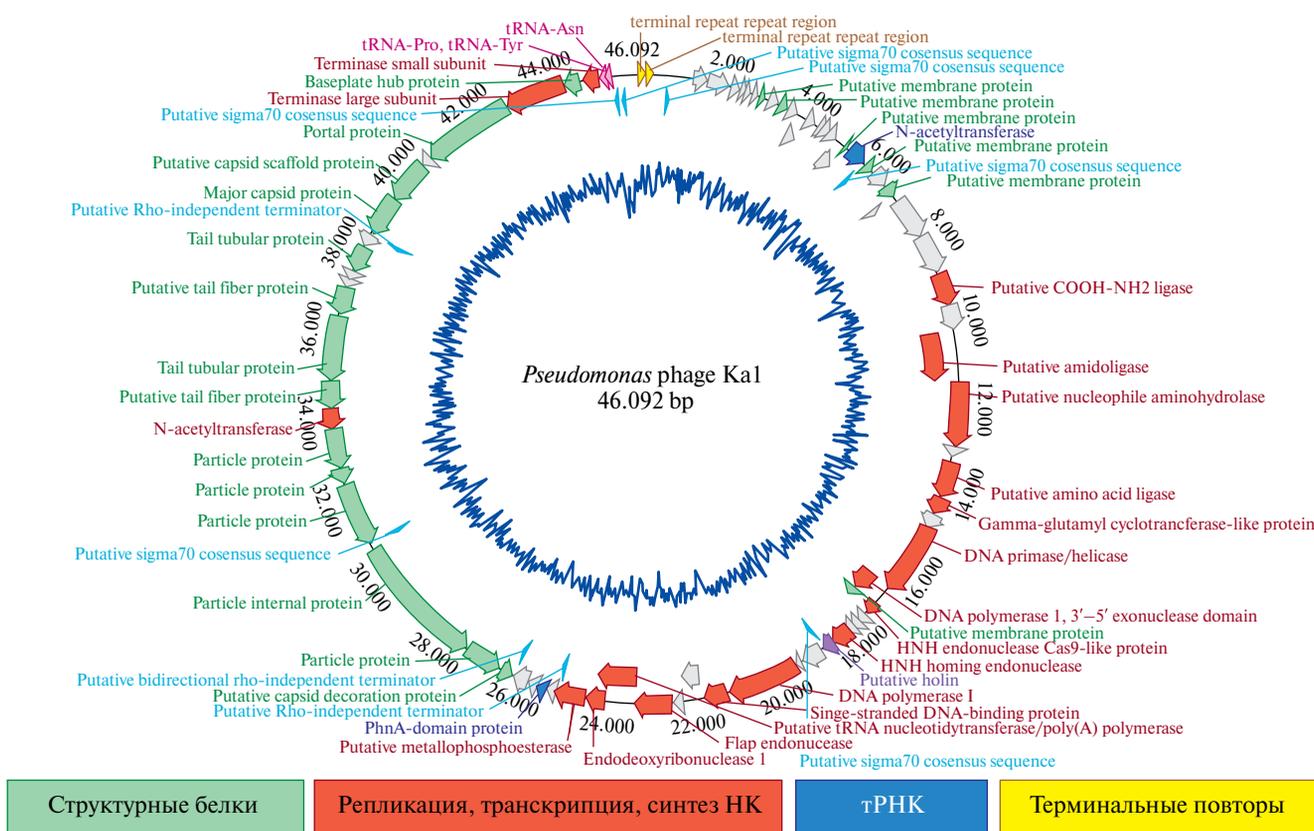


Рис. S1. Круговая диаграмма кодирующих последовательностей генома *Pseudomonas*

Таблица S1. Распределение генов бактериофага по функциональным категориям с помощью сервера RAST

Количество генов	Описание
2	Терминальный повтор
34	Гипотетический белок с неизвестной функцией
1	Аминокислотная лигаза
1	Гамма-глутамилциклотрансфераза
1	Гамма-глутамилциклотрансфераза
1	Амидолигаза
1	Нуклеофил-аминогидролаза
1	СООН-NH ₂ лигаза
1	Хеликаза/ДНК праймаза
2	ДНК-полимераза 1
1	N-N-N эндонуклеаза Cas9-подобный белок
6	Гипотетический мембранный белок
1	N-N-N эндонуклеаза самонаведения
1	Холин
1	Белок, связывающий одноцепочечную ДНК
1	Лоскутная (flap) эндонуклеаза
1	Нуклеотидилтрансфераза трнк/полиадениловая полимераз
1	Эндодезоксирибонуклеаза I
1	Металлофосфоэстераза
2	Rho-независимый терминатор
1	Фосфоацетатгидролаза
1	Двусторонний Rho-независимый терминатор
20	Структурные белки капсида и хвоста
2	N-ацетилтрансфераза
1	Крупная субъединица терминазы
1	Малая субъединица терминазы
1	Пролин-тРНК,
1	Тирозин-тРНК
1	Аспаргат-тРНК

УДК 579.22+57.044+577.344+577.343

ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ СЛОЖНЫХ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2024 г. А. Ю. Шишкин^а, В. Ф. Смирнов^{а, *}, И. А. Шалагинова^б, П. В. Корниенко^б,
О. Н. Смирнова^а, Н. А. Аникина^а, А. В. Корягин^а, Е. В. Сулейманов^а

^аНижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603022, Россия

^бАО «Научно-исследовательский институт химии и технологии полимеров

имени академика В.А. Каргина с опытным заводом», Дзержинск, 606000, Россия

*e-mail: biodeg@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 25.12.2023 г.

Принята к опубликованию 25.12.2023 г.

Исследована противогрибковая активность новых субмикронных частиц сложного оксида металлов CsTeMoO₆. Показано, что они способны оказывать ингибирующее действие на споры микромицетов – активных деструкторов промышленных материалов в условиях воздействия света и темноты. При действии света фунгицидность исследуемых соединений усиливалась, что связано с наличием у них фотокаталитической активности. Впервые были получены композиции ряда полимерных материалов, обладающие устойчивостью к действию микроскопических грибов за счет введения в их состав сложных оксидов металлов CsTeMoO₆ и RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆. Установлено, что ранее неустойчивые к действию микромицетов материалы проявили свойства стойкости к грибным поражениям в условиях воздействия света и темноты. При воздействии света противогрибковый эффект был выражен в большей степени.

Ключевые слова: сложные оксиды металлов, грибостойкие полимерные композиции, микроскопические грибы, фотокаталитическая активность, противогрибковая активность

DOI: 10.31857/S0026365624040136

Различные промышленные материалы и изделия из них в процессе эксплуатации, транспортировки и длительного хранения способны подвергаться процессам микробиологических повреждений и разрушений. Основными агентами биоповреждений являются микроскопические грибы. Лабильность и разнообразие метаболизма позволяет этой группе живых организмов использовать в качестве источника питания самые разнообразные субстраты, как природного, так и синтетического происхождения (Shah et al., 2008; Folino et al., 2020). Основным способом защиты промышленных материалов от биоповреждений, вызываемых грибами, является введение в состав композиций различных биоцидных присадок. Учитывая высокие адаптационные способности грибов, арсенал биоцидных соединений все время обновляется. В последнее время в качестве средств защиты материалов от биоповреждений используются оксиды металлов (WO₃, TiO₂, Al₂O₃ и т.д.) (Svetlakova et al., 2021; Tan et al., 2021). Интерес к этим соединениям вызван тем, что

многие из них в форме нано- и субмикронных частиц способны проявлять фотокаталитическую активность, и их биоцидный эффект возрастает в условиях действия света. Это связано с образованием под действием света активных форм кислорода, которые негативно влияют на жизнедеятельность микроорганизмов, и общая антимикробная активность возрастает (т.е. работает в этом случае два механизма подавления жизнедеятельности микроорганизмов: темновой и световой) (Sichel et al., 2007; Ye et al., 2010). Такой эффект позволяет рассматривать использование исследуемых соединений в качестве средств защиты промышленных материалов от микробиологических повреждений с учетом возрастания их биоцидного действия на свету.

Биоцидный эффект фотокаталитически активных микрочастиц оксидов металлов зависит от ряда факторов: размера и формы частиц, их концентрации, волнового спектра и интенсивности источника света, природы металлов, вида биологического объекта.

Недостатком простых оксидов металлов является то, что их фотокаталитическая активность проявляется в условиях воздействия ультрафиолета. В связи с этим в НИИХ ННГУ были разработаны новые сложные оксиды металлов, проявляющие данную активность в спектре солнечного света.

Целью настоящей работы было изучение противогрибкового действия новых сложных оксидов тяжелых металлов и использование их для получения полимерных композиций (ранее не грибоустойчивых), устойчивых к биоповреждениям, вызываемых микроскопическими грибами.

В качестве объекта исследований использовали сложные оксиды CsTeMoO_6 со средним диаметром частиц 670 нм и $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ со средним диаметром частиц 736 нм. Соединения CsTeMoO_6 и $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ были получены и описаны ранее (Fukina et al., 2021; 2022a; 2022b).

В качестве источника света использовали светодиодный прожектор JAZZWAY PFL-C3 мощностью 50 Вт. Поверхностная плотность потока излучения светодиодного прожектора, воздействующая на поверхность образцов соединений, составляла 524 Вт/м^2 .

В качестве тест-культур микроорганизмов для оценки противогрибковой активности субмикронных частиц сложных оксидов металлов использовали штаммы *Aspergillus niger* van Tieghem ВКМF-1119, *Penicillium chrysogenum* Thom ВКМ F-245. Для оценки грибоустойчивости полимерных композиций в качестве тест-культур были выбраны штаммы, которые наиболее часто используются в исследованиях при оценке устойчивости к действию микроскопических грибов промышленных и строительных материалов: *A. niger* van Tieghem ВКМF-1119, *A. terreus* Thom ВКМ F-1025, *Alternaria alternata* Keissler ВКМ F-1120, *P. chrysogenum* Thom ВКМ F-245, *P. cyclopium* Westling ВКМ F-265, *P. funiculosum* Thom ВКМ F-1115, *Fusarium moniliforme* Sheklon ВКМ F-136. Все культуры получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ИБФМ РАН, Пушкино).

Для оценки действия света на противомикробную активность исследуемых соединений готовили суспензию спор грибов (с титром 1×10^4 кл./мл) в стерильной дистиллированной воде. Опытные варианты с исследуемыми соединениями (концентрация частиц 2 мг/мл) помещали в стеклянные бюксы с 10 мл суспензии микроорганизмов на орбитальные шейкеры при 150 об./мин и часть из них подвергали воздействию света, а другие выдерживали в условиях темноты. Время экспозиции составляло 60, 120 и 180 мин. Контрольными служили варианты эксперимента без исследуемого соединения. Антимикробное действие препаратов на споры грибов оценивали по изменению титра микроорганизмов по истечении времени

экспозиции, которое определяли чашечным методом (метод Коха) путем посева 0.1 мл суспензии грибов на агаризованную среду Чапека–Докса с последующим учетом количества выросших колоний грибов.

Соединения CsTeMoO_6 и $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ в концентрации 0.5% масс. были введены в состав водных акриловых эмульсий марок Лакротэн Э–21, Лакротэн Э–31, в водоэмульсионную краску ВДАК, а также в органическое стекло на основе полиметилметакрилата (ПММА).

Для оценки устойчивости к действию мицелиальных грибов образцы твердых полимерных композиций (пластины размером 30×30 мм) и жидких в количестве 3 мл как с введенными присадками, так и без них помещали на дно чашки Петри, контаминировали водной суспензией спор грибов с титром 1×10^6 кл./мл и размещали в климатических камерах на 28 сут в условиях, оптимальных для их роста (влажность более 90%, температура 28°C). Грибоустойчивость оценивалась по интенсивности развития грибов на образцах по 6-балльной шкале ГОСТ 9.048-89: 0 баллов – под микроскопом прорастания спор и конидий не обнаружено; 1 балл – под микроскопом видны проросшие споры и незначительно развитый мицелий; 2 балла – под микроскопом виден развитый мицелий, возможно спороношение; 3 балла – невооруженным глазом мицелий и (или) спороношение едва видны, но отчетливо видны под микроскопом; 4 балла – невооруженным глазом отчетливо видно развитие грибов, покрывающих менее 25% испытываемой поверхности; 5 баллов – невооруженным глазом отчетливо видно развитие грибов, покрывающих более 25% испытываемой поверхности (Smirnov et al., 2018). Грибоустойчивыми считаются образцы, получившие оценку 1–2 балла. Контрольные образцы (без биоцидных добавок) и часть образцов с введенными биоцидными добавками находились в условиях темноты, другая часть исследуемых образцов с введенными добавками в течение всего срока эксперимента в течение 12 ч в сутки подвергалась воздействию света (характеристики источника света указаны выше).

Все экспериментальные результаты обрабатывались с применением непараметрического критерия “U” (Манна–Уилтни) с поправкой Холма.

На первом этапе для оценки влияния микрочастиц фотокаталитически активного оксида тяжелых металлов CsTeMoO_6 в условиях темноты и при воздействии светового излучения на споры грибов в качестве тест-культур использовали *P. chrysogenum* и *A. niger* (рис. 1). Для сравнительного анализа влияния природы металла в оксидах на их антимикробные свойства на рис. 1б приведены результаты ранее проведенных нами аналогичных исследований сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ (Smirnov et al., 2022).

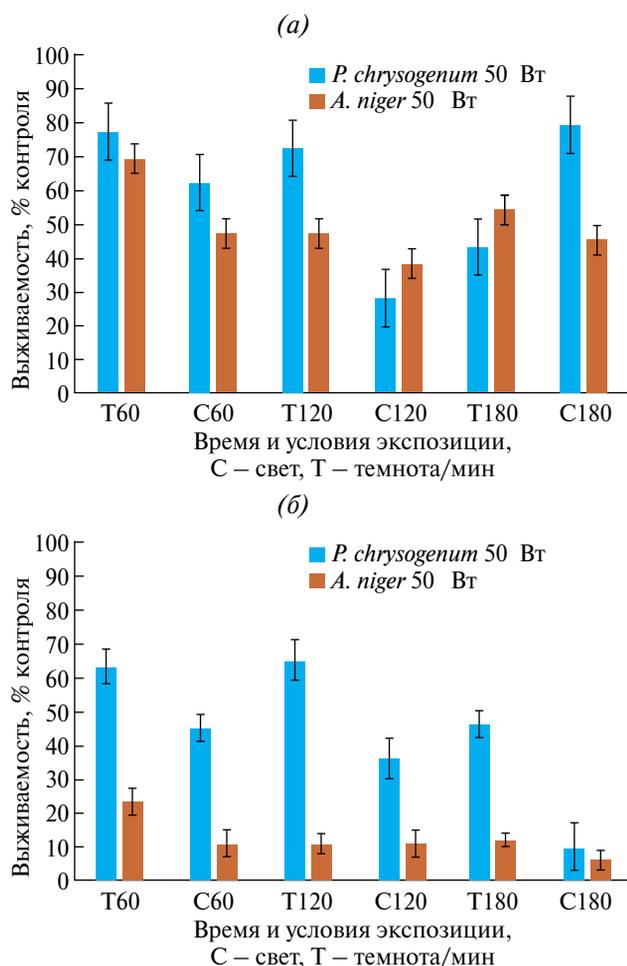


Рис. 1. Выживаемость спор грибов *P. chrysogenum* и *A. niger* в присутствии CsTeMoO₆ (а) и RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆ (б) в условиях темноты (Т) и при воздействии источника света (С) в % по отношению к контролю.

Представленные сложные оксиды металлов отличались тем, что вместе с Те, присутствующим в обоих соединениях, в состав первого входили Сs и Мо, а в состав второго – Rb и W.

Показано, что в условиях темноты соединения CsTeMoO₆ и RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆ способны подавлять выживаемость спор грибов *P. chrysogenum* и *A. niger*.

Однако можно отметить, что влияние на споры гриба *A. niger* обоих соединений без воздействия света более выраженное по сравнению с *P. chrysogenum*. Под воздействием света противогрибковая активность исследуемых оксидов металлов по отношению к спорам грибов увеличивалась. Сравняя антимикробную активность двух сложных оксидов тяжелых металлов, можно отметить, что соединение RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆ обладает более выраженной способностью подавлять выживаемость спор грибов как в условиях темноты, так и под воздействием света.

Известно, что без воздействия света нано- и субмикронные частицы тяжелых металлов могут вызывать гибель микроорганизмов, т.е. проявлять антимикробный эффект. Нано- и субмикронные частицы могут не только приводить к разрушению клеточной стенки микроорганизмов за счет электростатических взаимодействий с ней, но и, проникая затем внутрь клетки, повреждать органеллы (митохондрии и рибосомы), а вызывая конденсацию и маргинацию хроматина, приводить к апоптотической гибели клетки. Также наночастицы, проникшие в клетку микроорганизмов и связавшиеся с транспортными белками, нарушают работу протонных насосов, инактивацию фосфор- и серосодержащих ферментов и ДНК. Большую роль наночастицы играют в ингибировании АТФ и в уменьшении количества копий гена бактериальной 16S рДНК. Токсичность ряда нано- и субмикронных частиц оксидов тяжелых металлов, в том числе по отношению к мицелиальным грибам, возрастает на свету, что связано с их фотокаталитической активностью, в результате чего образуются активные формы кислорода (АФК), способные ингибировать жизнедеятельность микроорганизмов (Meraat et al., 2016; Xia et al., 2016; Yu et al., 2020).

В связи с тем, что исследуемые оксиды тяжелых металлов проявили антимикробные свойства, представляло интерес исследовать возможность их использования в качестве биоцидных присадок для защиты полимерных композиций от микробиологических повреждений. Учитывая, что наиболее активными агентами биоповреждений являются микроскопические грибы, нами оценивалась грибостойкость полимерных композиций.

Таблица 1. Природная грибостойкость (без введенных биоцидных присадок) ряда полимерных материалов на основе акрилатов

Материал	Грибостойкость, балл (по ГОСТ 9.048)						
	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Alt. alternata</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. cyclopium</i>	<i>P. funiculosum</i>
Лакротэн Э-21	2	3	4	5	2	3	5
Лакротэн Э-31	2	3	2	5	2	3	5
ПММА	3	3	2	3	3	2	2
ВДАК	2	3	2	3	2	2	2

Таблица 2. Грибостойкость материалов с введенными в их состав микрочастицами $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ и CsTeMoO_6 в темноте и в условиях воздействия светового излучения

Материал	Сложный оксид (0.5% масс.)	Условия экспозиции	Грибостойкость, балл (по ГОСТ 9.048)		
			<i>F. moniliforme</i>	<i>A. terreus</i>	<i>P. funiculosum</i>
Лакротэн Э-21	—	—	5	3	5
	$\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$	Свет	3	0	2
		Темнота	4	2	4
	CsTeMoO_6	Свет	3	1	1
		Темнота	4	1	1
	Лакротэн Э-31	—	—	5	3
$\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$		Свет	3	0	3
		Темнота	4	2	2
CsTeMoO_6		Свет	3	1	1
		Темнота	4	1	1
ПММА		—	—	3	3
	$\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$	Свет	1	0	0
		Темнота	2	2	1
	CsTeMoO_6	Свет	0	0	0
		Темнота	2	1	0
	ВДАК	—	—	3	3
$\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$		Свет	1	0	0
		Темнота	2	2	1
CsTeMoO_6		Свет	0	0	0
		Темнота	2	1	2

С этой целью нами были выбраны различные группы полимерных материалов, у которых была оценена природная грибостойкость, т.е. возможность их использования грибами в качестве единственного источника питания (табл. 1).

Согласно результатам этой серии экспериментов установлено, что все исследованные материалы являются негрибостойкими и в неодинаковой степени могут использоваться в качестве источника питания разными грибами. Анализ данных показал, что грибы-биодеструкторы *A. niger*, *P. chrysogenum*, используемые нами ранее в экспериментах, не вызывают наиболее интенсивное биоповреждение. В связи с этим при оценке устойчивости к действию микромицетов материалов с введенными в их состав субмикронными частицами были использованы иные тест-культуры, которые проявили наиболее интенсивный рост на исследуемых материалах, а именно *F. moniliforme*, *A. terreus*, *P. funiculosum*.

В табл. 2 представлены результаты исследования устойчивости различных полимерных композиций с введенными в их состав сложными оксидами тяжелых металлов ($\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, CsTeMoO_6) к действию трех видов мицелиальных грибов — активных биодегрантов.

Результаты показали, что введение исследуемых соединений в состав полимерных композиций

придавало ранее негрибостойким материалам свойства грибостойкости как в темноте, так и на свету. Отмечено, что при воздействии света устойчивость к действию грибов всех полимерных композиций увеличивалась.

Таким образом, исследуемые нами сложные оксиды металлов могут быть использованы в качестве биоцидных добавок, придающих устойчивость к действию грибов полимерным композициям с учетом возрастания их противогрибковой активности при действии света.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (базовая часть Госзадания, проект FSWR-2023-0024) с использованием оборудования ЦКП “Новые материалы и ресурсосберегающие технологии” (ННГУ им. Н.И. Лобачевского).

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

- Folino A., Karageorgiou A., Calabrò P.S., Komilis D.* Biodegradation of wasted bioplastics in natural and industrial environments: a review // *Sustainability*. 2020. V. 12. Art. 6030.
- Fukina D.G., Suleimanov E.V., Boryakov A.V., Zubkov S.Y., Koryagin A.V., Volkova N.S., Gorshkov A.P.* Structure analysis and electronic properties of $\text{ATe}^{4+}_{0.5}\text{Te}^{6+}_{1.5-x}\text{M}^{6+}_x\text{O}_6$ (A = Rb, Cs, M^{6+} = Mo, W) solid solutions with β -pyrochlore structure // *J. Solid State Chem.* 2021. V. 293. Art. 121787.
- Fukina D.G., Koryagin A.V., Koroleva A.V., Zhizhin E.V., Suleimanov E.V., Volkova N.S., Kirillova N.I.* The role of surface and electronic structure features of the CsTeMoO_6 β -pyrochlore compound during the photooxidation dyes process // *J. Solid State Chem.* 2022 (a). V. 308. Art. 122939.
- Fukina D.G., Koryagin A.V., Volkova N.S., Suleimanov E.V., Kuzmichev V.V., Mitin A.V.* Features of the electronic structure and photocatalytic properties under visible light irradiation for $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ with β -pyrochlore structure // *Solid State Sci.* 2022 (b). V. 126. Art. 106858.
- Meraat R., Ziabari A.A., Issazadeh K., Shadan N., Jalali K.M.* Synthesis and characterization of the antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against *Salmonella typhi* // *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*. 2016. V. 29. P. 601–608.
- Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S.* Biological degradation of plastics: a comprehensive review // *Biotechnol. Adv.* 2008. V. 26. P. 246–265.
- Sichel C., de Cara M., Tello J., Blanco J., Fernández-Ibáñez P.* Solar photocatalytic disinfection of agricultural pathogenic fungi: *Fusarium* species // *Appl. Catal. B: Environ.* 2007. V. 74. P. 152–160.
- Smirnov V.F., Glagoleva A.A., Mochalova A.E., Smirnova L.A., Anikina N.A.* The influence of factors of a biological and physical nature on the biodegradation and physicochemical properties of composites based on polyvinyl chloride and natural polymers // *Int. Polymer Sci. Technol.* 2018. V. 6. P. 283–288.
- Smirnov V.F., Smirnova O.N., Shishkin A. Yu., Anikina N.A., Fukina D.G., Koryagin A.V., Suleimanov E.V.* Effect of light on the antifungal activity of submicron particles based on tungsten oxide // *Nanobiotechnol. Rep.* 2022. V. 17. P. 444–456.
- Svetlakova A.V., Mendez M.S., Tuchin E.S., Khodan A.N., Traore M., Azouani R., Kanaev A., Tuchin V.V.* Study of the photocatalytic antimicrobial activity of nanocomposites based on $\text{TiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3$ under action of LED radiation (405 nm) on staphylococci // *Opt. Spectrosc.* 2021. V. 129. P. 846–850.
- Tan G., Tang D., Dastan D., Jafari A., Shi Z., Chu Q., Silva J.P., Yin X.* Structures, morphological control, and antibacterial performance of tungsten oxide thin films // *Ceramics Int.* 2021. V. 47. P. 17153–17160.
- Xia Z.K., Maa Q., Lia S., Zhanga D., Conga L., Tiana Y., Yang R.* The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii* // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2016. V. 49. P. 182–188.
- Ye S., Fan M., Song X., Luo S.* Enhanced photocatalytic disinfection of *P. expansum* in cold storage using a TiO_2/ACF film // *Int. J. Food Microbiol.* 2010. V. 136. P. 332–339.
- Yu Z., Li Q., Wang J., Yu Y., Wang Y., Zhou Q., Li P.* Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field // *Nanoscale Res. Lett.* 2020. V. 15. Art. 115.

Antifungal Activity of Submicrometer Particles of Complex Metal Oxides with Photocatalytic Activity

A. Yu. Shishkin¹, V. F. Smirnov^{1,*}, I. A. Shalaginova², P. V. Kornienko²,
O. N. Smirnova¹, N. A. Anikina¹, A. V. Koryagin¹, and E. V. Suleimanov¹

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, 603022 Russia

²Kargin Scientific Research Institute of Chemistry and Technology of Polymers with a Pilot-Production Plant, Dzerzhinsk, 606000 Russia

*e-mail: biodeg@mail.ru

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

Abstract. Antifungal activity of newly synthesized submicrometer particles of the CsTeMoO₆ complex metal oxide was studied. They were found to inhibit spore germination of active micromycete degraders of industrial materials both in the dark and under illumination. Illumination increased the fungicidal activity of the studied compounds due to their photocatalytic activity. This is the first report on production of micromycete-resistant compositions of a number of polymers containing the complex metal oxides CsTeMoO₆ and RbTe_{1.5}W_{0.5}O₆. Upon addition of the studied complex oxides into the composition of the previously micromycete-sensitive materials, the latter were found to exhibit micromycete resistance both in the dark and under illumination. Treatment with light resulted in a more pronounced antifungal effect.

Keywords: complex metal oxides, fungi-resistant polymer composites, microscopic fungi, photocatalytic activity, antifungal activity

УДК 579.64

ЭФФЕКТ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ НА МИКРОБИОТУ КИШЕЧНИКА И МОРФОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕПЕЛОВ

© 2024 г. Е. А. Гаврилова^{a, *}, О. С. Карасева^a, Я. М. Монир^a,
А. М. Ежкова^b, В. О. Ежков^b, Р. А. Волков^b, А. М. Сенина^a,
Д. Р. Хуснутдинова^a, Е. В. Никитина^{a, c}, Д. Р. Яруллина^a, А. Р. Каюмов^a

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

^bКазанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 420061, Казань, Россия

^cКазанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, 420015, Россия

*e-mail: Alalila@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.10.2023 г.

После доработки 23.12.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

В работе показан эффект внесения в корм перепелов биомассы *Lactiplantibacillus plantarum* AG10. У перепелов, получавших в течение семи недель пробиотическую кормовую добавку, отмечено значимое улучшение таких хозяйственных показателей, как динамика живой массы, масса потрошенной тушки и расход кормов на 1 кг прироста. С помощью анализа библиотек последовательностей генов 16S рРНК, секвенированных на платформе Illumina MiSeq, обнаружены сдвиги в микробиоте слепой кишки, которые могут способствовать улучшению морфолого-физиологических показателей перепелов.

Ключевые слова: перепела, пробиотик, кормовая добавка, лактобактерии

DOI: 10.31857/S0026365624040148

Перепеловодство является молодой отраслью российского сельского хозяйства. Развитию данного направления способствуют короткий период инкубации, скороспелость, маленькие размеры птиц, высокие яйценоскость и мясная продуктивность, вкусовые и диетические свойства мяса и яиц (Путивская, Норовяткин, 2022). Промышленное выращивание перепелов, как и другой сельскохозяйственной птицы, предполагает высокую плотность поголовья на малых площадях, что усиливает техногенную и антропогенную нагрузку на организм, приводит к снижению продуктивности и увеличивает летальность поголовья (Алиев и соавт., 2008). Обеспечить биологическую защиту и повысить продуктивность сельскохозяйственных птиц позволяют пробиотики – живые микроорганизмы, которые оказывают благотворное действие на организм (Hill et al., 2014). Пробиотики нормализуют микробиоценоз желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), оказывают иммуномодулирующее действие, повышают устойчивость организма к патогенным бактериям и вирусам, проявляют детоксикационные эффекты, стимулируют функциональное

состояние пищеварительной системы, синтезируют витамины, аминокислоты и ферменты, за счет чего улучшают конверсию кормов (Jha et al., 2020). В качестве пробиотиков в птицеводстве обычно используются представители родов *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, а также дрожжи *Candida* (Park et al., 2016). Известно, что пробиотические свойства лактобактерий видо- и даже штаммоспецифичны (Campana et al., 2017). В данной работе в качестве основы пробиотической кормовой добавки использовали штамм *Lactiplantibacillus plantarum* AG10, выделенный нами из силоса. Высокая антагонистическая активность, адгезивность, устойчивость к факторам ЖКТ и кислотообразующая активность позволяют отнести его к пробиотическим (Hill et al., 2014; Gavrilova et al., 2019).

Целью данной работы являлась оценка эффективности применения пробиотической добавки на основе биомассы *L. plantarum* AG10 в кормовом рационе перепелов.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 40 от 9 марта 2023 г.). Двухнедельных перепелов мясного направления

продуктивности породы Техасский белый с начальной живой массой около 150 г содержали в трехуровневых клетках с одинаковыми условиями освещенности и постоянным доступом к воде. Кормление осуществляли комбикормом ДК-52 для перепелов (АО “Богдановичский комбикормовый завод”, г. Богданович, Россия). Птицы опытной группы ($n = 8$) в течение семи недель ежедневно дополнительно получали 1 мл пробиотического препарата, который представлял собой биомассу отмытых от питательной среды клеток *L. plantarum* AG10, помещенных в концентрации 10^9 КОЕ/мл в питательную основу следующего состава (%): сухая молочная сыворотка – 10.0; дрожжевой экстракт – 1.0; сахароза – 0.5. Птицы контрольной группы ($n = 8$) получали питательную основу в той же концентрации.

В процессе опыта еженедельно фиксировали живую массу перепелов путем индивидуального взвешивания, биоконверсию корма рассчитывали путем деления потребленного корма на прирост массы тела на 44-ый день. Птиц выводили из эксперимента на девятой неделе жизни в технологический период их убоя на мясо, согласно Ветеринарным правилам убоя животных. Учитывали живую массу птицы, массу туши, брюшного жира, грудной мышцы и внутренних органов. Пробы крови из яремной вены анализировали на приборе ChemWell2902 (“Awareness” Technology, США) с использованием наборов SPINREACT S.A. (Испания). Содержимое слепой кишки перепелов использовали в качестве образцов для анализа кишечной микробиоты путем секвенирования переменных участков V3 и V4 гена 16S рРНК на приборе MiSeq (“Illumina”, США). Статистический анализ проводили с помощью программного пакета GraphPad Prism 6.0.

Использование в кормлении перепелов кормовой добавки на основе биомассы *L. plantarum* AG10

приводило к значимому улучшению таких хозяйственных показателей, как динамика живой массы и расход кормов на 1 кг прироста (рис. 1а, 1б, 1г). В опытной группе превышение по массе потрошенной тушки относительно контроля составило 13.1% ($p < 0.05$), а затраты кормов на 1 кг прироста снизились на 12.7% (3.5 кг).

У птиц, получавших пробиотическую добавку, масса мускульного желудка была на 18.9% больше ($p < 0.05$), чем у контрольных перепелов, питавшихся комбикормом без добавок (рис. 1в). Известно, что у бройлеров увеличение массы мышечного желудка коррелирует с улучшением пищеварительных функций и зоотехнических показателей, таких как живая масса и коэффициент конверсии корма. Хорошо развитый мышечный желудок лучше измельчает пищу, стимулирует перистальтику кишечника, способствует высвобождению холецистокинина, который стимулирует секрецию панкреатических ферментов и гастродуоденальные рефлексы (Полонский, Сумина, 2021). Возможно, с этой особенностью птиц опытной группы связано обнаруженное у них превышение содержания альбумина в крови и средней концентрации гемоглобина в крови и в эритроцитах относительно птиц контрольной группы (дополнительные материалы, табл. S1). Масса грудных мышц в опытной группе составила 54.1 ± 8.1 г и имела тенденцию к повышению по сравнению с контролем (48.1 ± 6.9 г), однако достоверной разницы не обнаружено ($p > 0.1$). Отношение массы грудных мышц к массе потрошенной тушки существенно не отличалось в двух группах (48.1 ± 6.9 и 54.1 ± 8.1 г). Масса сердца, печени и селезенки в возрасте 69 дней не отличались у птиц опытной и контрольной групп.

Абдоминальный жир служит важным показателем для качества тушек. Наряду с другими жировыми отложениями, он обуславливает сочность мяса

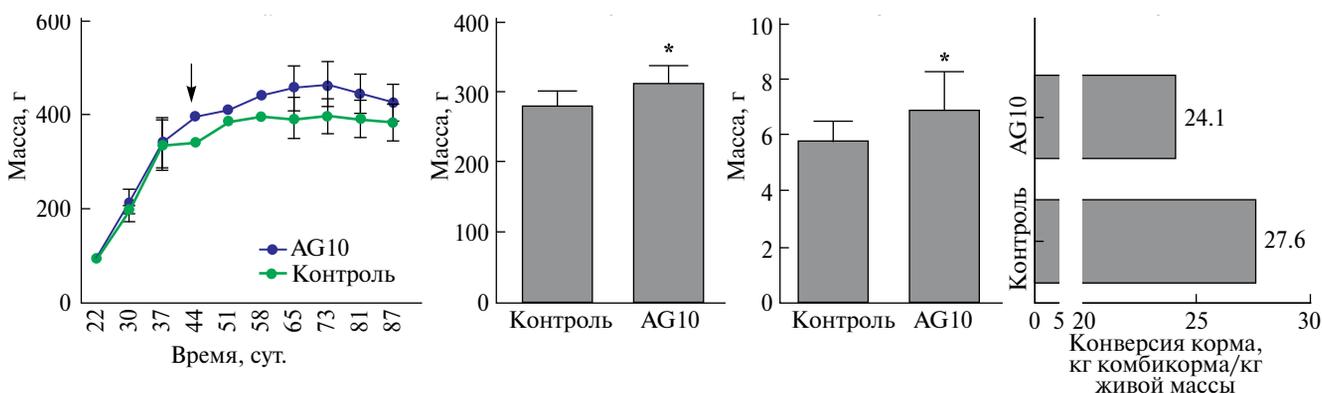


Рис. 1. Эффект внесения *L. plantarum* AG10 в качестве пробиотической добавки в корм на массу перепелов и конверсию корма: а – живая масса перепелов в ходе эксперимента; б – масса потрошенной тушки в конце эксперимента; в – масса мускульного желудка в конце эксперимента; г – коэффициент конверсии корма (кг комбикорма / кг живой массы) на 44-ый день эксперимента (указано стрелкой на рис. 1а). * – Значимая разница при $p < 0.05$ в тесте Манна–Уитни.

и содержит некоторые жирорастворимые витамины (Pourtorabi et al., 2017). Однако чрезмерное накопление жира в брюшной части является нежелательным свойством при оценке качественных показателей тушек и сопровождается некоторыми патологическими процессами, например, синдромом жирной печени (Zaefarian et al., 2019). У перепелов, получавших с кормом пробиотик, масса брюшного жира хотя и превысила на $76.5 \pm 47.5\%$ этот показатель у птиц контрольной группы, но разница была незначимой ($p > 0.1$), а масса жира составила всего 2% от массы потрошенной туши. При этом содержание общих липидов, холестерина, липопротеидов высокой и низкой плотности в крови у птиц опытной группы было даже ниже, чем в контроле (дополнительные материалы, табл. S1), а при анатомической разделке тушек не было выявлено патологических изменений в печени. В целом, ветеринарно-санитарная экспертиза установила, что внутренние органы перепелов в изучаемый период выращивания находились в хорошем физиологическом состоянии, а сохранность поголовья в обеих группах составила 100%. Отсутствие негативного влияния применения изучаемой пробиотической добавки также подтверждено данными общего и биохимического анализа крови, которые не выявили у птиц опытной группы отклонений от нормы и значимых отличий от контроля (дополнительные материалы, табл. S1).

Эффект пробиотиков на организм часто опосредован воздействием на микробиоту пищеварительного тракта (Stanley et al., 2016). Чтобы определить влияние пробиотической добавки на кишечную микробиоту перепелов, содержимое слепой кишки исследовали с помощью анализа библиотек последовательностей генов 16S рПНК, секвенированных на платформе Illumina MiSeq. Показатели альфа-разнообразия (таксономического богатства микробных сообществ), а именно: индексы таксономического разнообразия Chao1, Шеннона и Симпсона, показатель филогенетического разнообразия Faith's PD и количество ОТЕ (операционных таксономических единиц), не отличались в двух группах (дополнительные материалы, рис. S1). Для оценки бета-разнообразия (различий между сообществами) определили невзвешенные и взвешенные показатели Unifrac (Lozupone et al., 2011) с дальнейшей визуализацией с помощью анализа главных координат (PCoA). Установили, что опытная и контрольная группы были достаточно гетерогенными и существенно отличались друг от друга по составу кишечного микробного сообщества.

Основу кишечной микробиоты перепелов в обеих группах составляли филы *Firmicutes* и *Bacteroidota* (рис. 2а), что полностью согласуется с данными литературы (Wilkinson et al., 2016).

Отношение *Firmicutes* к *Bacteroidota* (F/B) широко используется в качестве характеристики

состояния кишечной микробиоты, при этом существенное преобладание одной филы над другой, как правило, соответствует дисбактериозу и другим патологиям (Stojanov et al., 2020). Введение *L. plantarum* AG10 в кормовой рацион перепелов благоприятно влияло на кишечное бактериальное сообщество, приводя к балансу между *Firmicutes* к *Bacteroidota* (F/B = 0.8).

Известно, что микробиоту слепой кишки у перепелов в основном составляют семейства *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* и *Enterobacteriaceae*. На уровне родов в порядке убывания численности там представлены *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Enterococcus* и *Clostridium* (Wilkinson et al., 2016). Действительно, указанные семейства присутствовали в исследуемых кишечных микробных сообществах, но их численность сильно варьировала (рис. 2б). У перепелов контрольной группы *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* суммарно составляли 33%, а у перепелов, получавших пробиотическую добавку, доля этих трех семейств была 60%. Семейство *Ruminococcaceae*, которое включает несколько бутират-продуцирующих родов, было богато представлено в кишечной микробиоте в обеих группах перепелов, а содержание наиболее изученного противовоспалительного и бутират-продуцирующего рода *Faecalibacterium* в них было приблизительно равным (8% в контрольной и 7% в опытной группах, $p > 0.1$). Относительно многочисленные в контроле семейства *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae* и *Staphylococcaceae* существенно снизились в опытных пробах (рис. 2в), а содержание семейств *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* и *Helicobacteraceae*, наоборот, возросло при использовании кормовой добавки. Воспалительные заболевания кишечника часто сопровождаются увеличением численности *Enterococcaceae* и *Staphylococcaceae* в кишечнике (Tolnai et al., 2021), поэтому снижение численности этих бактерий мы рассматриваем как благоприятный эффект пробиотика. Прием *Lactobacillus*-содержащих пробиотиков не всегда приводит к увеличению содержания лактобацилл в анализируемых пробах кишечной микробиоты (Beck et al., 2019). Можно предположить, что вводимые непродолжительное время (7 недель) лактобациллы колонизируют непосредственно толстую кишку и не влияют на микробиоту слепой кишки. Проведенный метагеномный анализ впервые позволил обнаружить в слепой кишке перепелов обеих групп достаточно высокое содержание семейств *Nanoperiomorpaceae*, *Acutalibacteraceae* и *Atopobiaceae*, которые ранее, по видимому, были отнесены к неклассифицированным таксонам (суммарная доля трех семейств 12% в контрольной и 8% в опытной группе). Наиболее многочисленными родами этих семейств были *Nanoperiomorbus* (8% в контрольной и 1% в опытной

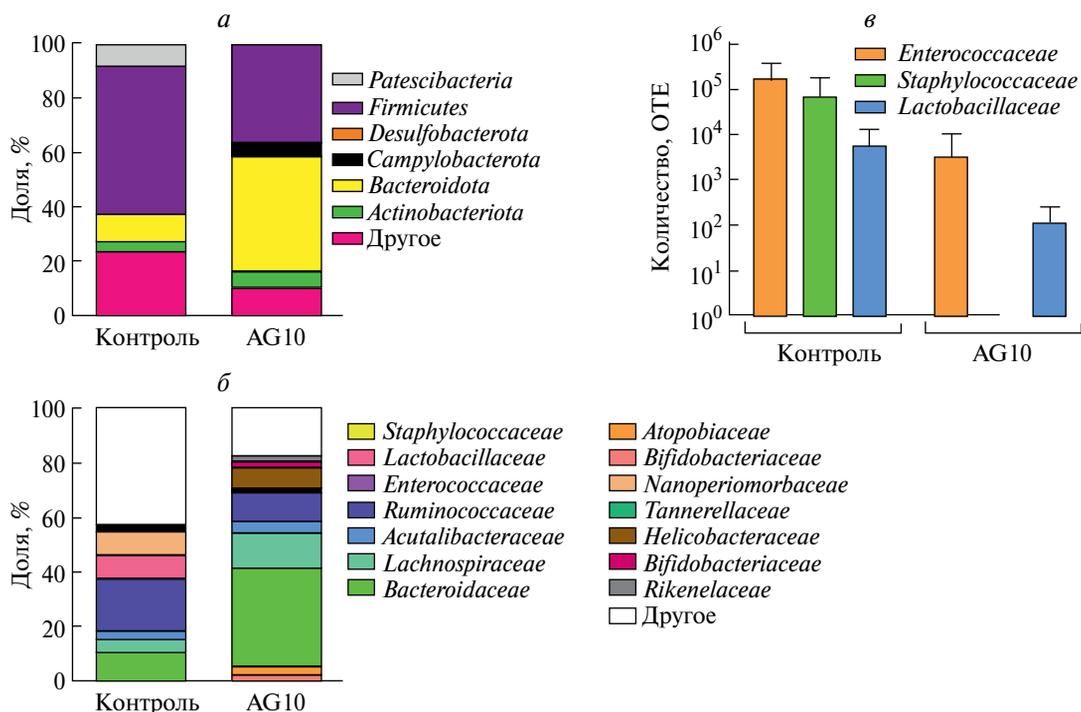


Рис. 2. Эффект внесения *L. plantarum* AG10 в качестве пробиотической добавки в корм перепелов на относительное содержание таксонов: а – на уровне типов; б – на уровне семейств; в – присутствие бактерий семейств *Staphylococcaceae*, *Enterococcaceae* и *Lactobacillaceae* в слепой кишке перепелов.

группе), *Hydrogeniiclostridium* (1% в контрольной и 1% в опытной группе) и *Thermophilibacter* (1% в контрольной и 4% в опытной группе) соответственно, которые также идентифицированы в ЖКТ перепелов впервые (дополнительные материалы, табл. S2, рис. S2).

В проведенном исследовании проанализировали изменение состава микробиоты слепой кишки перепелов в ответ на использование в рационе кормления пробиотической добавки на основе *L. plantarum* AG10. Отмечены определенные положительные изменения в микробиоте кишечника, которые могут вести к улучшению физиологических и морфологических параметров перепелов. Экономическим эффектом от использования пробиотика стало повышение продуктивности перепелов при снижении затрат кормов на 1 кг прироста.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ для обеспечения клеточных, геномных и постгеномных исследований в Приволжском регионе. Авторы выражают благодарность Казаковой Р.Р. за проведение анализа крови.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ-22-16-00040).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 40 от 09 марта 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алиев М.Ш., Захаров В.П., Прокофьева Р.Г. Факторы повышения качества продукции и эффективности птицеводства в Республике Татарстан // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2008. Т. 193. С. 12–15.

- Полонский В.И., Сумина А.В. Влияние физических характеристик зернового сырья на функциональную ценность кормов для птиц // Вестн. Российского университета дружбы народов. Сер. Агрономия и животноводство. 2021. Т. 16. № 2. С. 167–175.
- Путивская Т.Б., Норвяткин В.И. Проект повышения эффективности разведения перепелов // Региональные агросистемы: экономика и социология. 2022. № 3. С. 56–62.
- Beck B.R., Park G.S., Jeong D.Y., Lee Y.H., Im S., Song W.H., Kang J. Multidisciplinary and comparative investigations of potential psychobiotic effects of *Lactobacillus* strains isolated from newborns and their impact on gut microbiota and ileal transcriptome in a healthy murine model // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. Art. 269.
- Campana R., van Hemert S., Baffone W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion // Gut Pathogens. 2017. V. 9. Art. 12.
- Gavrilova E., Anisimova E., Gabdelkhadieva A., Nikitina E., Vafina A., Yarullina D., Bogachev M., Kayumov A. Newly isolated lactic acid bacteria from silage targeting biofilms of foodborne pathogens during milk fermentation // BMC Microbiol. 2019. V. 19. P. 1–12.
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Sanders M E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014. V. 11. P. 506–514.
- Jha R., Das R., Oak S., Mishra P. Probiotics (direct-fed microbials) in poultry nutrition and their effects on nutrient utilization, growth and laying performance, and gut health: a systematic review // Animals. 2020. V. 10. Art. 1863.
- Lozupone C., Lladser M.E., Knights D., Stombaugh J., Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison // ISME J. 2011. V. 5. P. 169–172.
- Park Y.H., Hamidon F., Rajangan C., Soh K.P., Gan C.Y., Lim T.S., Abdullah W.N.W., Liong M.T. Application of probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat // Korean J. Food Sci. Animal Resour. 2016. V. 36. P. 567–576.
- Pourtorabi E., Farzin F., Seraj A. Effects of genetic and non-genetic factors on body weight and carcass related traits in two strains of Japanese quails // Poultry Sci. J. 2017. V. 5. P. 17–24.
- Stanley D., Hughes R.J., Geier M.S., Moore R.J. Bacteria within the gastrointestinal tract microbiota correlated with improved growth and feed conversion: challenges presented for the identification of performance enhancing probiotic bacteria // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 187.
- Stojanov S., Berlec A., Štrukelj B. The influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 1715.
- Tolnai E., Fauszt P., Fidler G., Pesti-Asboth G., Szilagy E., Stigel A., Paholcsek M. Nutraceuticals induced changes in the broiler gastrointestinal tract microbiota // MSystems. 2021. V. 6. Art. e01124-20.
- Wilkinson N., Hughes R.J., Aspden W.J., Chapman J., Moore R.J., Stanley D. The gastrointestinal tract microbiota of the Japanese quail, *Coturnix japonica* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 4201–4209.
- Zaefarian F., Abdollahi M.R., Cowieson A., Ravindran V. Avian liver: the forgotten organ // Animals (Basel). 2019. V. 9. Art. 63.

SHORT COMMUNICATION

Effect of Probiotic Lactobacteria on the Intestinal Microbiota and Morphological and Physiological Indicators of Quail

E. A. Gavrilova¹*, O. S. Karaseva¹, Y. M. Monir¹, A. M. Ezhkova²,
V. O. Ezhkov², R. A. Volkov², A. M. Senina¹, D. R. Khusnutdinova¹,
E. V. Nikitina^{1,3}, D. R. Yarullina¹, and A. R. Kayumov¹

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

²Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, 420061, Kazan, Russia

³Kazan National Research Technological University, Kazan, 420015, Russia

*e-mail: Alalila@yandex.ru

Received October 25, 2023; revised December 23, 2023; accepted December 25, 2023

Abstract. The work shows the effect of adding *Lactiplantibacillus plantarum* AG10 biomass to quail feed. Quails that received a probiotic feed additive for seven weeks showed a significant improvement in such economic indicators as the dynamics of live weight, gutted carcass weight and feed consumption per

1 kg of gain. Using the analysis of libraries of 16S rRNA gene sequences sequenced on the Illumina MiSeq platform, shifts in the microbiota of the cecum were discovered, which can help improve the morphological and physiological parameters of quails.

Keywords: quail, probiotic, feed additive, lactobacilli

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.64

**ЭФФЕКТ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ
НА МИКРОБИОТУ КИШЕЧНИКА
И МОРФОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕПЕЛОВ**

© 2024 г. Е. А. Гаврилова^{а, *}, О. С. Карасева^а, Я. М. Монир^а,
А. М. Ежкова^б, В. О. Ежков^б, Р. А. Волков^б, А. М. Сенина^а,
Д. Р. Хуснутдинова^а, Е. В. Никитина^{а, с}, Д. Р. Яруллина^а, А. Р. Каюмов^а

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

^бКазанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 420061, Казань, Россия

^сКазанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, 420015, Россия

*e-mail: Alalila@yandex.ru

Таблица S1. Анализ форменных элементов и биохимических показателей крови перепелов, получавших *L. plantarum* AG10 в качестве пробиотической добавки. *Значимые различия при $p < 0.05$ в тесте Манна–Уитни

Показатель	Контроль	<i>L. plantarum</i> AG10
Лейкоциты, 10^9 /л	50.0 ± 7.0	54.2 ± 4.2
Лимфоциты, 10^9 /л	38.3 ± 6.5	39.8 ± 1.9
Сумма: нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, базофилы, 10^9 /л	2.3 ± 2.2	2.6 ± 2.2
Гранулоциты, 10^9 /л	9.4 ± 2.4	11.8 ± 2.8
Лимфоциты, %	76.5 ± 5.8	73.6 ± 4.3
Сумма: нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, базофилы, %	4.7 ± 4.5	4.7 ± 3.9
Гранулоциты, %	18.7 ± 4.2	21.7 ± 4.2
Эритроциты, 10^{12} /л	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.4
Гемоглобин, г/л	223.0 ± 14.4	225.8 ± 16.5
Гематокрит, %	37.2 ± 2.9	36.5 ± 4.2
Средний объем эритроцитов, 10^{15} /л	131.9 ± 10.3	131.0 ± 4.9
Средняя концентрация гемоглобина в крови, 10^{12} /л	79.4 ± 8.0	81.7 ± 9.9
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	601.9 ± 46.3	622.4 ± 61.9
Широта распределения популяции эритроцитах, %	10.5 ± 1.1	10.0 ± 2.2
Тромбоциты, 10^9 /л	20.4 ± 11.6	13.6 ± 4.2
Средний объем тромбоцитов, 10^{15} /л	8.8 ± 2.0	10.1 ± 2.0
Широта распределения популяции тромбоцитов, %	28.8 ± 4.6	25.0 ± 4.2
Альбумин, г/дл	3.1 ± 0.9	3.6 ± 0.8
Общий белок, г/дл	2.5 ± 0.7	2.4 ± 0.6
Билирубин, мг/дл	0.1	0.1
Креатинин, мг/дл	0.2	0.1
Общие липиды, мг/дл	499.3 ± 154.2	465.6 ± 129.6

Окончание таблицы S1

Показатель	Контроль	<i>L. plantarum</i> AG10
Холестерин, мг/дл	172.6 ± 46.4	160.7 ± 33.4
Триглицериды, мг/дл	335.0 ± 296.2	333.6 ± 402.3
Липопротеиды высокой плотности, мг/дл	187.7 ± 39.5	180.3 ± 63.4
Липопротеиды низкой плотности, мг/дл	287.2 ± 59.7	264.7 ± 64.2
*Аспаратаминотрансфераза (АСТ), Ед/л	6.6 ± 3.4	14.3 ± 6.4
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), Ед/л	22.6 ± 4.9	23.6 ± 6.2
Кальций, мг/дл	9.7 ± 2.2	10.4 ± 0.9

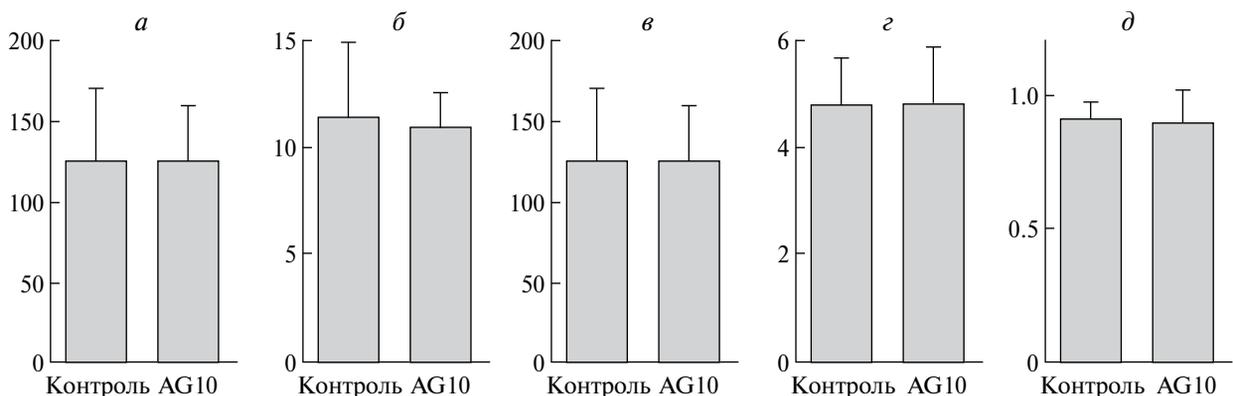


Рис. S1. Эффект внесения *L. plantarum* AG10 в качестве пробиотической добавки в корм перепелов на индексы биоразнообразия микробного сообщества слепой кишки: индексы таксономического разнообразия ((а) – Chao1; (г) – индекс Шеннона; (д) – индекс Симпсона), показатель филогенетического разнообразия Faith's PD (б) и количество ОТЕ (в).

Таблица S2. Таксономический профиль бактериального сообщества слепой кишки перепелов, получавших с кормом пробиотическую добавку на основе *L. plantarum* AG10, исследованный методом секвенирования гена 16S рибосомной РНК

Таксон	Количество
d__Bacteria;__;;__;;__;	0.001887
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinomycetia;o__Actinomycetales;f__Bifidobacteriaceae;g__Bifidobacterium_388775;s__Bifidobacterium pullorum_B_388330	0.023067
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Atopobiaceae;g__Thermophilibacter;s__Thermophilibacter avicola	0.03858
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Collinsella;__	0.005675
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Collinsella;s__Collinsella ihuae	0.001106
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Coriobacteriaceae;g__Limicola;s__Limicola sp002160065	0.000607
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Eggerthellaceae;__;	0.000713
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Coriobacteriia;o__Coriobacteriales;f__Eggerthellaceae;g__CAG-1427;s__CAG-1427 sp000435475	0.000564
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;__;;__;	8.06E-05
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;__;;__;	0.000579
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;__;	0.018242
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides_H;__	0.000107

Таксон	Количество
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Bacteroides_H;s__Bacteroides_H massiliensis	0.109079
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Phocaeicola_A_858004;s__	0.015066
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Phocaeicola_A_858004;s__Phocaeicola_A_858004 gallinaceus	0.023985
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Phocaeicola_A_858004;s__Phocaeicola_A_858004 salanitronis	0.001826
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella;s__Prevotella copri	0.000386
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella;s__Prevotella lascolaii	0.015189
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Bacteroidaceae;g__Prevotella;s__Prevotella sp003447235	0.000254
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Muribaculaceae;g__Limisoma;s__Limisoma sp900548875	0.004776
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__Alistipes_A_871400;s__	0.010875
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__Alistipes_A_871404;s__	0.001255
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Tannerellaceae;g__Parabacteroides_B_862066;s__Parabacteroides_B_862066 sp002159645	0.00217
d__Bacteria;p__Campylobacterota;c__Campylobacteria;o__Campylobacterales;f__Helicobacteraceae;__;__	0.050162
d__Bacteria;p__Desulfobacterota_I;c__Desulfovibrionia;o__Desulfovibrionales;f__Desulfovibrionaceae;g__Desulfovibrio_R_446353;__	0.001178
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Christensenellales;f__Borkfalkiaceae;g__Borkfalkia;s__	0.000428
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;__;__	0.051638
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Anaerobutyricum;s__Anaerobutyricum faecale	0.000698
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Blautia_A_141781;__	0.004368
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Lachnoclostridium_B;s__Lachnoclostridium_B sp000765215	0.004055
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Mediterraneibacter_A_155507;__	0.029052
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Mediterraneibacter_A_155507;s__Mediterraneibacter_A_155507 cottocaccae	0.018415
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae;g__Sellimonas;s__Sellimonas intestinalis	0.002748
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Oscillospirales;f__Acutalibacteraceae;__;__	0.001186
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Oscillospirales;f__Acutalibacteraceae;g__;	0.000386
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Oscillospirales;f__Acutalibacteraceae;g__Acutalibacter;s__	0.001887
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Oscillospirales;f__Acutalibacteraceae;g__Eubacterium_R;s__Eubacterium_R faecavium	0.008513
d__Bacteria;p__Firmicutes_A;c__Clostridia_258483;o__Oscillospirales;f__Acutalibacteraceae;g__Hydrogeniclostridium;s__	0.011681

Окончание таблицы S2

Таксон	Количество
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Butyricocccaceae;g_Agathobaculum;s_Agathobaculum sp900291975	0.000725
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Oscillospiraceae_88309;g_;	0.001182
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Oscillospiraceae_88309;g_Dysosmobacter;g_;	0.000419
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Oscillospiraceae_88309;g_Dysosmobacter;s_Dysosmobacter welbionis	0.002286
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Oscillospiraceae_88309;g_Lawsonibacter;s_;	0.004585
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Oscillospiraceae_88309;g_Lawsonibacter;s_Lawsonibacter sp000177015	0.003099
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Ruminococcaceae;g_;	0.003545
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Ruminococcaceae;g_Faecalibacterium;s_Faecalibacterium sp002160895	0.072577
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Ruminococcaceae;g_Gemmiger_A_73129;g_;	0.009068
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Ruminococcaceae;g_Gemmiger_A_73129;s_Subdoligranulum variabile	0.002558
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Ruminococcaceae;g_Gemmiger_A_73276;s_Gemmiger_A_73276 avium	0.000886
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Ruminococcaceae;g_Negativibacillus;s_Negativibacillus massiliensis	0.000813
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Ruminococcaceae;g_Paludicola;s_Paludicola psychrotolerans	0.001132
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_Oscillospirales;f_Ruminococcaceae;g_Phoocea;s_;	0.001465
d_Bacteria;p_Firmicutes_A;c_Clostridia_258483;o_TANB77;f_CAG-508;g_CAG-269;s_CAG-269 sp000431335	0.000434
d_Bacteria;p_Firmicutes_C;c_Negativicutes;o_Selenomonadales;f_Selenomonadaceae_42771;g_Megamonas;s_Megamonas hypermegale	0.003813
d_Bacteria;p_Firmicutes_C;c_Negativicutes;o_Veillonellales;f_Dialisteraceae;g_UBA1822;s_UBA1822 sp900545365	0.002162
d_Bacteria;p_Firmicutes_D;c_Bacilli;o_Erysipelotrichales;f_Coprobacillaceae;g_;	0,000305
d_Bacteria;p_Firmicutes_D;c_Bacilli;o_Erysipelotrichales;f_Coprobacillaceae;g_Erysipelatoclostridium;s_Erysipelatoclostridium spiroforme	0.001474
d_Bacteria;p_Firmicutes_D;c_Bacilli;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_Faecalicoccus;s_Faecalicoccus pleomorphus	0.00051
d_Bacteria;p_Firmicutes_D;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Lactobacillaceae;g_Ligilactobacillus;s_Ligilactobacillus salivarius	0.00082
d_Bacteria;p_Firmicutes_D;c_Bacilli;o_RFN20;f_CAG-826;g_Onthovivens;s_Onthovivens sp002399785	0.005211
d_Bacteria;p_Patescibacteria;c_Saccharimonadia;o_Saccharimonadales;f_Nanoperiomorbaceae;g_Nanoperiomorbus;s_;	0.008928
d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales_595427;f_Burkholderiaceae_A_595427;g_Aphodousia;s_Aphodousia faecalis	0.003061
d_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Burkholderiales_595427;f_Burkholderiaceae_A_595427;g_Sutterella;s_Sutterella parvirubra	0.0014

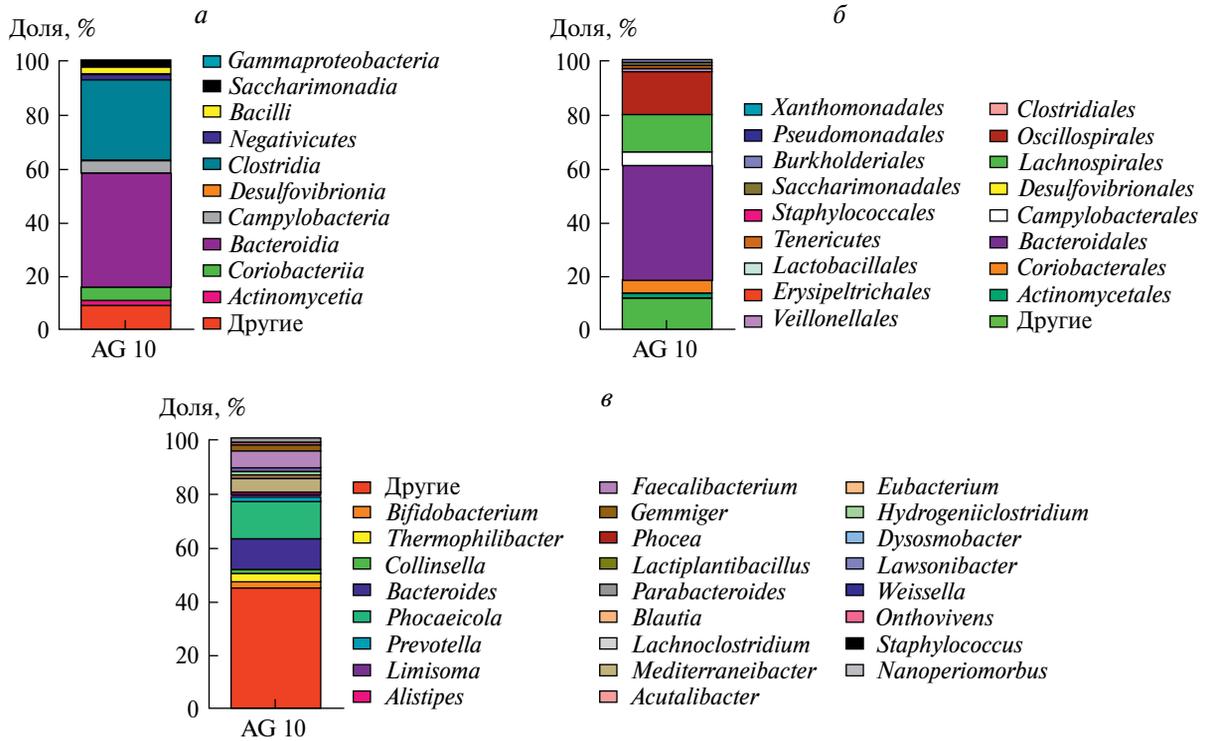


Рис. S2. Эффект внесения *L. plantarum* AG10 в качестве пробиотической добавки в корм перепелов на относительное содержание таксонов ((а) – на уровне классов; (б) – на уровне отрядов; (в) – на уровне родов).